

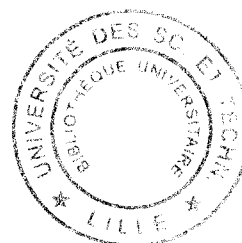
UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE 1

THÈSE

présentée en vue de l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

discipline : Sciences des matériaux

par Lionel MARCON



Détection électrique d'anticorps sériques humains à l'aide d'un nanocapteur

Soutenue publiquement le jeudi 15 décembre 2005 devant le jury suivant :

| | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Présidente du jury : | Ghislaine COULON |
| Rapporteurs : | Sabine SZUNERITS Christophe VIEU |
| Examineur : | Dominique AUSSERRÉ |
| Directeur de thèse : | Didier STIEVENARD |
| Co-directeur de thèse : | Oleg MELNYK |

Remerciements

Je remercie Ghislaine Coulon de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je suis très reconnaissant à Sabine SZUNERITS et Christophe VIEU d'avoir accepté le rôle de rapporteur, ainsi qu'à Dominique AUSSERRÉ qui examine ce travail.

Cette thèse a été préparée au sein de l'équipe Physique de l'IEMN (Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie) et de l'UMR 8525 de l'IBL (Institut de Biologie de Lille) sous la direction conjointe de Didier STIEVENARD et Oleg MELNYK.

Je remercie tout d'abord Didier STIEVENARD et Oleg MELNYK pour avoir encadré ces travaux et pour m'avoir accordé leur confiance.

Je salue Dominique DERESMES, Stéphane LENFANT, Eric DIESIS et Rémi DESMET pour leur bonne humeur ainsi que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet.

Un grand merci à Zoulika KHERROUCHE, Olivier CARION, Dave TRINEL et Corentin SPRIET dont les conversations nihilistes, chaotiques et dépourvues de sens m'ont permis de passer de grands moments.

Enfin, une pensée sincère pour mes parents Marie et Jean-Marie qui étaient éloignés et proches en même temps.

Dieu(x)

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATIONS | 1 |
| INTRODUCTION | 2 |
| I – CONTEXTE DU PROJET..... | 4 |
| 1 – UN DOMAINE PLURIDISCIPLINAIRE : LES NANOTECHNOLOGIES..... | 5 |
| 2 – LE SYSTEME IMMUNITAIRE ET LES REACTIONS ANTIGENE –ANTICORPS..... | 6 |
| 2.1 – LA REPOSE IMMUNITAIRE | 6 |
| 2.2 - L'IMMUNITE NATURELLE | 7 |
| 2.3 - L'IMMUNITE ACQUISE OU ADAPTATIVE..... | 8 |
| 2.4 – LES ANTIGENES..... | 8 |
| 2.5 – LES IMMUNOGLOBULINES | 9 |
| 2.3.a - <i>Structure de base</i> | 9 |
| 2.3.b - <i>Les différentes immunoglobulines</i> | 10 |
| 3 – METHODE DE DETECTION DES ANTICORPS | 11 |
| 3.1 - LE SERODIAGNOSTIC | 11 |
| 3.2 - METHODES PRIMAIRES | 11 |
| 3.3 - METHODES SECONDAIRES | 14 |
| 3.4 - LIMITATIONS | 14 |
| 4 – LA TECHNOLOGIE DES BIOPUCES..... | 15 |
| 4.1– LES BIOPUCES A ADN | 15 |
| 4.2 – LES BIOPUCES A PEPTIDES | 18 |
| 5 –LES PROPRIETES CONDUCTRICES DES MOLECULES SYNTHETIQUES..... | 19 |
| 5.1 - LES TRANSISTORS..... | 20 |
| 5.2 –LES MOLECULES SYNTHETIQUES CONDUCTRICES ORGANIQUES | 21 |
| 5.2.a - <i>Les redresseurs moléculaires</i> | 21 |
| 5.2.b - <i>Les fils moléculaires</i> | 23 |
| 6 - UNE NOUVELLE GENERATION DE CAPTEURS | 27 |
| 6.1 - LES BIOCAPTEURS | 27 |
| 6.2 - UN CONCEPT NOUVEAU DE TRANSDUCTION : LA DETECTION ELECTRIQUE..... | 28 |
| 6.2.a – <i>Transport de charge dans l'ADN</i> | 28 |
| 6.2.b – <i>Amplification du signal par des nanoparticules</i> | 30 |
| 6.2.c - <i>Détection électrique d'interactions polypeptidiques</i> | 31 |
| 7 – PRESENTATION DU PROJET | 33 |
| II - TECHNIQUES DE MICROFABRICATION ET D'ANALYSE..... | 35 |
| 1 - CONCEPTION DES ELECTRODES..... | 36 |
| 1.1 - PRINCIPE DE LA DEFINITION DES MOTIFS..... | 36 |
| 1.2 - L'OXYDATION THERMIQUE | 37 |
| 1.3 - LA PREPARATION DE SURFACE..... | 38 |
| 1.3.a - <i>Plasma</i> | 39 |
| 1.3.b - <i>Piranha</i> | 39 |
| 1.4 - LA LITHOGRAPHIE | 40 |
| 1.4.a - <i>Lithographie optique</i> | 40 |
| 1.4.b - <i>Lithographie électronique</i> | 41 |
| 1.4.c – <i>Evolution</i> | 42 |
| 1.5 - LE DEVELOPPEMENT | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 1.6 - METALLISATION | 43 |
| 1.7 - LIFT-OFF..... | 43 |
| 1.8 - INTERET D'UNE RESINE BICOUCHE EN E-BEAM | 45 |
| 2 - CHIMIE DE SURFACE | 46 |
| 2.1 - LES FILMS DE LANGMUIR-BLODGETT | 46 |
| 2.2 - LES FILMS AUTO-ASSEMBLES..... | 47 |
| 2.3 - TECHNIQUES D'IMPRESSION | 50 |
| 3 - TECHNIQUES DE CARACTERISATION | 51 |
| 3.1 – ANGLES DE CONTACT..... | 51 |
| 3.1.a – Principe..... | 51 |
| 3.1.b - Calcul de l'énergie de surface..... | 53 |
| 3.2 - LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE | 54 |
| 3.3 - LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE | 56 |
| 3.3.a - Principe | 56 |
| 3.3.b - Courbe de force | 58 |
| 3.3.c - Le mode contact..... | 59 |
| 3.3.e - Le mode tapping ou contact intermittent | 60 |
| 3.3.f - Performances..... | 60 |
| 3.4 - CARACTERISATION ELECTRIQUE..... | 61 |
| 3.5 - SCANNER A FLUORESCENCE | 62 |
| 3.5.a – Principe..... | 62 |
| 3.5.b – Molécule fluorescente utilisée..... | 63 |
| 3.5.c – Applications générales..... | 64 |
| 4 - POINT STATISTIQUE ET TRAITEMENT DES DONNEES | 64 |
| | |
| III - CARACTERISATION CHIMIQUE D'UN NANOGAP | 67 |
| 1 – PROBLEMATIQUE DE LA CHIMIE DANS UN NANOGAP | 68 |
| 2 – FABRICATION DES NANO ELECTRODES..... | 70 |
| 2.1 – GEOMETRIE DES ELECTRODES..... | 70 |
| 2.2 – PROTOCOLE EXPERIMENTAL | 71 |
| 2.3 – OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE..... | 72 |
| 3 – SYNTHESE DE LA FONCTION SEMICARBAZIDE ET CONTROLE-QUALITE DES SURFACES | 73 |
| 3.1 – FORMATION DU SEMICARBAZIDE | 73 |
| 3.2 - REVELATION DES SURFACES | 74 |
| 3.3 - QUANTIFICATION DES LAMES | 75 |
| 4 – ETUDE DU GREFFAGE PAR GONIOMETRIE | 76 |
| 4.1 - INTRODUCTION..... | 76 |
| 4.2 - PARTIE EXPERIMENTALE..... | 76 |
| 4.3 - RESULTATS..... | 77 |
| 4.4 - CONCLUSIONS | 78 |
| 5 – SYNTHESE ET DEPOT D'UNE NANOPARTICULE D'OR A-OXO ALDEHYDE | 78 |
| 5.1 - LES NANOPARTICULES COLLOÏDALES | 79 |
| 5.2 - SYNTHESE DES PARTICULES FONCTIONNELLES | 81 |
| 5.2.a – Réactifs mis en jeu | 81 |
| 5.2.b - Préparation des nanoparticules d'or fonctionnelles COCHO..... | 82 |
| 5.2.c - Préparation des particules témoins or-C(O)NH ₂ | 83 |
| 5.2.e - Suivi des réactions par spectrométrie-vis et DLS | 83 |
| 5.3 - TESTS DE REACTIVITE PAR PRECIPITATION AU SEL D'ARGENT | 86 |
| 5.4 - DEPOT SUR LES NANO ELECTRODES..... | 88 |
| 5.5 - CONCLUSIONS | 90 |
| 6 – ETUDE PAR AFM DE FORCE DU NANOGAP | 91 |

| | |
|--|----|
| 6.1 - LA MICROSCOPIE A FORCE CHIMIQUE | 92 |
| 6.2 - OBSERVATION DU NANOGAP EN AFM CLASSIQUE..... | 93 |
| 6.3 - ETUDE DU NANOGAP NON FONCTIONNALISE | 94 |
| 7 - CONCLUSIONS..... | 95 |

IV - DETECTION ELECTRIQUE D'UNE INTERACTION PAR PRECIPITATION..... 97

| | |
|---|-----|
| 1 - L'INTERACTION SECONDAIRE SpA-IgG-Ac ^{II} | 99 |
| 1.1 - LA PROTEINE A..... | 99 |
| 1.2 - LES IMMUNOGLOBULINES G HUMAINES | 100 |
| 1.3 - COMPLEXITE DU SERUM HUMAIN | 101 |
| 1.4 - NATURE DE L'INTERACTION SpA-IgG | 101 |
| 2 - VALIDATION DU PROTOCOLE DE DEPOT SUR VERRE PAR FLUORESCENCE..... | 102 |
| 2.1 - ETUDES ANTERIEURES DU DEPOT DE BIOMOLECULES SUR SURFACE SOLIDE | 102 |
| 2.2 - PARTIE EXPERIMENTALE..... | 102 |
| 2.3 - CHOIX DES SONDAS TEMOIN POUR LE SPOTTING..... | 103 |
| 2.4 - ANALYSE ET QUANTIFICATION | 104 |
| 2.5 - ETUDE DE LA CONCENTRATION EN SpA..... | 104 |
| 3 - PRINCIPE ET APPLICATIONS DE LA METHODE DE PRECIPITATION SELECTIVE | 105 |
| 4 - FABRICATION DES MICROELECTRODES..... | 107 |
| 4.1 - DIMENSIONS SPATIALES DE L'INTERACTION SpA-IgG | 107 |
| 4.2 - MODE OPERATOIRE..... | 108 |
| 5 - REALISATION DE L'INTERACTION SECONDAIRE..... | 110 |
| 5.1 - TESTS ENVISAGES | 110 |
| 5.2 - ETUDE DU DIAMETRE DES SPOTS EN FONCTION DU VOLUME SPOTTE..... | 111 |
| 5.3 - IMMOBILISATION DU COMPLEXE SpA-IgG-Ac ^{II} | 113 |
| 5.4 - OBSERVATIONS EN AFM | 114 |
| 5.5 - CARACTERISATION ELECTRIQUE DES ELECTRODES AVANT ET APRES TRAITEMENT | 115 |
| 6 - AMPLIFICATION PAR PRECIPITATION D'ARGENT METALLIQUE | 116 |
| 6.1 - MODE OPERATOIRE..... | 116 |
| 6.2 - DETERMINATION DU TEMPS OPTIMAL DE TRAITEMENT | 116 |
| 6.3 - DETECTION ELECTRIQUE | 118 |
| 6.3.a - <i>Test de spécificité</i> | 118 |
| 6.3.b - <i>Test de concentration</i> | 121 |
| 6.4 - DISCUSSION..... | 122 |

V - DETECTION DE L'INTERACTION SECONDAIRE DANS UN NANOGAP..... 124

| | |
|--|-----|
| 1 - DETECTION DANS UN GAP VARIABLE 30→280 NANOMETRES | 126 |
| 1.1 - CARACTERISATION DES ELECTRODES A VIDE | 127 |
| 1.2 - PROTOCOLE DE DEPOT DU COMPLEXE SpA-IgG PUIS DE L'Ac ^{II} -OR..... | 128 |
| 1.3 - OBSERVATION DES PARTICULES D'OR EN AFM | 129 |
| 1.4 - MESURES ELECTRIQUES | 131 |
| 1.4.a - <i>Expérience contrôle sans sérum</i> | 131 |
| 1.4.b - <i>Expérience complète</i> | 132 |
| 1.5 - ANALYSE DES COURBES I(V) APRES DEPOT DE L'Ac ^{II} -OR | 133 |
| 1.5.a - <i>Profils observés</i> | 133 |
| 1.5.b - <i>Bilan</i> | 135 |
| 1.6 - ETUDE DE L'INFLUENCE D'UN Ac ^{II} MARQUE A LA RHODAMINE | 136 |
| 1.6.a - <i>Observation en fluorescence</i> | 137 |
| 1.6.b - <i>Mesures électriques</i> | 137 |
| 1.7 - INTERPRETATION | 139 |

| | |
|--|------------|
| 2 – DETECTION DANS UN GAP VARIABLE 30→90 NANOMETRES | 141 |
| 2.1 – SOURCES DE COURTS-CIRCUITS PREMATURES | 142 |
| 2.2 – OBSERVATION MEB DES PARTICULES D'OR DANS LE GAP | 144 |
| 2.3 – MESURES ELECTRIQUES | 144 |
| 2.4 – ANALYSE DU PROFIL DES COURBES I(V) | 148 |
| 2.4 – IMPACT DES PARTICULES D'OR α -OXO ALDEHYDE SUR LE COURANT | 150 |
| 2.5 – INFLUENCE DE L'HUMIDITE SUR LA DETECTION | 152 |
| 2.5.a - <i>Approche théorique</i> | 153 |
| 2.5.b - <i>Approche expérimentale</i> | 154 |
| 2.5.c - <i>Mode opératoire</i> | 154 |
| 2.5.d - <i>Conclusions</i> | 155 |
| 3 – BILAN | 155 |
| | |
| CONCLUSION GENERALE | 157 |
| BIBLIOGRAPHIE | 160 |

Abréviations

A, G, C, T : Adénine, Cytosine, Guanine, Thymine
AB : interactions de type acide-base de Lewis
Ac : anticorps
Ac^{II} : anticorps secondaire
ADN : acide désoxyribonucléique
AFM : *Atomic Force Microscopy*
Ag : antigène
APTMS : 3-aminopropyltriméthoxysilane
BSA : *Bovine Serum Albumine*
CCD : *Charge-Coupled Device*
CFM : *Chemical Force Microscopy*
COCHO : terminaison chimique α -oxo aldéhyde
COPO : copolymère de méthyl méthacrylate et de polyméthylméthacrylate PMMA
DBU : 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène
DIEA : diisopropyléthylamine
DMF : diméthylformamide
Eau mQ : eau déionisée
ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EtOH : éthanol
Fab : *Fragment antigen binding*
Fc : fragment constant
Fmoc : 9-fluorénylméthoxycarbonyl
HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*
Ig : immunoglobulines
IPA : alcool isopropylique
Lc : lymphocyte
LW : Lifshitz- Van der Waals
MEB : Microscopie Electronique à Balayage
MeOH : méthanol
MIBK : *methylisobutylketone*
NP : nanoparticule
NPAu : nanoparticule en or
ODN : oligodéoxynucléotide
OTS : octadécyltrichlorosilane
PBS : *Phosphate Buffered Saline*
PMMA : polyméthylméthacrylate
SAM : *Self-Assembled Monolayer*
STM : *Scanning Tunneling Microscopy*
TRIS : tris-(hydroxyméthyl)aminométhane
Tween 20 : polyoxyéthylène(20) sorbitan monolaurate

Introduction

Les nanotechnologies constituent un champ de recherches impliquant la fabrication de structures à des échelles comprises entre un et cent nanomètres. L'approche dite *top down* consiste à diminuer les dimensions des objets fabriqués. Ainsi, une plaquette de silicium peut intégrer en parallèle plusieurs circuits électroniques comportant cent millions de transistors. Cette miniaturisation s'accompagne de la conception de molécules ayant des propriétés uniques à cette échelle. Par exemple, les nanotubes de carbone, apparus en 1999, possèdent un caractère semi-conducteur.

Récemment, cette stratégie de réduction des dimensions a été appliquée à divers domaines d'étude et en particulier au diagnostic. L'industrie pharmaceutique doit en effet adapter la fabrication des kits de sérodiagnostic en diminuant les coûts d'analyse médicale pour répondre à l'augmentation du nombre de marqueurs antigéniques imposés par les directives européennes.

Or, l'élaboration de nouveaux systèmes à l'échelle du nanomètre permet la manipulation d'un grand nombre de molécules biologiques avec la mise au point de véritables laboratoires miniaturisés (*lab-on-chips*). La technologie des biopuces en est un parfait exemple : il est désormais possible de créer des dispositifs basés sur la détection de milliers d'interactions de biomolécules (ADN, peptides, protéines...) avec leur environnement sur des surfaces inférieures au centimètre carré. Le principe de base de ces systèmes consiste à enregistrer les modifications physico-chimiques (fluorescence, masse, radioactivité...) provoquées par la reconnaissance moléculaire des sondes biologiques immobilisées sur un biocapteur avec des récepteurs provenant d'un milieu biologique à analyser (plasma, sérum...).

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire se situe précisément dans ce cadre. Nous cherchons à développer un nouveau type de biocapteur capable de détecter une interaction spécifique entre des molécules biologiques par l'intermédiaire de mesures de la conductivité dans un nanogap. Notre approche consiste à fixer entre des électrodes très rapprochées (distance inférieure à cent nanomètres) une interaction modèle de type antigène/anticorps impliquant la forte affinité de la protéine A (sonde) avec les immunoglobulines provenant de sérum humain (milieu biologique).

Le **chapitre I** décrit le contexte scientifique du projet afin d'amener le schéma de principe du dispositif de détection envisagé.

Ce dispositif réalisé à l'échelle nanométrique induit l'apparition de nouvelles lois de comportement moléculaire et nécessite donc une technologie adaptée. Celle-ci, présentée dans le **chapitre II**, implique la conception de nanoélectrodes, les traitements chimiques utilisés pour immobiliser les biomolécules sur le support et enfin les techniques d'observation et de caractérisation.

Nous appliquons ensuite ces procédés dans les chapitres suivants afin de détecter l'interaction modèle par une variation de conductivité. Cependant, à de telles dimensions, il est difficile de vérifier la réactivité du gap vis-à-vis des traitements chimiques de surface. Le **chapitre III** vise à étudier au moyen de différentes techniques (goniométrie, CFM et synthèse de particules fonctionnelles) le comportement du gap en vue d'un dépôt sélectif et contrôlé des biomolécules. Une fois ce travail préliminaire effectué, les tests de détection peuvent être initiés.

Pratiquement, une variation de la conductivité n'est pas observable directement après l'immobilisation des molécules. Une amplification du signal nécessite l'utilisation d'anticorps secondaires marqués par des nanoparticules d'or suivie d'une précipitation d'argent métallique catalysée par l'or. Cette méthode est décrite dans le **chapitre III** avant d'être améliorée au sein du **chapitre IV** en supprimant l'étape de précipitation. Les résultats obtenus sont interprétés à l'aide des théories développées dans la littérature (notamment sur le transfert électronique) afin de comprendre le comportement des dispositifs.

Enfin, une conclusion générale établit le bilan des travaux réalisés ainsi qu'une discussion sur les améliorations possibles de la détection.

Chapitre I – Contexte du projet

| | |
|---|-----------|
| 1 – UN DOMAINE PLURIDISCIPLINAIRE : LES NANOTECHNOLOGIES..... | 5 |
| 2 – LE SYSTEME IMMUNITAIRE ET LES REACTIONS ANTIGENE –ANTICORPS..... | 6 |
| 2.1 – LA REPOSE IMMUNITAIRE | 6 |
| 2.2 - L'IMMUNITE NATURELLE | 7 |
| 2.3 - L'IMMUNITE ACQUISE OU ADAPTATIVE..... | 8 |
| 2.4 – LES ANTIGENES..... | 8 |
| 2.5 – LES IMMUNOGLOBULINES | 9 |
| 2.3.a - <i>Structure de base</i> | 9 |
| 2.3.b - <i>Les différentes immunoglobulines</i> | 10 |
| 3 – METHODE DE DETECTION DES ANTICORPS..... | 11 |
| 3.1 - LE SERODIAGNOSTIC | 11 |
| 3.2 - METHODES PRIMAIRES | 11 |
| 3.3 - METHODES SECONDAIRES | 14 |
| 3.4 - LIMITATIONS | 14 |
| 4 – LA TECHNOLOGIE DES BIOPUCES | 15 |
| 4.1– LES BIOPUCES A ADN | 15 |
| 4.2 – LES BIOPUCES A PEPTIDES..... | 18 |
| 5 –LES PROPRIETES CONDUCTRICES DES MOLECULES SYNTHETIQUES | 19 |
| 5.1 - LES TRANSISTORS | 20 |
| 5.2 –LES MOLECULES SYNTHETIQUES CONDUCTRICES ORGANIQUES | 21 |
| 5.2.a - <i>Les redresseurs moléculaires</i> | 21 |
| 5.2.b - <i>Les fils moléculaires</i> | 23 |
| 6 - UNE NOUVELLE GENERATION DE CAPTEURS..... | 27 |
| 6.1 - LES BIOCAPTEURS | 27 |
| 6.2 - UN CONCEPT NOUVEAU DE TRANSDUCTION : LA DETECTION ELECTRIQUE..... | 28 |
| 6.2.a – <i>Transport de charge dans l'ADN</i> | 28 |
| 6.2.b – <i>Amplification du signal par des nanoparticules</i> | 30 |
| 6.2.c - <i>Détection électrique d'interactions polypeptidiques</i> | 31 |
| 7 – PRESENTATION DU PROJET | 33 |

1 – Un domaine pluridisciplinaire : les nanotechnologies

Les nanosciences sont aujourd’hui un domaine au carrefour de trois spécialités (sinon plus) : la physique, la chimie et la biologie. Elles concernent l’ensemble des techniques qui permettent d’observer, mesurer ou fabriquer des éléments dont la taille est inférieure à cent nanomètres ($=100 \cdot 10^{-9}$ m). Ces technologies représentent actuellement un marché de 2,5 milliards d’euros susceptible d’atteindre mille milliards d’euros d’ici 2010^a. Les ingénieurs travaillent depuis trente ans pour réduire les dimensions des structures fabriquées pour les rendre plus denses, en atteignant des tailles de vingt nanomètres. Cette tendance s’exprime par la loi de Moore : le nombre de transistors intégrés sur une puce électronique double tous les 18 mois (Fig. 1.1).

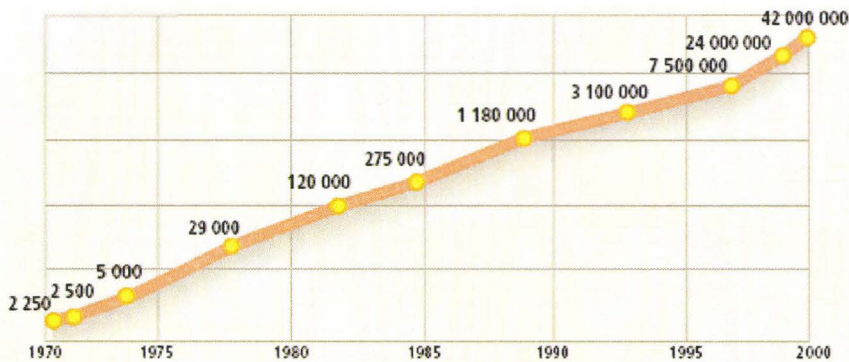


Figure 1. 1 : Croissance du nombre de transistors (source : Intel).

Prophétisant une telle évolution dès 1959, Richard Feynman fit remarquer devant l'*American Physical Society* que l'*Encyclopedia Britannica* pourrait tenir sur une tête d'épingle^b. En réalité, il faudra attendre jusqu'en 1980 la réalisation du microscope à effet tunnel par le laboratoire IBM de Zurich afin d'isoler des atomes [Baro, 1985]. A l'aide d'une pointe métallique extrêmement fine se déplaçant à quelques nanomètres d'une surface, cet appareil permet, par une simple tension électrique, de distinguer les atomes, de les capturer et les relâcher à un endroit désiré. C'est ainsi que le laboratoire parvint à écrire le mot IBM avec 35 atomes.

En parallèle, les biologistes moléculaires travaillent dans des dimensions allant de plusieurs nanomètres (ADN, virus) jusqu'à plusieurs micromètres (cellules). De telles innovations, couplées à l'analyse et la compréhension des systèmes biologiques, ont fait émerger de nombreux objectifs technologiques à base de nano-objets dans une immense

^a selon la NanoBusiness Alliance et la National Science Foundation (NSF)

^b texte disponible à l'adresse <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>

variété de domaines d'applications (Tab. 1.1) : les matériaux et la fabrication, les technologies de l'information, la santé, l'environnement et l'énergie ...

| | |
|--|--|
| Automobile – aéronautique | Matériau renforcé par des nanoparticules Peinture extérieure non salissable Plastique ininflammable peu coûteux |
| Electronique – communication | Technologie du silicium pour l'informatique Enregistrement de données à l'aide de nanocouches Ecrans plats Technologie <i>wireless</i> Amélioration des vitesses et capacités d'enregistrement |
| Chimie – science des matériaux | Catalyseurs énergétiques plus efficaces Outils de coupe plus durs et résistants |
| Secteur manufacturier | Nouvelle génération de microscopes et instruments de mesure Manipulation atomique Assemblage de structures moléculaires |
| Energie | Nouveaux types de batterie Stockage sécuritaire de l'hydrogène Photosynthèse artificielle pour énergies propres |
| Exploration spatiale | Véhicules de prospection plus légers Miniaturisation des systèmes robotiques |
| Environnement | Membranes sélectives pour filtration des contaminants de l'eau Réduction des sources de pollution Nouvelles méthodes de recyclage |
| Défense | Systèmes de surveillance miniaturisés DéTECTEURS d'agents chimiques et biologiques |
| Industries pharmaceutiques – biotechnologies et soins | Médicaments basés sur les nanostructures Vectorisation dans le corps Matériaux de remplacement biocompatibles Kits d'autodiagnostic à domicile Senseurs tenant sur une puce |

Tableau 1. 1 : Principales applications des nanotechnologies.

Aujourd'hui, le marché est porté par les innovations du domaine microélectronique et des nanomatériaux : les applications les plus répandues concernent les microprocesseurs, disques durs et écrans plats. Mais d'autres secteurs industriels s'intéressent plus particulièrement au diagnostic médical et à la réalisation de nanocapteurs (ou *nanosensors*) qui recourent à la fois des compétences issues de la biologie, de la chimie et enfin de la physique. Il devient possible de cribler des mélanges complexes de protéines pour des interactions particulières : ADN-protéine, antigène-anticorps... Nous nous intéresserons plus particulièrement au sein de ce projet aux interactions de type antigène-anticorps.

2 – Le système immunitaire et les réactions antigène – anticorps

2.1 – La réponse immunitaire

L'immunité peut être définie comme l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme de reconnaître et tolérer ce qui lui appartient en propre (le soi) et de reconnaître et rejeter ce qui lui est étranger (le non soi). Le système immunitaire constitue donc un réseau complexe de cellules et d'organes qui fonctionnent afin de contrer

les attaques de substances étrangères (bactéries, virus, parasites, ou bien champignons), mais aussi ses propres constituants altérés (cellules tumorales). Il peut reconnaître virtuellement des millions d'ennemis différents. Lors de la rencontre avec un agent pathogène, une réponse peu spécifique est rapidement mise en oeuvre : il s'agit de l'immunité innée ou naturelle. Une réaction plus tardive et bien plus spécifique entre ensuite en jeu sous le nom d'immunité acquise. La figure 1.2 résume les mécanismes de défense de l'organisme.

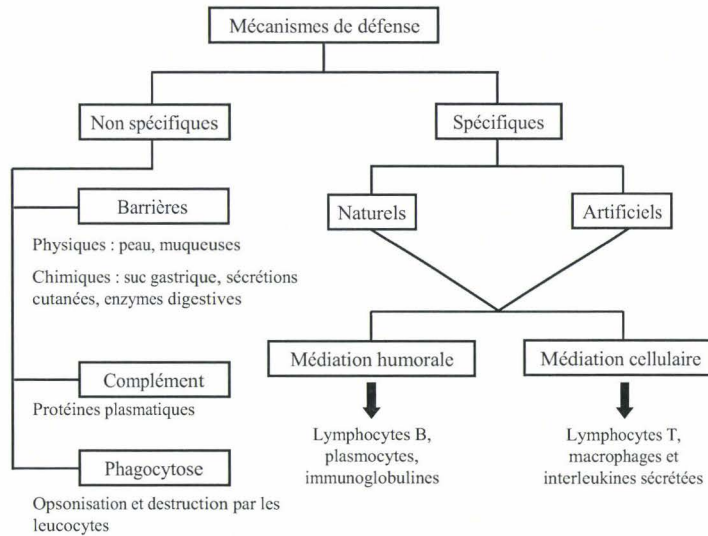


Figure 1. 2 : Mécanismes de défense immunitaire.

2.2 - L'immunité naturelle

Les mécanismes non spécifiques sont présents chez tous les individus sains dès la naissance et ne nécessitent pas d'exposition préalable à des micro-organismes ou leurs antigènes (Ag). Les protagonistes sont les barrières physiques (épiderme et muqueuses), chimiques (acide gastrique, enzymes digestives), les cellules phagocytaires et le système du complément. Les monocytes et les neutrophiles sont les phagocytes les plus efficaces en raison de leurs récepteurs membranaires capables de se lier à des molécules de surface des bactéries (LPS, mannose, acides teichoïques ...). Ces molécules poussent le macrophage à ingérer, internaliser et dégrader la bactérie avant de produire des effecteurs solubles responsables de la réaction inflammatoire. Cette réaction inflammatoire est définie par l'apparition de douleur, rougeur et gonflement visant les vaisseaux sanguins locaux. Ces derniers se dilatent et deviennent perméables aux leucocytes circulants (neutrophiles et macrophages) qui gagnent le lieu de l'infection.

Le complément constitue un système auxiliaire de l'immunité formé d'un ensemble de trente protéines plasmatiques synthétisées essentiellement par le foie et les macrophages. On attribue trois grandes fonctions au complément : l'opsonisation, c'est à dire l'attache covalente à la surface des bactéries afin de faciliter la phagocytose, l'inflammation et la lyse afin de perforer la paroi et la membrane de bactéries.

La réponse innée permet la mobilisation immédiate d'un grand nombre de cellules aptes à éliminer l'Ag sans l'avoir rencontré auparavant. Elle n'est pas toujours suffisante pour éradiquer le pathogène mais reste indispensable pour mener à bien une première défense avant que l'immunité acquise ne prenne le relais (4-5 jours).

2.3 - L'immunité acquise ou adaptative

L'immunité spécifique correspond à la capacité de l'organisme à développer une protection contre de nouveaux micro-organismes qui l'envahissent. Elle présente deux volets dont la réponse humorale, basée sur la production de molécules effectrices appelées immunoglobulines (Ig) ou anticorps (Ac) produites par les plasmocytes résultant de la différenciation des lymphocytes (Lc) B. Vient ensuite la réponse cellulaire basée sur l'action des Lc T qui coordonnent *via* des signaux solubles, les interleukines, les différents volets de la réponse. La réponse adaptative est différente s'il s'agit d'une primo-infection (le pathogène est en contact avec le système immunitaire pour la première fois) ou d'une réinfection. Quand un Ag présent dans le sang est reconnu par un Lc B, celui-ci se fixe sur le récepteur antigénique spécifique du Lc. Le Lc B sélectionné se multiplie par une série de mitoses avant activation des clones par les Lc T auxiliaires. Il se produit ensuite une différenciation des Lc B en plasmocytes sécréteurs d'Ac (également spécifiques de l'Ag). Cependant, une certaine portion de ces Lc activés se transformera en Lc mémoire à longue durée de vie. Ils seront plus rapidement activés en cas de seconde rencontre avec le même Ag.

2.4 – Les antigènes

On appelle antigènes les organismes étrangers qui investissent le corps, incitant le système immunitaire à produire des Ac spécifiques. Les Ag sont pour la plupart des protéines ou des acides nucléiques produits par des micro-organismes (une toxine par exemple) ou bien présents à la surface d'une bactérie, un virus... L'Ag, de poids moléculaire souvent supérieur à 10 000 daltons, est constitué de deux éléments : une substance protéique et un haptène. La totalité de l'Ag n'est pas responsable de la réponse immunitaire, seulement certains de ses constituants. En effet, les Ac reconnaissent une zone localisée à la surface de l'Ag, appelée déterminant antigénique ou épitope. Un seul

corps étranger peut posséder plusieurs déterminants antigéniques effectifs, lesquels vont inciter le système immunitaire à produire plusieurs Ac contre lui. Cependant, la résistance à une infection dépend principalement de la réponse immunitaire sur un faible nombre d'Ag en surface des micro-organismes.

2.5 – Les immunoglobulines

Les anticorps, également appelés immunoglobulines, sont des protéines présentes essentiellement dans les liquides biologiques (plasma, sérum, sécrétions), et agissent pour défendre l'organisme contre l'invasion d'agents pathogènes. Ils reconnaissent les séquences antigéniques à la surface de corps étrangers et interviennent dans les mécanismes d'élimination de ces corps étrangers. Produits par les plasmocytes (cellules issues de lymphocytes B), ils sont présents chez tous les vertébrés et se comptent par plusieurs milliards tous différents au sein d'un même organisme.

2.3.a - Structure de base

Les Ac possèdent une structure en Y comprenant quatre chaînes : deux chaînes lourdes identiques (de 50 à 70 kDa) ainsi que deux chaînes légères identiques (25 kDa) réunies entre elles par des ponts disulfures (voir figure 1.3). Les deux branches du Y constituent les fragments Fab (*Fragment antigen binding*) dont les extrémités sont les sites de fixation à l'Ag [Manz, 2004]. Le pied du Y est appelé fragment Fc (Fragment cristallisable) et porte la spécificité de classe de l'Ac, support des fonctions effectrices spécifiques.

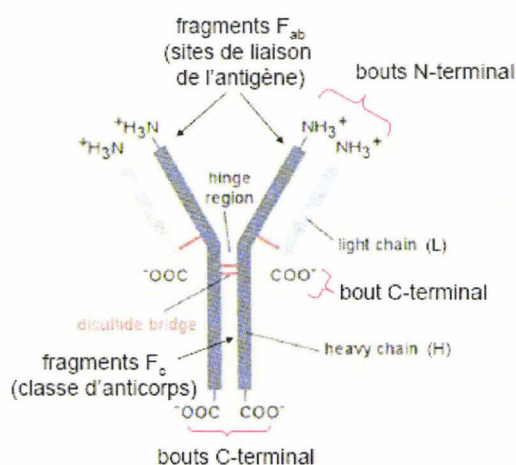


Figure 1.3 : Structure générale des anticorps [Manz, 2004].

Les chaînes lourdes comprennent cinq types majeurs (γ , μ , α , δ et ϵ) qui déterminent la classe de l'Ac. Il existe pour les chaînes légères deux types principaux (κ et λ). Chaque domaine comprend environ cent acides aminés, dont une cystéine à chaque extrémité responsable des boucles et des ponts disulfures intramoléculaires. Or, chaque classe d'Ig diffère d'une autre par la structure en aminoacide de son domaine constant, sa taille et sa charge électrique, liée à son degré de glycosylation.

2.3.b - Les différentes immunoglobulines

On définit neuf classes et sous-classes d'Ig : IgG₁₋₄, IgA₁₋₂, IgM, IgD et IgE. Les IgG sont les immunoglobulines majeures dans la circulation sanguine et représentent 80 % de toutes les Ig. De structure principalement monomérique, elles sont responsables de la neutralisation des virus et toxines bactériennes, en facilitant la phagocytose et la lyse bactérienne. Les IgA (15-20 % des Ig du sérum), essentiellement présentes sur les muqueuses, ont un rôle mécanique de fixation de l'Ag avant sa pénétration dans l'organisme et sont donc responsables de la résistance aux maladies des régions du corps qui communiquent directement avec l'environnement. Les IgM (10% des Ig totales), localisées dans le secteur vasculaire, sont les premiers Ac à être produits en cas d'invasion. Elles sont peu spécifiques et réagissent sous forme pentamérique sur tous les Ag en cas d'agression. Les IgE (à l'état de traces dans le sérum) sont dédiées aux allergies et causent des réponses violentes en défense aux entités qui causent habituellement l'asthme, l'urticaire, les rhinites... Les IgD, dont le rôle est méconnu, sont essentiellement fixées à la membrane des cellules. Les propriétés des Ig majeures sont résumées dans le tableau 1.2.

| Propriétés | IgG | IgM | IgA* |
|--|--------------|------------------|-----------------------|
| Poids moléculaire (Da) | 150 000 | 900 000 | 385 000 (170 000) |
| Demi-vie (jours) | 25 | 5 | (9) |
| Concentration dans le sérum adulte (mg/dl) | 1 000 | 100 | (250) |
| % des Ig totales | 80 | 6 | (130) |
| Proportion dans sérum (%) | 50-60 | 90 | 0 |
| Proportion dans fluides extracellulaires (%) | 40-50 | <10 | 0 |
| Proportion dans les sécrétions (%) | 0 | 0 | 100 |
| Fixation au complément | ++ | ++++ | 0 |
| Activité opsoninique | ++++ | + | 0 |
| Activité lytique | ++ | ++++ | 0 |
| Neutralisation virale | +++ | ++ | +++ |
| Transmission à la descendance | Via placenta | Pas de transfert | Par le colostrum/lait |
| * données pour IgA sécrétées ; données pour IgA sériques entre parenthèses | | | |

Tableau 1.2 : Propriétés des trois principales immunoglobulines.

3 – Méthode de détection des anticorps

3.1 - Le sérodiagnostic

Le diagnostic biologique des maladies infectieuses se base sur deux types d'études :

- la recherche de l'agent pathogène responsable dans les humeurs ou les tissus du malade ; c'est le diagnostic direct.
- la recherche de la réponse immunitaire spécifique de l'organisme à l'agent pathogène ; c'est le diagnostic indirect.

Il est ainsi possible d'identifier l'agent pathogène par un examen microscopique suivi d'une mise en culture. On peut également rechercher certaines structures propres à l'agent infectieux, comme des Ag fixés ou circulants, ou bien révéler la réaction immunitaire développée par l'hôte *via* la détection et le titrage des anticorps spécifiques apparus dans les humeurs, en particulier le sérum. On parle de sérodiagnostic dans ce dernier cas afin de détecter des infections à virus difficilement cultivables tels que la rubéole, l'hépatite (A, B, C ...), le virus d'Epstein Barr ou le HIV.

Afin de réaliser le sérodiagnostic, il faut disposer d'Ag viraux (ou des séquences peptidiques synthétiques comportant au moins un épitope) qui permettront la détection des Ac produits par l'organisme, et d'une technique de révélation telle que l'hémagglutination, l'immunofluorescence, les techniques radio-immunologiques, immuno-enzymatiques ou bien encore l'agglutination de particules de latex. On distingue tout d'abord les méthodes primaires qui sont indépendantes des phénomènes physiques et biochimiques provoqués *in vitro* par l'apparition du complexe. Les tests radio-immunologiques (RI), immuno-enzymatiques (ELISA et *immunoblot*) et d'immunofluorescence sont les techniques les plus utilisées. On trouve ensuite les méthodes secondaires dans lesquelles le complexe immun est révélé par des variations de propriétés physiques ou biochimiques. La précipitation en milieu gélifié et l'agglutination sont souvent appliquées à la détection d'Ac.

3.2 - Méthodes primaires

Dans les techniques d'immunomarquage, l'Ac est marqué par couplage à un isotope (^{125}I), à un composé fluorescent ou à une enzyme (phosphatase alcaline). La détection se fait en microscopie optique/UV ou au compteur à scintillation. Les méthodes d'immunomarquage sont les plus sensibles (du ng au pg par mL). Elles permettent par exemple de détecter les auto-anticorps dans le cas de maladies auto-immunes. Le principe consiste à plonger la préparation contenant l'Ag à mettre en évidence dans une solution contenant l'Ac dit primaire. Celui-ci se fixe de façon spécifique à l'Ag et peut être

directement porteur d'un marqueur (fluorophore ou enzyme) afin de détecter le complexe. Mais il existe une technique de détection secondaire plus sensible dans laquelle l'Ac primaire non marqué est reconnu à son tour par un Ac secondaire marqué (Fig. 1.4).

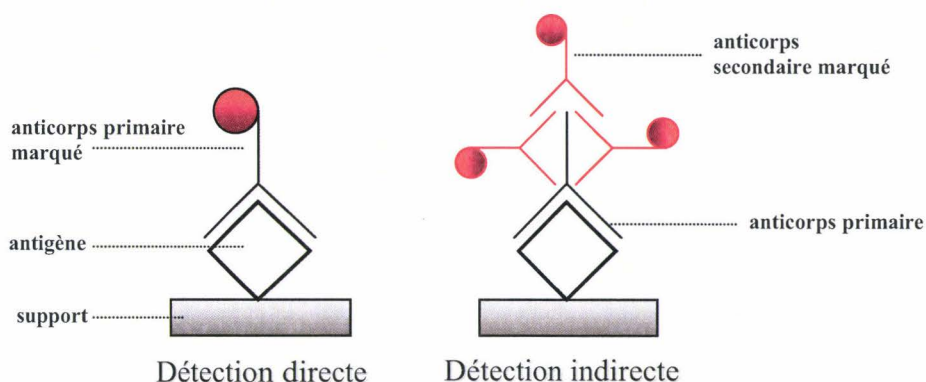


Figure 1.4 : Techniques d'immunodétection directe et indirecte.

L'antigène porte plusieurs anticorps primaires qui sont eux-mêmes reconnus par plusieurs anticorps secondaires. Le signal est donc amplifié à chaque niveau. De plus, il est possible de faire varier les marqueurs portés par l'anticorps secondaire sur une même analyse en fonction des besoins.

Les techniques d'immunodosage par compétition utilisent un Ac spécifique pouvant être couplé à une phase solide et un Ag purifié marqué soit à l'iode 125 (RIA pour *radio immunoassay*), soit couplé à une enzyme (ELISA pour *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Dans les tests d'immunofluorescence, le marqueur est un Ac couplé à un fluorochrome. Ce dernier est capable, après avoir reçu un rayonnement incident de longueur d'onde précise, de réémettre après la relaxe électronique une radiation de longueur d'onde supérieure.

L'ELISA, initiée en 1971 pour des analyses quantitatives d'IgG, est la technique la plus utilisée pour les dosages immunologiques d'Ac [Engvall, 1971]. L'Ag est tout d'abord incubé dans une microplaque plastique, le plus souvent au format 96 puits. L'Ag s'adsorbe sur la surface puis l'excès d'Ag libre est évacué par lavage. Les puits sont saturés par ajout d'une protéine étrangère chargée de bloquer toute fixation non spécifique ultérieure avant ajout du sérum. Si le sérum contient les Ac spécifiques de l'Ag adsorbé, l'interaction est révélée par un anticorps secondaire couplé à une enzyme telle que la peroxydase (Fig. 1.5).

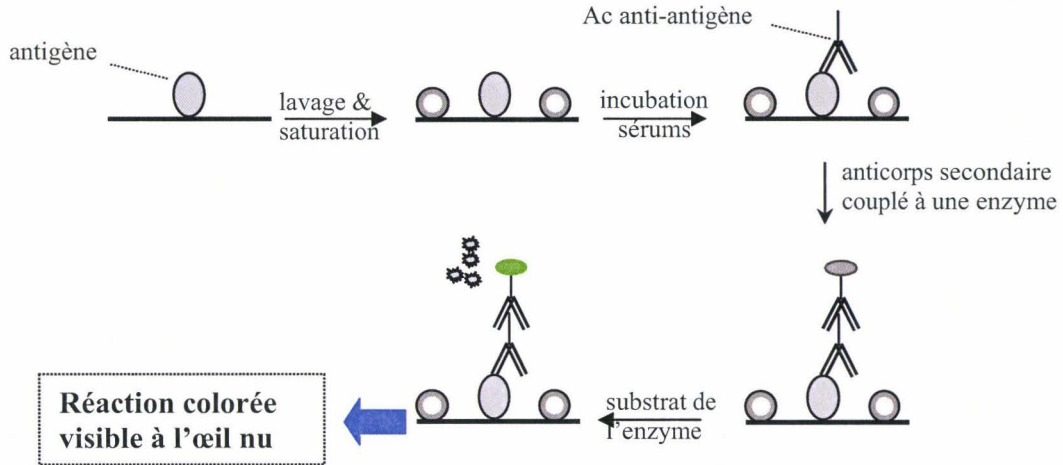


Figure 1. 5 : Principe de la détection par ELISA.

L'ajout d'un chromogène (ortho phénylène diamine par exemple), molécule incolore activée par l'enzyme, produit une réaction colorée après oxydation de la peroxydase par le peroxyde d'hydrogène présent dans le tampon de dilution du substrat. La concentration en Ac est déterminée à partir de la mesure de la densité optique des puits. Cette technique, considérée comme étant la plus sensible, permet de détecter de 1 à 50 ng/L d'Ac spécifique.

Le Western Blot (Fig. 1.6) permet de confirmer un ELISA pour la recherche d'Ac dirigé contre une protéine spécifique d'un virus, d'une bactérie ...

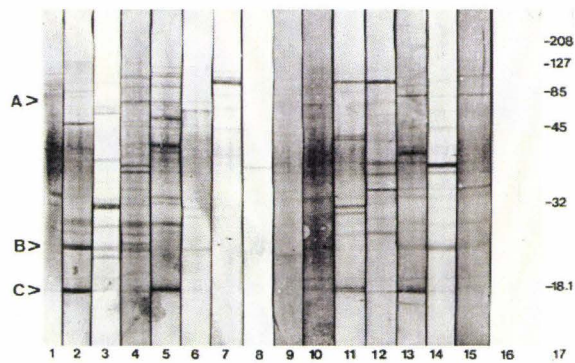


Figure 1. 6 : Détection par Western Blot (membrane PVDF) de la mycobactérie *Mycobacterium marinum* au sein de 16 séra humains [Blackwell, 2000].

Lignes 1 à 15 : Patients. Ligne 16 : Témoin sain. Ligne 17 : Marqueur de poids moléculaire. Trois antigènes classés par masse A, B et C sont mis en évidence.

Après la lyse des organismes pathogènes, les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel d'agarose dans lequel elles vont migrer en fonction de leur poids

moléculaire. Les protéines séparées sont transférées sur une feuille de nitrocellulose découpée en bandelettes. Chaque bandelette est ensuite mise en contact avec le sérum à contrôler. Si celui-ci contient des anticorps spécifiques dirigés contre l'agent pathogène, ces anticorps se fixent aux antigènes avant d'être révélés par un anticorps secondaire spécifique marqué.

Enfin, la radio-immunologie, ou RIA pour *Radio Immuno Assay*, est basée sur l'utilisation d'un marqueur radioactif mais est de moins en moins utilisée en raison des déchets générés.

3.3 - Méthodes secondaires

La réaction d'agglutination met en présence des Ag et un antisérum contenant des Ac spécifiques agglutinants. Elle est appliquée à la détermination de groupes sanguins, la détection de facteurs rhumatoïdes ainsi qu'à la recherche d'Ac dans les hématies ou le sérum de patients et enfin la recherche d'Ag dans les fluides biologiques. L'agglutination se produit quand on met en présence un Ag particulaire (bactéries, globules rouges,...) avec l'Ac correspondant. Cette réaction est rapide (quelques minutes) et visible à l'oeil nu (Fig. 1.7).

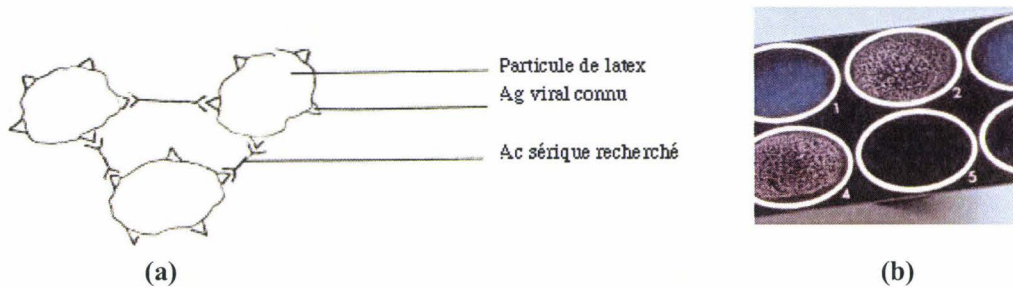


Figure 1.7 : Détection par agglutination.

(a) Principe du test appliqué au sérodiagnostic. (b) Exemple de lame-test utilisée notamment pour la détection de la tuberculose, pneumocoque, protéine A...

Cette réaction se fait en milieu liquide ou gélifié sur un temps variant de moins d'une heure à plusieurs jours.

3.4 - Limitations

A l'heure actuelle, le marché du sérodiagnostic est particulièrement attractif. L'immunologie infectieuse représente selon l'EDMA^c un marché d'environ un milliard d'euros par an. Cependant, l'industrie doit s'efforcer de réduire les coûts d'analyse médicale

^c European Diagnostic Manufacturers Association

tout en faisant face à l'augmentation du nombre de marqueurs viraux et parasitaires dont la détection est imposée par la loi. Dans le cadre du diagnostic, les techniques classiques d'immunodétection sont longues et coûteuses. Il faut réaliser un prélèvement, l'observer au microscope, faire sa mise en culture et identifier les agents pathogènes. La méthodologie référence ELISA ne permet actuellement de tester qu'un virus à la fois et nécessite un second contrôle dans le cas de patients positifs. En effet, l'observation de faux positifs n'est pas rare et le résultat doit être confirmé par Western Blot.

Face à ces problèmes, la recherche de nouveaux supports adaptés à la détection simultanée d'un plus grand nombre de marqueurs différents devient plus que jamais nécessaire afin d'abaisser le prix de revient. La technologie des biopuces apporte depuis quelques années une réponse en permettant de compacter sur une surface d'un cm² mille Ag différents : différents dépistages en parallèle deviennent possibles.

4 – La technologie des biopuces

La technologie des biopuces consiste à analyser des microspots (diamètre < 250µm) qui reposent sur l'interaction entre des sondes fixées sur une surface de quelques microns carrés et une cible en solution. Un tel dispositif est capable de détecter des analytes avec une meilleure sensibilité que les immunoanalyses macroscopiques en raison de la répartition uniforme des molécules fixées sur une faible surface : ces sondes seront présentées au milieu biologique avec une forte densité [Ekins, 1980; Ekins, 1991]. Les biopuces mettent en jeu des compétences en biologie, en microélectronique, en fonctionnalisation de surfaces (ancrage covalent), ainsi qu'en miniaturisation, analyse d'image et observation microscopique. Les domaines d'application couvrent de nombreux secteurs tels que la recherche biologique (génomique notamment), la recherche pharmaceutique, le génotypage, le diagnostic des pathologies [Cahill, 2001] ainsi que les contrôles agroalimentaires (traçabilité des OGM) et industriels.

L'essentiel consiste à disposer de sondes pertinentes pour chaque application. A l'origine, le terme de biopuce, breveté en 1988 par l'équipe du britannique Edwin Southern, reposait sur la propriété d'hybridation de l'ADN, donnant ainsi naissance aux biopuces à ADN [Maskos, 1992].

4.1– Les biopuces à ADN

Les puces à ADN sont un système miniaturisé comprenant une surface structurée de plastique (polypropylène, nylon), de verre ou de silicium, sur laquelle sont greffés des milliers de brins d'ADN de séquence connue, les sondes. Le principe repose sur la capacité

d'un simple brin d'ADN à pouvoir spécifiquement et spontanément reconnaître et former un complexe (duplex ou double hélice) avec le brin contenant une séquence complémentaire (Fig. 1.8). Ce principe, nommé par les biologistes hybridation, est utilisé pour détecter des gènes, microbes ou autres agents biologiques.

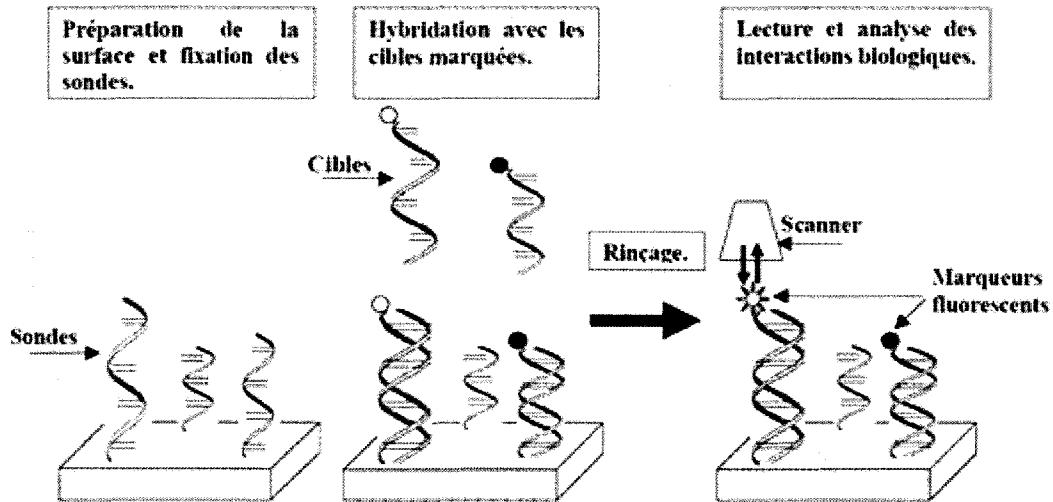


Figure 1. 8 : Principe des biopuces à ADN.

L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique, marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, permet de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles qu'il contient en une seule expérience. Ces différents stades exploitent des méthodologies issues de disciplines très diverses. Certaines relèvent des sciences chimiques, comme la chimie et l'électrochimie des surfaces, de la biochimie de synthèse des séquences d'ODN et de la transduction électrochimique.

Les gains de temps et d'efficacité liés à l'utilisation des biopuces reposent sur la réalisation simultanée de quelques centaines à plusieurs milliers d'analyses. Sur une seule biopuce d'un centimètre carré, il est possible de placer plusieurs dizaines de milliers de sondes différentes. La densité, c'est-à-dire la concentration en sondes à la surface d'un spot, varie de 10^{10} à 10^{13} molécules/cm². A titre comparatif, les systèmes de microplaque des biologistes permettent de 96 à 384 analyses. Les possibilités de criblage sont intéressantes : détecter les virus ou autres polluants organiques dans l'eau potable, rechercher des gènes spécifiques dans le corps humain, identifier les gènes impliqués dans l'efficacité d'un médicament, cribler des chimiothèques rapidement...

Une des applications principales permet d’obtenir une mesure relative du niveau d’expression des gènes dans un échantillon cellulaire par rapport à un témoin de référence (Fig. 1.9). Le principe consiste à extraire l’ensemble des ARN messagers (ARNm) des prélèvements de cultures cellulaires. Une transcription inverse est ensuite réalisée pour d’obtenir des ADN complémentaires (ADNc) simple brin couplés à un marqueur fluorescent représentatif de chaque culture : l’une est marquée par un fluorochrome Cy3 (émission dans le vert), l’autre par le Cy5 (émission dans le rouge). Les ADNc sont enfin déposés simultanément sur une puce préalablement imprimée par un ensemble de séquences sondes. Les brins d’ADNc marqués vont s’apparier avec les brins de séquence complémentaire fixés à la surface. La mesure de l’intensité du signal fluorescent émis sur chaque spot permet d’estimer le taux d’expression différentiel du gène correspondant. Ces biopuces sont donc un profil des gènes actifs ou inactifs à un moment donné dans un type cellulaire particulier. Il est ainsi possible de comparer une souche mutée à une souche sauvage ou bien des cellules cultivées dans deux conditions différentes [Chon, 2005; Hiyama, 2003].

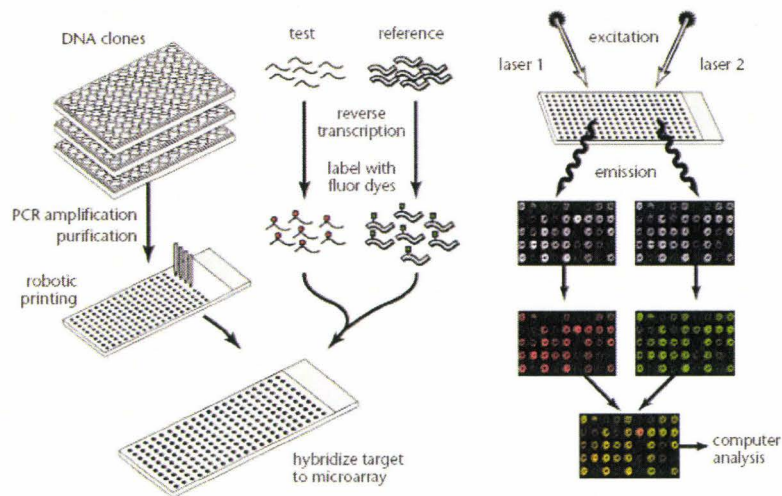


Figure 1. 9 : Principe de la biopuce à ADNc [Duggan, 1999].

Les séquences génomiques complètes de nombreux organismes, dont le génome humain depuis 2003, sont désormais connues. La technologie des biopuces trouve donc de nombreuses applications dans la caractérisation de la fonction des gènes et de leurs voies de régulation.

4.2 – Les biopuces à peptides

Depuis quelques années, la technologie des biopuces à peptides [Emili, 2000; Fodor, 1991] et protéines [Irving, 2000; MacBeath, 2000] a trouvé des applications dans les domaines de la recherche fondamentale, du diagnostic et de la découverte de drogues. Celle-ci a été utilisée afin d'analyser des interactions Ac-Ag, protéines-protéines, protéines-acides nucléiques et protéines-polysaccharides.

Dans le domaine diagnostic, les biopuces à protéines sont appliquées à la détection d'Ag et Ac dans des échantillons sanguins et également dans l'étude du profil sérique pour découvrir de nouveaux marqueurs de maladies. Une des applications est la caractérisation du profil immunitaire (ou *immunoprofiling*, voir fig. 1.10) de séra issus de patients atteints de maladies auto-immunes. Dans ce but ont été conçues des biopuces comprenant 196 biomolécules, dont des protéines, peptides, enzymes, complexes ribonucléoprotéiques, ADN et Ag modifiés [Robinson, 2002].



Figure 1. 10 : Image en fluorescence d'une biopuce permettant le criblage d'auto-anticorps chez des patients atteints de maladies auto-immunes [Robinson, 2002]. Les auto-anticorps issus de séra de patients infectés se fixent sur les antigènes spécifiques Ro52 (carré jaune) et sur l'ADN double hélice dsDNA (carré rose).

Par la suite, huit maladies auto-immunes humaines ont été caractérisées à partir de sérums humains. Alternativement, Joos et coll. ont généré des biopuces à protéines par immobilisation de 18 auto-antigènes connus communément utilisés en tant que marqueurs biologiques dans les maladies auto-immunes. Le criblage de 25 séra issus de patients infectés a révélé une détection spécifique et sensible des Ac et a ainsi montré que des quantités inférieures à 40 femtogrammes d'une protéine standard connue pouvait être détectée avec peu ou pas de réactivité croisée envers les protéines non spécifiques [Joos, 2000].

Concernant les études oncologiques, les séra et plasmas de patients souffrant de divers cancers (gastrique [Gulmann, 2003], poumon [Guo, 2005], sein [Hudelist, 2004]) ont été criblés. Ce type de recherche a mené à l'identification de nouveaux biomarqueurs potentiels et au *profiling* de cellules cancéreuses [Quinn, 2005]. Une puce à Ac a par exemple été réalisée pour la détection des marqueurs tumoraux du cancer de la prostate à partir du sérum. Il s'est avéré que cette puce était de sensibilité et spécificité supérieures aux tests ELISA classiques [Miller, 2003].

Par ailleurs, 94 molécules allergènes purifiées (protéine, peptides et petites molécules) ont été déposées sur lames de verre afin de miniaturiser les tests d'allergie. La détection repose sur l'affinité entre les sondes allergènes et les IgE allergène-spécifique (voir fig.1.11) contenues dans le sérum de patients préalablement sensibilisés aux sources allergisantes [Jahn-Schmid, 2003].

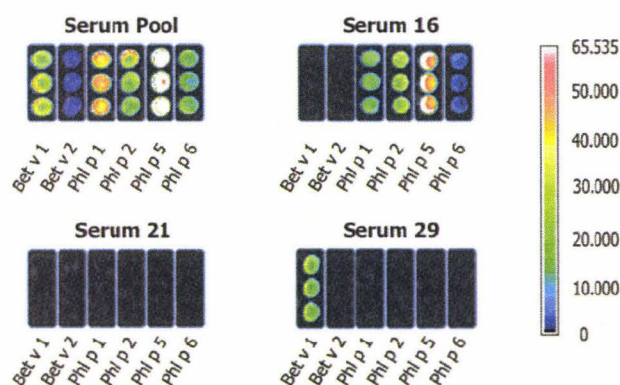


Figure 1. 11 : Exemple de détection par fluorescence de sondes allergènes (pollen, venin...) immobilisées sur lame de verre puis incubées avec du sérum humain et un antigène secondaire anti-IgE humain fluorescent [Jahn-Schmid, 2003].

Les publications les plus récentes proposent l'intégration des puces à ADN dans les protocoles des essais cliniques afin de guider le médecin dans le choix de la thérapie la mieux adaptée à son patient [Robison, 2004; Wulfkuhle, 2004]. Cependant, cette technique souffre de limitations comme l'obtention des biomolécules, la conservation de la fonctionnalité des protéines durant l'immobilisation, la sensibilité relative et enfin un coût élevé.

5 –Les propriétés conductrices des molécules synthétiques

Notre étude met en jeu les propriétés de conduction du courant à travers des molécules biologiques. Or, à une échelle de mesure nanométrique, de nouvelles lois de comportement de la matière apparaissent. Celles-ci font intervenir des effets quantiques,

des effets de confinement et l'importance des surfaces d'échange. Ces effets, cruciaux dans notre étude, ont tout d'abord été décrits dans la littérature en réalisant des composants électroniques actifs (diode, transistor...) à partir de molécules synthétiques. Utiliser des entités nanométriques comme les molécules est en effet le moyen le plus logique de miniaturiser les composants. Les premières recherches dès 1970 ont semblé très prometteuses et l'invention du microscope à effet tunnel (STM pour *Scanning Tunneling Microscopy*) a permis la manipulation moléculaire et la démonstration de l'effet d'amplification avec une seule molécule en 1998 [Joachim, 1998]. Les propriétés conductrices de certaines molécules synthétiques sont décrites dans les paragraphes suivants.

5.1 - Les transistors

Le transistor^d est un composant de base des processeurs et agit comme un interrupteur de petite taille. Dans ce dispositif à trois bornes, le passage du courant entre les deux premières (le drain et la source) est contrôlé par une tension U_G appliquée sur la troisième (la grille). Dans l'exemple suivant (Fig. 1.12), quand U_G est nulle, le substrat chargé positivement agit comme une barrière et empêche les électrons d'aller de la source vers le drain. Par contre, quand U_G dépasse une tension de seuil U_{seuil} , les charges positives du substrat sont repoussées et il s'établit un canal de communication (chargé négativement) reliant la source au drain.

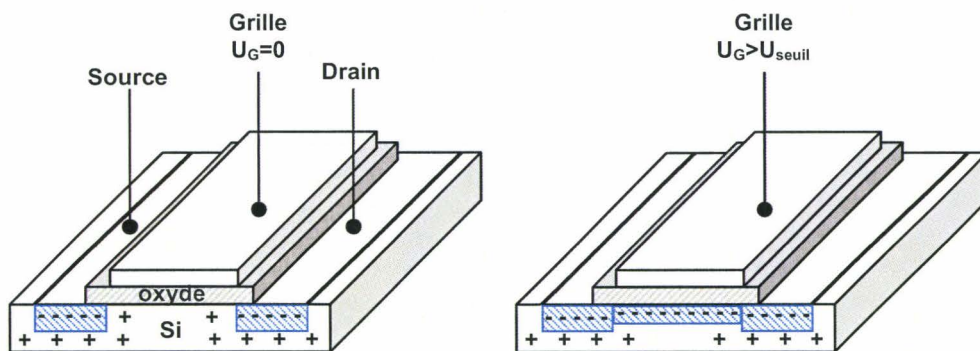


Figure 1. 12 : Schéma de principe d'un transistor MOS.

La plupart des transistors MOS (*Metal Oxide Semi-Conductor*) composant les circuits logiques sont aujourd'hui en silicium en raison de la qualité de l'interface entre le silicium et son oxyde SiO_2 qui sert d'isolant. Les transistors, de dimensions submicroniques dans les années 1980 [Hunter, 1981], atteindront dans la prochaine décennie des longueurs de porte de 10 nm [Jeong, 2004]. La distance drain-source caractéristique est

^d contraction de *transfer resistor*, résistance de transfert.

encore grande devant les atomes (0,1 nm) et les molécules (1 nm) mais tend à s'en rapprocher [Doris, 2002; Wong, 2005].

5.2 – Les molécules synthétiques conductrices organiques

Il est envisageable à terme qu'une simple molécule soit capable de jouer le rôle d'un transistor, d'une diode ou d'un fil conducteur. En 1974, le premier polymère conducteur (le polyacétylène) a été découvert [Chiang, 1978]. Vingt-cinq ans plus tard, Pioneer commercialise des écrans pour autoradio constitués de polymères conducteurs ayant la capacité d'émettre leur propre lumière lorsqu'ils sont parcourus par un courant. Par conséquent, le domaine de l'électronique moléculaire utilise aujourd'hui des dispositifs adaptés à l'échelle de la molécule. Le système envisagé peut être composé de couches assemblées (SAMs, *Self-Assembled Monolayers*), de macromolécules (protéine, ADN, nanotube) ou de molécules individuelles, afin de produire des composants à moindre coût en hybridant les techniques de la chimie organique avec les observations issues de la biologie et enfin les techniques de la microélectronique. L'idée de base est simple : il faut accéder aux propriétés individuelles d'une molécule en l'intégrant dans une structure adaptée pour mesurer ses propriétés électriques et électroniques. Ces dernières années, ce concept a donné naissance à deux classes de structures typiques: les redresseurs et les fils moléculaires.

5.2.a - Les redresseurs moléculaires

En 1974, Aviram et Ratner démontrent d'un point de vue théorique qu'une molécule portant un groupement donneur (D) et un groupement accepteur (A) d'électrons reliés par un pont moléculaire, se comporterait de manière équivalente à un redresseur de courant (le courant passe dans un seul sens) [Aviram, 1974].

Le principe est le suivant : la molécule D-A est immobilisée entre deux électrodes. Il existe une barrière énergétique entre cette molécule et les électrodes qui empêche *a priori* la conduction du courant. La structure énergétique du système (Fig. 1.13) montre que les orbitales moléculaires du groupe donneur sont de plus haute énergie par rapport au groupe accepteur. Dès lors, la conduction du courant n'est possible que si le donneur n'a pas une trop grande énergie d'ionisation I_d et l'accepteur une affinité électronique A_A trop faible. Dans ces conditions ($A_A < I_d$), sous l'effet d'une tension positive appliquée sur l'électrode M_1 , un électron peut être transféré depuis l'électrode M_2 vers la LUMO de l'accepteur pendant qu'un autre électron sera transporté de la HOMO du donneur vers M_1 . Cela conduit à un état excité de la molécule A^-D^+ avant le retour à l'état stable par

transfert intramoléculaire de la LUMO de l'accepteur vers la HOMO du donneur. L'effet de redressement du courant se fait donc préférentiellement de M_2 vers M_1 [Metzger, 2003].

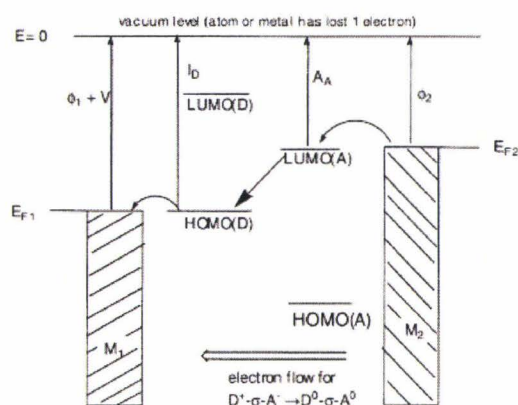


Figure 1. 13 : Principe de la conduction électronique d'une molécule D-A immobilisée entre deux électrodes M_1 et M_2 . E_{F1} et E_{F2} sont les niveaux de Fermi des électrodes. La LUMO est la première orbitale moléculaire vide d'électron, l'HOMO la dernière remplie.

La première molécule redresseur (voir structure sur la fig. 1.14) proposée était composée de tétrathiafulvalène (TTF) et tétracyanoquinodiméthane (TCNQ) connectés par un pont saturé. Ainsi, au sein d'un cristal alternant les blocs TTF et TCNQ, un transfert électronique a été observé depuis le donneur vers l'accepteur [Fraxedas, 2002].

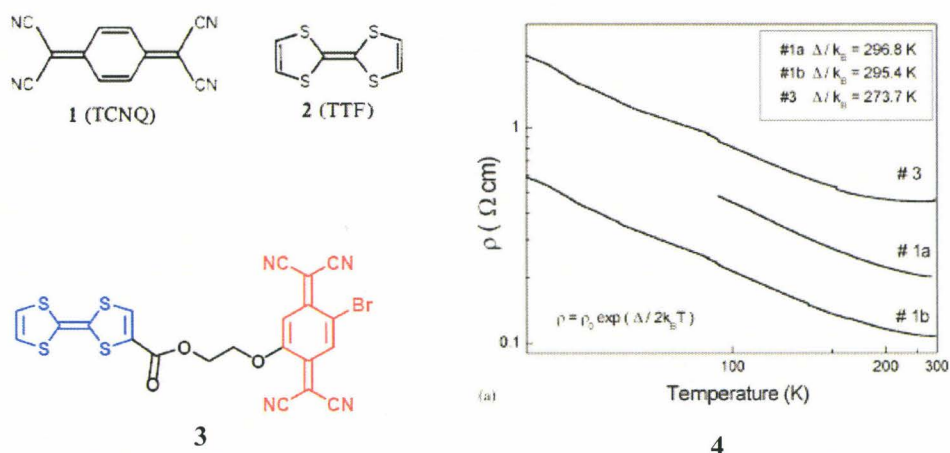


Figure 1. 14 : Un exemple de molécule *rectifier* TTF-TCNQ.

(1) & (2) Formules chimiques du TTF et TCNQ. (3) Exemple de molécule redresseur [Metzger, 2003]. (4) Mesure de la résistivité de plusieurs films TTF/TCNQ en fonction de la température. La résistivité décroît avec la température. Le courant mesuré est de $10 \mu\text{A}$ pour #1a et $0,1 \mu\text{A}$ pour #1b et #3 pour des conductivités respectives de 5, 9 et 2 S/cm [Fraxedas, 2002].

Un film de Langmuir-Blodgett, conçu à partir de la molécule $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{-}\gamma\text{Q3CNQ}$, permet un fort couplage électronique et donc un transfert de charge entre des électrodes en

argent [Scheib, 1998]. Ces propriétés particulières proviennent probablement du pont π entre les deux systèmes conjugués (donneur quinolinium et accepteur tyricyanoquinodiméthanide) de cette molécule (Fig. 1.15).

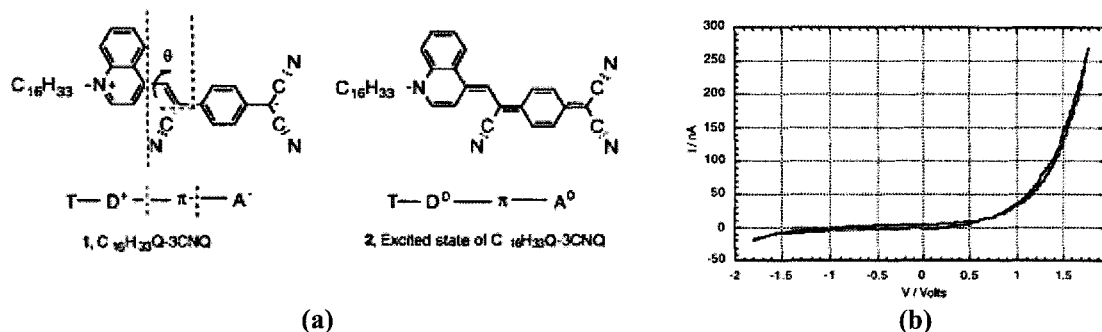


Figure 1. 15 : Propriétés de conduction de la molécule $C_{16}H_{33}-\gamma Q_3CNQ$.

(a) Structure de la molécule sous forme zwitterionique et excitée. (b) Courbe $I(V)$ d'un film de Langmuir-Blodgett de la molécule entre deux électrodes [Scheib, 1998].

5.2.b - Les fils moléculaires

Les fils moléculaires sont des molécules individuelles susceptibles de conduire de faibles courants électriques selon une grande densité de charges (plusieurs trillions d'électrons par seconde sur une distance d'un nm^2) [Di Ventra, 2000; Emberly, 1998; Joachim, 1991]. Les familles de fils les plus prometteuses sont les alcanes conjugués, les oligomères porphyriniques, les nanotubes de carbone et l'ADN.

En théorie, le fil fournit un chemin pour les électrons depuis un réservoir à un autre bien plus efficace que le transport des électrons dans l'espace. La quantification des propriétés d'un fil est réalisée selon différentes voies qui dépendent souvent des techniques utilisées pour analyser ces propriétés : par jonction cassée [Kergueris, 1999], par nanopores [Zhou, 1997], par contact métal-film-métal [Ram, 1997] et enfin par *conducting*-AFM [Wold, 2001] et STM [Grill, 2005].

La première expérience visant à mesurer le courant au travers d'une molécule a été réalisée à l'aide d'une pointe STM (*Scanning Tunneling Microscopy*). Les mesures sont basées sur une pointe métallique de rayon inférieur à 1 nm approchée à une distance de quelques angströms d'une surface conductrice afin d'assurer le recouvrement des fonctions d'ondes (Fig. 1.16). L'application d'une différence de potentiel crée un courant tunnel (de l'ordre du nA) mesurable.

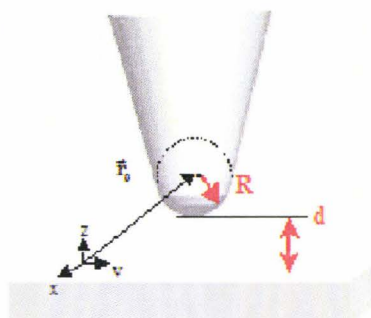


Figure 1. 16 : Principe de la mesure I(V) via une pointe STM ou AFM. R est le rayon de courbure de la pointe et d la distance pointe-échantillon.

La molécule étudiée dans la figure 1.17 est un fullerène (ou C₆₀) qui se présente sous la forme de sphères constituées d'atomes de carbone dont l'état d'hybridation est intermédiaire entre sp^2 et sp^3 . Le fullerène est immobilisé sur une surface d'or (voir fig. 1.17) avant de venir positionner une pointe STM au-dessus de la molécule [Joachim, 1995]. Le courant observé est proportionnel à la tension : un tel régime est dit ohmique. La conductivité de la molécule a été évaluée à 4 S.cm^{-1} . A titre de comparaison, la conductivité d'un film auto-assemblé formé d'octadécyltrichlorosilane, molécule fortement apolaire et non conjuguée, est de $10^{-15} \text{ S.cm}^{-1}$ [Boulas, 1996]. Cependant, de telles mesures de courant sont très dépendantes de la résistance du système et donc de la distance entre la pointe STM et la surface.

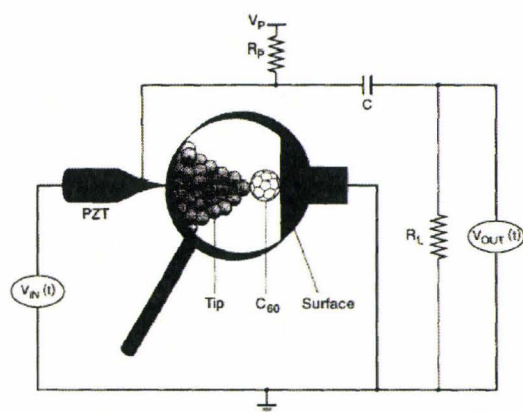


Figure 1. 17 : Dispositif d'étude des propriétés électrochimiques d'une molécule de fullerène connectée à une pointe STM et une surface Cu(111) [Joachim, 1995]. La tension appliquée V_{IN} est actionnée par un transducteur piézo-électrique (PZT).

Sur cette base, un courant a été mesuré en positionnant entre deux contacts en or séparés de quelques nanomètres (réalisés par la méthode des jonctions cassées) une molécule de 1,4-dithiol benzène HS-C₆H₄-SH (DTB) [Reed, 1997]. Le contact est réalisé via des liaisons covalentes entre les groupements thiols et le métal (Fig. 1.18). Ici, le

Le courant est proportionnel à la tension appliquée pour des voltages supérieurs à 1 V. Entre -1 et 1 V se produit par contre un palier où le courant est nul. En assimilant cette tendance à un régime ohmique, la conductivité est d'environ 8 S.cm^{-1} . De tels résultats montrent qu'une molécule peut effectivement conduire le courant et ce sans dégradation de la molécule par dissipation d'énergie.

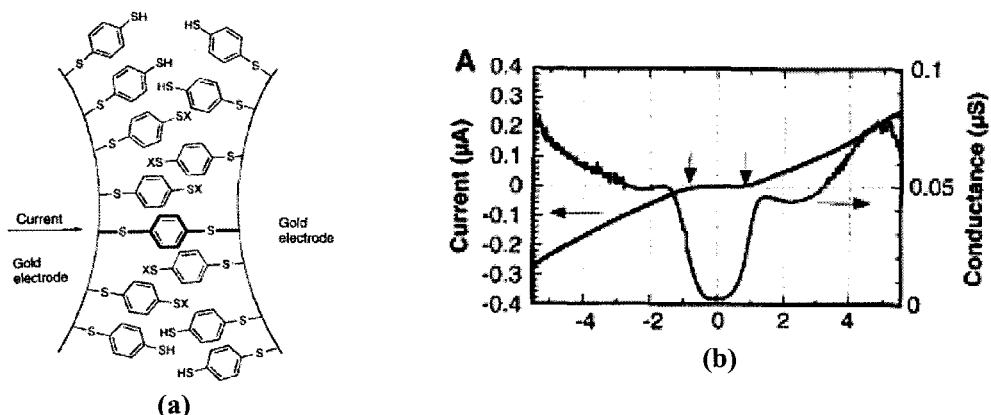


Figure 1.18 : Mesure du courant sur un dérivé du DTB [Reed, 1997]. (a) Immobilisation du 1,4-dithiol benzène entre deux électrodes en or. (b) Courbe caractéristique du courant et de la conductance en fonction de la tension appliquée.

Les molécules conjuguées comprenant des liaisons simples alternées avec des doubles (ou triples) liaisons carbone-carbone peuvent conduire les électrons à travers leur système π . Le fil doit être linéaire pour enjamber l'espace (ou gap) entre les deux composants du circuit. Ainsi, des mesures par STM ont permis de mesurer la conductivité d'un fil moléculaire de 4-(2'-éthyl-4'-(phényléthynyl)phénylthiynyl)-1-phénylthiolate incorporé dans une monocouche auto-assemblée composée de dodécane-thiol $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{SH}$. Le courant est plus important quand la pointe se place au-dessus du phénylthiolate, ce qui prouve qu'une molécule π est plus à même de conduire le courant qu'une molécule σ [Bumm, 1996].

En dernier lieu, les nanotubes de carbone constituent un exemple récent de nouvelles nanostructures aux propriétés électriques intéressantes et dont les applications potentielles sont nombreuses : renfort de composites, réservoirs d'hydrogène, composants électroniques, muscles artificiels... Les nanotubes sont obtenus par évaporation de carbone avec un arc électrique dans une atmosphère d'hélium. Ces structures (Fig. 1.19) peuvent être vues comme des cylindres graphitiques composés d'hexagones carbonés dont le diamètre est de l'ordre du nanomètre et la longueur de l'ordre du micron ou plus (soit jusqu'à 100 000 fois le diamètre environ).

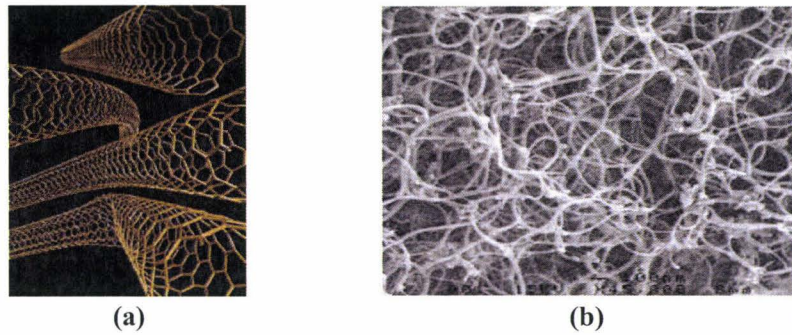


Figure 1.19 : Structure d'un nanotube de carbone. (a) représentation en perspective. (b) Image en microscopie électronique à balayage de nanotubes bruts après synthèse (échelle $5 \times 4 \mu\text{m}^2$).

Il existe des nanotubes à simple paroi (SWNT pour *Single-Walled Nanotubes*) et multi-parois (MWNT pour *Multi-Walled Nanotubes*), dont l'épaisseur peut varier de 2 à 50 couches. Cependant, la synthèse des nanotubes ne permet pas de croissance et d'assemblage sélectifs, d'où une grande difficulté afin d'obtenir des diamètres constants et une dispersion des caractéristiques électriques comme la conductivité [Fuhrer, 2000]. Entre deux nanoélectrodes métalliques, la conductivité d'un nanotube est de 90 S.cm^{-1} [Avouris, 1999; Tans, 1997] (Fig. 1.20).

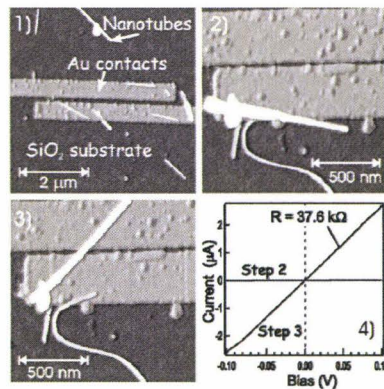


Figure 1.20 : Conductivité d'un NT entre deux électrodes métalliques[Avouris, 1999].

(1) Image AFM après dépôt de MWNT longs de $1 \mu\text{m}$ environ sur un couple d'électrodes en or. Les courbes $I(V)$ sont mesurées quand le NT recouvre partiellement une électrode (2) et quand il établit un contact entre les deux pistes (3). La résistance est évaluée à $38 \text{ k}\Omega$.

Les SWNTs peuvent constituer d'excellents fils au sein de nanosystèmes sous réserve d'être reliés à des dispositifs fins. De par leur structure solide (dix fois plus que l'acier) et rigide (certains sont plus durs que le diamant), ils ont une faible résistance et il est possible d'orienter leur conductance en changeant le diamètre du cylindre et son hélicité.

Une présentation non exhaustive des mesures réalisées sur des molécules synthétiques est donnée dans le tableau 1.3.


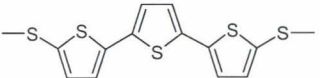
| | Tension appliquée (V) | Courant mesuré (nA) | Longueur de la molécule (nm) | Résistance (mΩ) | Conductivité (S.cm ⁻¹) | Référence |
|--|-----------------------|---------------------|------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|
| Fullerène | 0,2 | 40 | ~0,7 | 5 | ~4 | [Joachim, 1995] |
| 1,4-dithiol benzène  | 5 | 225 | ~0,85 | 22 | ~8 | [Reed, 1997] |
| 2,5''-bis(acéthylthio)-5,2',5',2''-terthiényl  | 2 | 100 | ~1,9 | 20 | ~4 à 40 | [Kergueris, 1999] |
| Nanotube de carbone | 0,005 | 1 | 140 | 5 | ~90 | [Tans, 1997] |
| Octadécyltrichlorosilane CH ₃ (CH ₂) ₁₇ SiCl ₃ | 1 | 10 ⁻²³ | 2,5 | ~10 ¹⁷ | ~10 ⁻¹⁵ | [Boulas, 1996] |

Tableau 1.3 : Propriétés électriques de molécules connectées entre des nanoélectrodes.

Néanmoins, les propriétés conductrices de ces molécules synthétiques sont confinées au domaine de l'électronique pure. Les applications potentielles en diagnostic sont limitées en raison du manque de site d'accroche pour des biomolécules d'intérêt. La démarche logique consiste donc à intégrer des molécules telles l'ADN et les protéines au sein de dispositifs permettant l'étude de leurs propriétés électriques.

6 - Une nouvelle génération de capteurs

En alternative aux méthodes d'immunodétection classiques (fluorescence, radioactivité), des chercheurs ont proposé des techniques de détection directe pour complexes immuns basés sur des appareils piézoélectriques [Halamek, 2005; Suleiman, 1994], optiques [Kerslake, 1996; Yang, 1999] ou électrochimiques [Lakard, 2004; Phadke, 1992]. De telles techniques accompagnent depuis quelques années l'apparition d'une nouvelle génération d'appareils voués à la détection biologique : les biocapteurs.

6.1 - Les biocapteurs

Un biocapteur est un appareil composé d'un récepteur (par exemple un Ac, une enzyme, protéine, acide nucléique, cellule, tissus) impliqué dans la reconnaissance d'un

analyte, et d'un transducteur de signal. Quand l'analyte interagit avec le biorécepteur, le complexe résultant produit un changement qui est converti en un effet mesurable (signal électrique...) par le transducteur. Les méthodes transductionnelles principales sont optiques (luminosité, absorption, résonance des plasmons de surface...), sensibles à la masse (vague acoustique de surface, microcantilever, microbalance...), et enfin électrochimiques (potentiométriques, ampérométriques...).

Utiliser de tels capteurs sur des organismes biologiques ou récepteurs ayant été modélisés permet de créer de nouvelles analyses biochimiques possédant la haute sélectivité des systèmes de reconnaissance biologique. Nous nous intéressons plus particulièrement à l'application de ces technologies pour la détection d'agents pathogènes et le diagnostic médical *via* une détection électrique.

6.2 - Un concept nouveau de transduction : la détection électrique

La plupart des appareils récents se basent sur des transductions optiques du phénomène d'hybridation. Cependant, les premiers biocapteurs à ADN [Briggs, 1989; Downs, 1988], basés sur la conversion d'une reconnaissance des paires de bases complémentaires en un signal électrique, sont bien moins coûteux et compatibles avec les performances déjà bien acquises des *microarrays*. Une telle technique alternative consiste donc à mesurer une variation de signal électronique quand l'interaction étudiée est formée. Il est ainsi possible de s'affranchir de tout agent marqueur en ne jouant que sur la détection d'un changement des propriétés inhérentes à l'analyte avant et après hybridation.

6.2.a – Transport de charge dans l'ADN

L'idée que la double hélice d'ADN, porteuse de l'information génétique, puisse favoriser le transport électronique le long des paires de bases a été avancée pour la première fois en 1962 [Eley, 1962]. Les propriétés d'auto-organisation de l'ADN en font un candidat idéal dans l'optique d'une étude dans le domaine de l'électronique moléculaire : la structure hélicoïdale permet la construction d'assemblages moléculaires et l'empilement des paires de bases favorise le recouvrement des orbitales et donc, en toute hypothèse, le transfert électronique. En réalité, il existe une vraie controverse concernant le comportement électrique et les mécanismes qui peuvent contrôler la mobilité de charge dans la structure de l'ADN.

L'archétype des travaux concernant des mesures directes sur l'ADN est le suivant (Fig. 1.21) : immobiliser entre deux électrodes métalliques (ou bien une électrode et une pointe AFM) la molécule, appliquer une tension puis mesurer le courant.

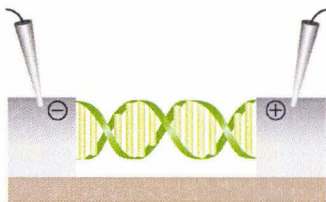


Figure 1. 21 : Approche expérimentale des mesures électriques sur l’ADN

Les premières études ont impliqué des mesures physiques de courant à travers des fibres d’ADN. Les résultats correspondants suggéraient aussi bien un caractère semi-conducteur qu’une nature purement métallique [Okahata, 1998]. Des études complémentaires, dans lesquelles la séquence de l’ADN, le type de substrat, la distance inter-électrodes ainsi que les matériaux de contact variaient, ont conclu qu’il n’y avait aucune évidence dans une quelconque conductivité électronique des molécules d’ADN [Bezryadin, 1997]. Inversement, un transport électrique a été mesuré (voir fig. 1.22) à travers des molécules poly(dG)-poly(dC) de 10,4 nm de longueur piégées électrostatiquement entre deux électrodes de platine [Porath, 2000].

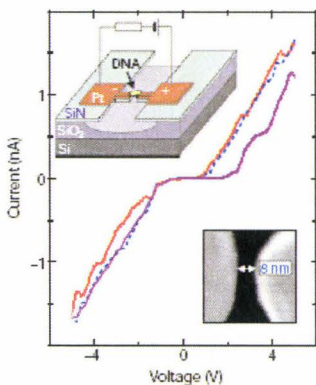


Figure 1. 22 : Courbes I(V) de molécules d’ADN poly(G) et poly(C) de 10,4 nm de long immobilisées entre des électrodes métalliques [Porath, 2000]. Les courbes adoptent un comportement ohmique similaire.

Des expériences additionnelles portant sur des molécules d’ADN de taille plus importante (> 40 nm) étirées entre des électrodes planaires, n’ont permis d’observer aucun courant. Les auteurs ont ainsi déduit que le transport de charge à travers des molécules d’ADN au-delà de 40 nm, était bloqué [Storm, 2001].

Il apparaît finalement que l’ADN peut constituer un isolant, un bon conducteur ou un semi-conducteur en fonction de sa séquence et des conditions expérimentales, dont certaines sont reportées ci-après.

- Il est nécessaire de contacter les molécules, ce qui suppose un contrôle nanométrique des dépôts et de la dimension des connecteurs. Ainsi, la force du couplage électrique entre un brin d'ADN et les électrodes de contact déterminera si un blocage coulombien (faible couplage) ou un mélange des états énergétiques (fort couplage) est mesuré. De plus, la différence entre un semi-conducteur large bande et un isolant s'avère seulement quantitative en terme de résistivité. Par exemple, si nous appliquons un voltage à travers un polymère et induisons un transport de charge interne sans changer la structure polymérique et ses propriétés de manière irréversible, le système sera considéré comme semi-conducteur. Par contre, si la structure est dégradée de manière permanente ou modifiée suite à l'application du voltage, le système devient isolant.

- La température joue également un rôle. On observe une chute brutale de la conductivité (3 décades) quand la température passe au-dessus de 75°C. Un retour à température ambiante permet de retrouver le courant initial [Nakayama, 2001].

- La nature même de l'ADN influence fortement la conduction : un empilement maîtrisé des paires de base est une condition *sine qua non* pour le transfert électronique. Ainsi, le désappariement d'une seule paire de base dans la molécule d'ADN la rend isolante [Kelley, 1999].

- Certaines mesures sont controversées car fortement dépendante de l'humidité ambiante. Dans le cas d'une forte humidité, un modèle de conduction ionique causé par une couche microscopique d'eau et d'ions en surface et dans l'ADN, peut entrer en jeu. Mais ceci ne constitue pas la seule explication car la forme de l'ADN est sensible au taux d'humidité, ce qui pourrait avoir comme effet un changement de conduction au fur et à mesure d'un changement de géométrie spatiale [Gu, 2002].

6.2.b – Amplification du signal par des nanoparticules

Park et coll. ont développé en 2002 une technique alternative de détection mettant en jeu des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des oligonucléotides et des nanoélectrodes interdigitées [Park, 2002]. Les sondes sont immobilisées dans le gap entre les électrodes. L'hybridation permet de localiser les nanoparticules dans le gap et mène, après une précipitation d'argent, à un signal de conductivité mesurable. Une telle interaction, associée au changement de résistance intra-gap, permet une limite de sensibilité à 0,5 pM.

Une expérience plus récente s'affranchit de la précipitation du sel d'argent en hybridant un simple brin d'ADN sur une monocouche d'or immobilisée entre des électrodes espacées de 300 nm, avec un brin complémentaire (voir fig. 1.23) dérivé par un groupement thiol [Cheng, 2005]. Ce dernier forme un lien covalent avec de nouvelles

particules d'or, ce qui permet d'observer un courant entre -1 et 1 V de nature ohmique et de l'ordre du nanoampère (Fig. 1.24).

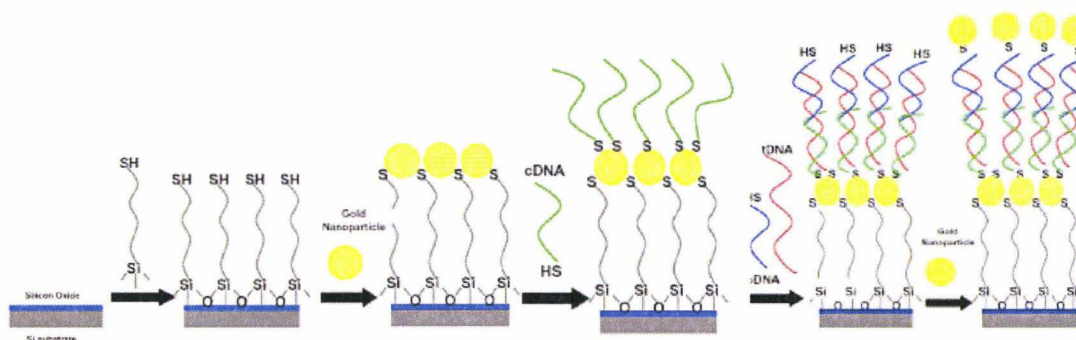


Figure 1. 23 : Principe de la détection électrique de l'ADN par un autoassemblage de particules d'or[Cheng, 2005].

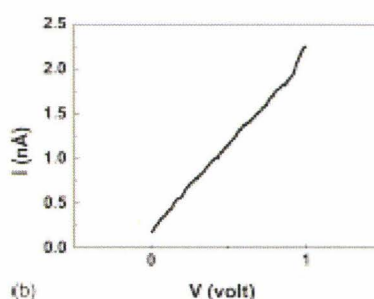


Figure 1. 24 : Courbe I(V) caractéristique pour un nanogap de 350 nm.

Les détections électrochimiques basées sur des hybridations nucléiques peuvent être amplifiées par la présence de nanoparticules. Ainsi, le marquage de l'ADN par des nanoparticules permet une meilleure discrimination (sélectivité) et une plus grande sensibilité de la détection, par rapport à l'utilisation commune des fluorophores.

6.2.c - Détection électrique d'interactions polypeptidiques

La détection d'une interaction de type Ac- Ag via une détection électrique simple a été observée en 1999 entre des microélectrodes. Des microbilles de latex recouvertes de protéine A (produite par le staphylocoque *Aureus*) sont collectées par électrophorèse dans le gap (Fig. 1.25). Un anticorps IgG dirigé spécifiquement contre cette protéine par son fragment Fc est lui-même ciblé par un Ac secondaire anti-IgG marqué par une nanoparticule d'or de 5 nm. Une dernière étape consiste à créer un précipité de sel d'argent ciblé sur les particules d'or, avec pour effet le court-circuit des électrodes. Une simple mesure de conductivité suffit à caractériser la double reconnaissance protéique [Velev, 1999].

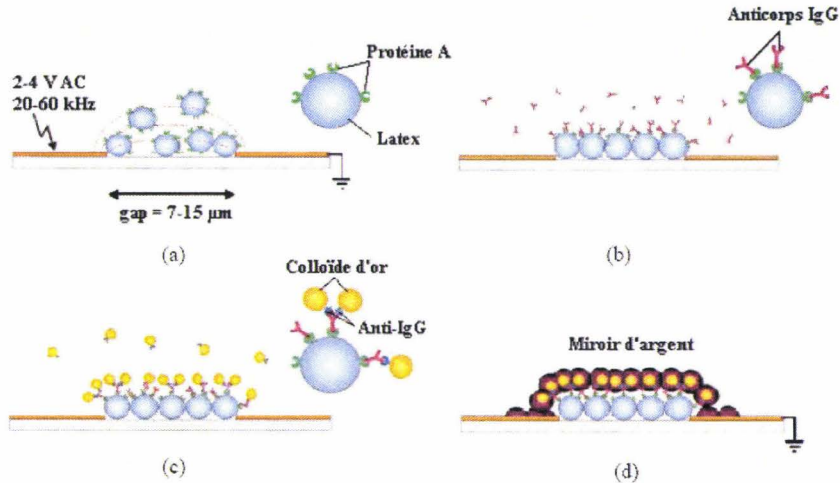


Figure 1.25 : Principe de la détection de l'interaction protéine A-IgG[Velev, 1999].

(a) Immobilisation de billes de latex couvertes de protéine A entre deux microélectrodes. (b) Incubation d'anticorps IgG captés par la protéine A. (c) Addition d'Ac anti-anticorps marqués à l'or colloïdal ($d \sim 5$ nm). (d) Observation d'un court-circuit entre les électrodes après formation d'un précipité d'argent catalysé par les nanoparticules d'or.

Plus récemment, une expérience similaire impliquant une détection directe a été réalisée sans avoir recours à un miroir d'argent. Un ligand unique, la biotine, est immobilisé entre un couple d'électrodes en or puis incubé avec deux sortes de récepteurs biologiques en solution (respectivement la streptavidine et l'Ac anti-biotine) marqués à l'or colloïdal[Haguet, 2004]. Dans les deux cas, une augmentation significative de la conductivité est observée (Fig. 1.26).

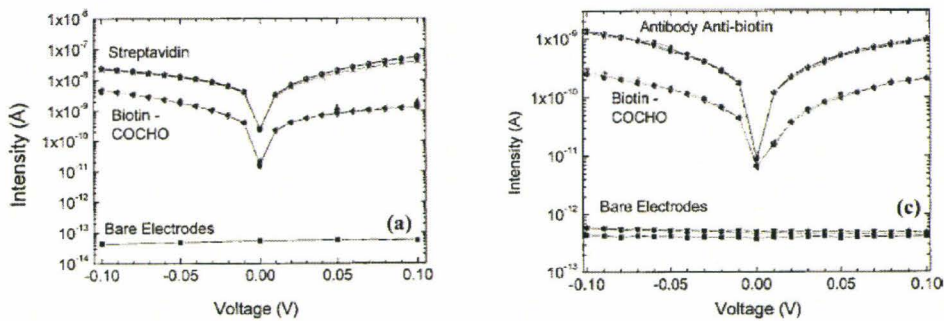


Figure 1.26 : Données $I(V)$ [Haguet, 2004] mesurées sur les électrodes nues (*bare*), après incubation du peptide biotinyllé (*biotin-COCHO*) puis avec (a) la streptavidine ou (c) un Ac anti-biotine marqués à l'or 25 nm.

7 – Présentation du projet

Les techniques actuelles de sérodiagnostic ne sont pas adaptées à la miniaturisation des supports pour la mise au point pratique de criblage à haut débit^e ou pour la conception de dispositifs portables. *A contrario*, la détection électrique est innovante et ne nécessite pas d'équipement spécial. Il est envisageable à terme de fabriquer un bloc de mesure intégré sur une biopuce, relié à un circuit d'amplification et de traitement de signal. Un dispositif de cette nature permettrait de concentrer un nombre important de mesures sur un seul échantillon tout en explorant une nouvelle méthode de détection. De plus, la détection électrique a déjà été employée avec succès afin de détecter des brins complémentaires d'ADN, mais reste peu utilisée dans le champ des peptides et protéines.

Le but de notre projet est la conception d'un dispositif permettant de détecter *via* un signal électrique une interaction spécifique de type ligand/récepteur au sein d'un milieu biologique complexe. Nous avons choisi l'interaction entre la protéine A et les immunoglobulines présentes dans le sérum humain. Ce modèle, détaillé dans le **chapitre IV**, est largement étudié dans la littérature. Cependant, un éventuel transfert électronique ne peut être réalisé sur les biomolécules seules. Une amplification est nécessaire et implique la reconnaissance du couple protéine A–IgG par un anticorps secondaire marqué par une nanoparticule métallique. Le rôle de la particule, généralement en or ou en argent, n'a pas encore été élucidé mais semble une condition requise pour observer un changement de conductivité du couple ligands-récepteur immobilisé.

Les impératifs du projet (Fig. 1.27) sont :

- la réalisation des électrodes (**a**).
- l'ancrage covalent et contrôlé de la protéine A sur le support (**b**).
- le suivi électrique de l'interaction spécifique avec les immunoglobulines G (**c**).
- l'incubation du complexe avec des anticorps spécifiques anti-humains marqués par des particules d'or (**d**).

^e ou HTS pour *High Throughput Screening*.

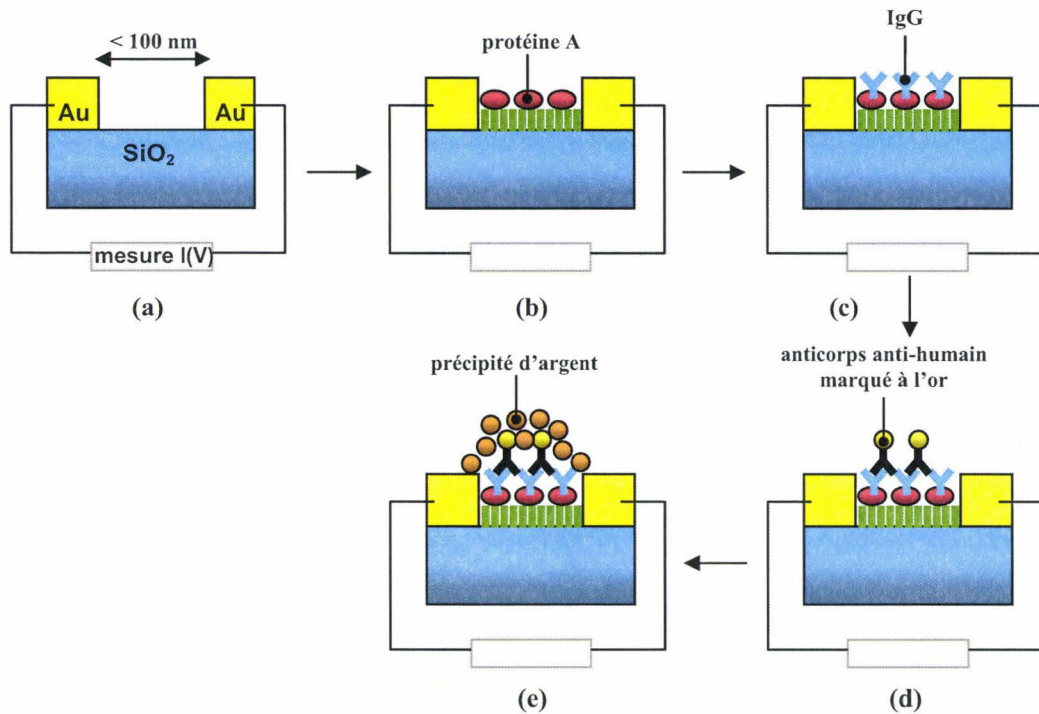


Figure 1.27 : Description générale du projet.

Ce mémoire est organisé de la façon suivante : le dépôt des biomolécules constitue le sujet du **chapitre III**. La réactivité d'un nanogap vis-à-vis des différents traitements chimiques de surface est étudiée à l'aide de techniques adaptées telles que la goniométrie, la microscopie à force chimique et la synthèse de nanoparticules fonctionnelles.

Deux approches sont ensuite envisagées. La première consiste à précipiter un sel d'argent sélectivement sur les nanoparticules métalliques (e). Un court-circuit est attendu et devrait logiquement se traduire par un changement de la conductivité du système. Cette méthode constitue le point de départ du sujet (**chapitre IV**). La seconde approche consiste à effectuer des mesures électriques sur un gap inférieur à 100 nanomètres dès l'étape (d). Nous nous intéressons cette fois-ci directement aux propriétés électriques des biomolécules (**chapitre V**).

Chapitre II - Techniques de microfabrication et d'analyse

| | |
|---|-----------|
| 1 - CONCEPTION DES ELECTRODES..... | 36 |
| 1.1 - PRINCIPE DE LA DEFINITION DES MOTIFS..... | 36 |
| 1.2 - L'OXYDATION THERMIQUE | 37 |
| 1.3 - LA PREPARATION DE SURFACE..... | 38 |
| 1.3.a - Plasma | 39 |
| 1.3.b - Piranha..... | 39 |
| 1.4 - LA LITHOGRAPHIE | 40 |
| 1.4.a - Lithographie optique | 40 |
| 1.4.b - Lithographie électronique | 42 |
| 1.4.c - Evolution | 42 |
| 1.5 - LE DEVELOPPEMENT..... | 43 |
| 1.6 - METALLISATION..... | 43 |
| 1.7 - LIFT-OFF..... | 43 |
| 1.8 - INTERET D'UNE RESINE BICOUCHE EN E-BEAM | 45 |
| 2 - CHIMIE DE SURFACE..... | 46 |
| 2.1 - LES FILMS DE LANGMUIR-BLODGETT | 46 |
| 2.2 - LES FILMS AUTO-ASSEMBLES..... | 47 |
| 2.3 - TECHNIQUES D'IMPRESSION | 50 |
| 3 - TECHNIQUES DE CARACTERISATION | 51 |
| 3.1 – ANGLES DE CONTACT..... | 51 |
| 3.1.a – Principe..... | 51 |
| 3.1.b - Calcul de l'énergie de surface..... | 53 |
| 3.2 - LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE | 54 |
| 3.3 - LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE | 56 |
| 3.3.a - Principe | 56 |
| 3.3.b - Courbe de force | 58 |
| 3.3.c - Le mode contact..... | 59 |
| 3.3.e - Le mode tapping ou contact intermittent | 60 |
| 3.3.f - Performances..... | 60 |
| 3.4 - CARACTERISATION ELECTRIQUE..... | 61 |
| 3.5 - SCANNER A FLUORESCENCE | 62 |
| 3.5.a – Principe..... | 62 |
| 3.5.b – Molécule fluorescente utilisée..... | 63 |
| 3.5.c – Applications générales | 64 |
| 4 - POINT STATISTIQUE ET TRAITEMENT DES DONNEES..... | 64 |

La première étape de ce projet consiste à réaliser de A à Z des électrodes micro et nanostructurées selon un gap inter-électrodes inférieur à 100 nm. La **partie 1** résume les différentes techniques de nanofabrication issues principalement de la microélectronique. Ce dispositif est ensuite traité chimiquement afin de réaliser en surface une couche organique d'accroche pour déposer ultérieurement des biomolécules : la **partie 2** concerne donc les procédés d'assemblage moléculaire usuels ainsi que les techniques d'impression de sondes sur support solide. De plus, un tel système doit être observé et contrôlé afin de vérifier sa fiabilité avant la réalisation d'interactions polypeptidiques. La **troisième partie** présente les différents outils de caractérisation utilisés. Enfin, un point statistique sera effectué (**partie 4**) afin d'explicitier la méthode que nous avons utilisé pour traiter le nombre important de données générées durant nos travaux.

1 - Conception des électrodes

Le substrat de départ, généralement le silicium, est un matériau bien défini par son orientation cristalline, ses dimensions, et ses propriétés électriques (résistivité, dopage) [Bent, 2002; Duke, 1996; Porath, 2000; Waltenburg, 1995]. La première étape dans la fabrication d'un biocapteur consiste à nettoyer le substrat, afin d'éliminer la majorité des contaminations susceptibles de causer des problèmes lors des étapes ultérieures. A la surface de ces supports nettoyés seront déposés des films en couche mince (résine, or, argent, oxyde). Après dépôt, le film subit un procédé de lithographie afin de transférer sur la surface du support des nanomotifs ayant la géométrie des composants à réaliser. La gravure sert ensuite à éliminer partiellement ou totalement les parties du film non-désirées pour obtenir des structures tridimensionnelles (nanoélectrodes, transistors, masques...). Certaines étapes peuvent apparaître plusieurs fois [McWhorter, 1997].

1.1 - Principe de la définition des motifs

La technique usuelle consiste à déposer de manière uniforme sur le substrat une résine sensible à un certain type d'énergie, puis à dessiner les motifs en exposant sélectivement la résine à la source d'énergie. Le film de résine subit ensuite un traitement chimique afin de faire apparaître des différences de solubilité entre les parties intactes et les parties irradiées de la résine. Ce processus aboutit finalement à détruire les portions exposées au traitement énergétique (résine positive) ou celles qui ne l'ont pas été (résine négative). Il résulte une série de motifs qui recouvrent partiellement la surface de l'échantillon. Les zones découvertes, qui ont la forme des motifs d'intérêt, peuvent alors subir une série d'étapes technologiques (dépôt métallique, gravure...).

1.2 - L'oxydation thermique

Généralement, le silicium s'oxyde en présence de l'atmosphère ambiante. Ce phénomène se bloque naturellement pour une épaisseur d'oxyde dit natif de 1-3 nanomètres environ. Il peut cependant être nécessaire de faire croître à la surface du silicium une couche d'oxyde de silicium [Choi, 2002; Deal, 1965] bien plus grande. Cette couche peut servir de couche de passivation, de masque d'implantation ou de diffusion de dopants, de couche active dans les transistors MOS ou bien de zone d'isolation électrique entre différents niveaux de métallisation (comme des électrodes en or) ou de couches conductrices.

Pratiquement, la couche d'oxyde est produite par oxydation thermique à haute température (800-1200°C) à l'intérieur d'un four parcouru par un courant gazeux oxydant (O_2 ou H_2O). La réaction se produit à l'interface Si-SiO₂. Pour une croissance d'oxyde d'épaisseur d_{ox} , une couche de silicium d'épaisseur $0,44d_{ox}$ a été consommée (Fig. 2.1). Il se produit donc une augmentation de volume ainsi qu'un abaissement de l'interface Si/SiO₂ qui peut avoir des conséquences sur la planéité de la surface dans le cas d'une oxydation locale.

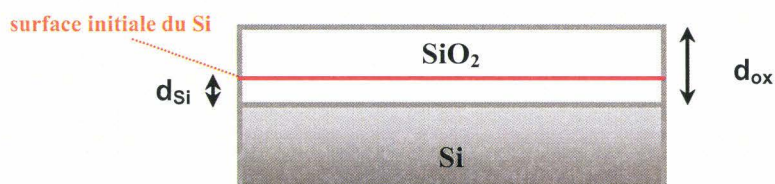


Figure 2.1 : Phénomène d'abaissement de l'interface Si/SiO₂ durant une oxydation thermique. d_{ox} correspond à l'épaisseur d'oxyde formé et d_{Si} l'épaisseur de silicium consommé.

Selon la nature de l'oxydant, on a une oxydation sèche ou humide.



Pour obtenir un oxyde sans défauts, électriquement actif et d'épaisseur contrôlée, on préfère l'oxydation sèche qui donne une croissance lente. La croissance avec de l'eau est plus rapide mais génère plus de défauts électriques. Cette seconde méthode est donc utilisée pour réaliser des oxydes épais (plusieurs centaines de nanomètres), de masquage ou d'isolation. Par exemple, 8 heures sont nécessaires afin d'obtenir une épaisseur de 2000 Å d'oxyde à 1000°C en oxydation sèche, contre moins d'une heure en oxydation humide. La croissance de l'oxyde et sa qualité sont fonction de la température, du flux de vapeur d'eau pour l'oxydation humide et de la surface du substrat de silicium. En effet, une surface

rugueuse donne un oxyde de mauvaise qualité. C'est pour cela que des procédés de nettoyage sont réalisés avant l'oxydation et plus globalement pendant le processus de microfabrication des motifs, afin d'assurer une surface propre et lisse.

1.3 - La préparation de surface

Les étapes de nettoyage représentent classiquement 20-25% du nombre total d'étapes dans le processus complet. L'utilisation de substrats en silicium nécessite un environnement propre. Dans le cas contraire, la présence d'agents contaminant sur le substrat a pour conséquence d'introduire des impuretés pendant le dépôt de films minces, de dégrader les propriétés physiques de ces films et enfin de rendre très difficile l'élaboration d'une lithographie correcte à cause d'une poussière dont la taille serait équivalente ou supérieure à celle du nanomotif à réaliser.

La contamination se présente sous deux formes :

- sous forme de couches minces, par exemple des résidus de résine, dépôt d'huile, empreintes de l'opérateur, produit parasite pendant un traitement chimique.
- sous forme de particules pouvant provenir de l'air ambiant (poussières), du manipulateur ou des instruments.

On distingue deux types de traitement (Tableau 2.1) : les traitements chimiques et énergétiques. Les méthodes chimiques sont les plus utilisées et permettent le dégraissage, c'est à dire l'élimination des matières grasses et poussières *via* divers solvants (oxygénés, hydrocarbonés, chlorés et fluorés), ainsi que le décapage des surfaces en éliminant les composés indésirables mêlés à cette surface (oxydes, métaux...). Les traitements énergétiques comprennent la fluoration, le plasma, le flammage et les traitements lasers.

| Traitement | Méthode | Contaminants visés | Principe |
|-------------|-------------|------------------------------------|--|
| Chimique | Dégraissage | Matières grasses, poussières | Solubilisation par des solvants ou des agents alcalins par trempage sous ultrasons, rinçage (CHCl ₃ , MeOH...) |
| | Décapage | Oxydes, organiques et inorganiques | Trempage et rinçage dans solutions acides (HF, H ₂ SO ₄ ...) |
| | Conversion | / | Dépôt d'une nouvelle couche pour modifier les propriétés de surface (métallisation, phosphatation...) |
| Energétique | Fluoration | / | Exposition de <u>matières plastiques</u> à du fluor gazeux dilué dans un gaz inerte, améliore la mouillabilité en remplaçant des hydrogènes par des fluors |
| | Plasma | Organiques | Excitation d'un gaz neutre puis bombardement de la surface |
| | Flammage | Huiles, graisses | Exposition du matériau à une flamme oxydante, introduit des molécules polaires sur la surface |
| | Lasers | Couche superficielle polymère | Irradiation laser par un faisceau monochromatique haute densité, formation de fonctions polaires en surface |

Tableau 2. 1 : Bilan des différents traitements de préparation de surface.

De nombreux procédés par voie humide, dans lesquels les supports sont immergés ou aspergés de façon répétée par des solvants usuels, sont généralement utilisés afin d'enlever la majorité des polluants. Néanmoins, des méthodes plus agressives sont requises afin de détruire toute couche organique non désirée au niveau moléculaire. Il s'agit du plasma à oxygène et du procédé nommé "piranha" que nous utiliserons préférentiellement par la suite.

1.3.a - Plasma

Le traitement par plasma est fréquemment utilisé dans la fabrication de circuits intégrés en silicium pour dessiner des motifs dans des films ultrafins, pour évacuer sélectivement des couches organiques utilisées comme masque et enfin pour éliminer les contaminants organiques d'une surface de manière plus efficace que les processus chimiques humides [Liston, 1989]. Il est réalisé dans des réacteurs étanches en abaissant la pression sous 1 torr puis en soumettant un gaz (Ar, O₂...) ou une combinaison de gaz (SF₆:O₂) à un champ énergétique électronique. Les électrons correspondants sont accélérés par un champ électrique à radio-fréquence (RF) ou à micro-ondes afin de produire des espèces réactives neutres et ioniques venant frapper la surface. L'oxygène est le gaz le plus utilisé pour réagir avec les contaminants et causer leur volatilisation.

Quand l'oxygène est exposé à un champ d'énergie, il se dissocie en oxygène monoatomique O⁺ et O⁻ avant de se combiner avec les composés organiques. Il en résulte de la vapeur d'eau, du CO et du CO₂, qui seront ensuite évacués de la chambre. Ces plasmas laissent sur la surface de l'échantillon des groupements fonctionnels oxygénés (silanols dans le cas du silicium). L'énergie de surface tend à augmenter, ce phénomène se traduisant par une diminution d'angle de contact pour des solvants polaires. L'angle de contact avec de l'eau ultrapure sur une surface en aluminium contaminée par de l'huile passe de 57° à moins de 3° après un nettoyage par plasma. Ces groupes augmentent la mouillabilité, améliorent les liaisons adhésives et rendent la surface acide. *A contrario*, les entités inorganiques (comme les sels) ne seront pas touchées.

1.3.b - Piranha

Piranha est le nom trivial du mélange composé d'acide sulfurique (H₂SO₄) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en solution dans l'eau. Les proportions communes consistent en un mélange 3:1 (v:v). Celui-ci permet d'éliminer les contaminants organiques d'une surface avant toute microfabrication. La réaction issue de la décomposition lente du peroxyde est exothermique (120-140°C). Les atomes de carbone présents sur la surface de l'échantillon réagissent avec les oxygènes issus de la dissociation de H₂O₂ pour former du

CO₂. Il résulte une solution visqueuse qui nécessite des lavages supplémentaires à l'eau. Il a été observé qu'un traitement court de 15 à 20 minutes à 130°C était le plus efficace [Kem, 1993].

1.4 - La lithographie

L'évolution *top-down* est devenue possible par le développement des nanotechnologies et plus précisément des moyens de lithographie à haute résolution. La lithographie consiste à dessiner dans la matière des motifs *via* un rayonnement particulier. Généralement, la lithographie optique [Hatzakis, 1980] est utilisée pour tout motif de dimension supérieure au micron, et la lithographie électronique pour toute résolution largement submicronique.

1.4.a - Lithographie optique

Le procédé de photolithographie consiste à déposer une couche mince de résine photosensible sur le substrat. Après séchage, certaines régions localisées du substrat sont exposées à une illumination intense d'ultraviolets par l'intermédiaire d'un masque en quartz sur lequel ont été dessinés les motifs. Le substrat résiné est mis en contact avec ce masque puis illuminé par le dessus avec une lampe UV. Ainsi, la résine n'est exposée aux UV que dans les régions transparentes du masque. L'étape finale, détaillée dans le paragraphe 1.5, est le développement dans un solvant approprié au cours duquel la résine exposée est dissoute [Madou, 1997].

La résine est un composé organique qui présente une sensibilité particulière envers les UV. Après exposition à un tel rayonnement, la structure et les propriétés chimiques sont modifiées. On parle de résine négative quand l'exposition aux UV polymérise la résine et la rend donc moins soluble, et de résine positive quand les liaisons chimiques sont brisées et rendent la résine soluble. Le procédé se déroule de la façon suivante :

- étalement de la résine photosensible par centrifugation (ou *spin coating*). Le substrat est fixé sur un support tournant par aspiration (Fig. 2.2). Quelques gouttes de résine sont déposées puis la force centrifuge permet l'étalement de la résine de façon uniforme en un film mince de quelques microns dont l'épaisseur est contrôlée en jouant sur l'accélération, la vitesse et le temps de rotation.

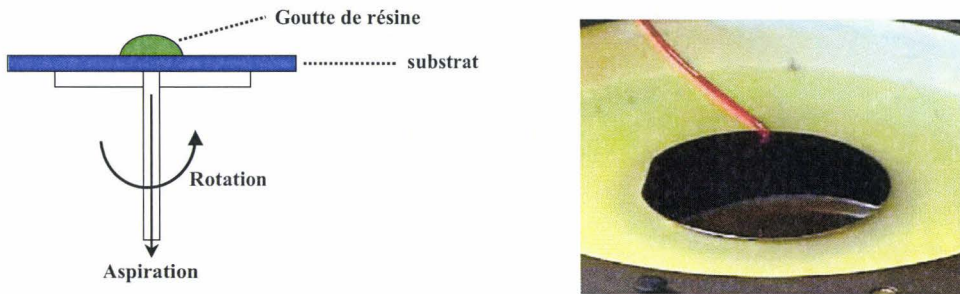


Figure 2. 2 : Principe du *spin-coating*.

- étape de recuit. L'échantillon est déposé sur une plaque chauffante ou bien déposé directement dans une étuve. Ce traitement est destiné à réduire la teneur en solvant du film mince, à améliorer l'adhésion de la résine sur le substrat et à stabiliser les contraintes créées dans la résine pendant le *spin-coating*.

- exposition de la résine à un rayonnement ultraviolet à travers un masque. Il existe deux méthodes de masquage (Fig. 2.3). D'une part, le masquage par contact qui nécessite un contact direct entre le wafer couvert de résine photosensible et le masque. Cette méthode peut générer des dégradations du masque, surtout en présence de poussières. D'autre part, le masquage de proximité, où une faible distance ($\sim 50 \mu\text{m}$) est laissée entre le masque et le substrat. Il peut se produire une baisse de la résolution consécutive à un phénomène de diffraction du faisceau lumineux.

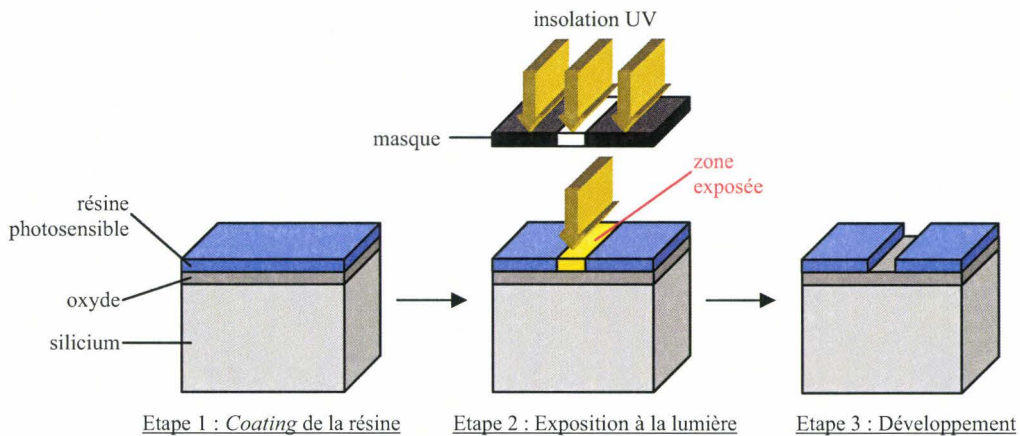


Figure 2. 3 : Principe de la photolithographie.

- élimination finale de la résine avant d'autres étapes technologiques (gravure, métallisation...)

Il existe une technique dérivée utilisant des rayons X, dits durs, de longueur d'onde plus courte qui permet de minimiser les effets de dispersion par diffraction à la traversée du masque et donc d'améliorer la résolution du procédé. Mais la technique reine est actuellement la lithographie optique dans l'ultraviolet profond (DUV pour *Deep Ultra-Violet*) qui concilie une résolution suffisante pour les dispositifs classiques et un très bon rendement [Chiu, 1997]. Néanmoins cette technique sera limitée par sa résolution dans le futur. La longueur d'onde (248 nm dans l'industrie) de la source est déterminante. Plus elle est faible et plus la gravure sera fine. On étudie actuellement certaines sources à 157 nm (résolution de 50 nm en écriture) [Iwasa, 1996].

Afin de s'affranchir de ces problèmes optiques, il existe une technique d'écriture beaucoup plus fine où un faisceau de particules est focalisé puis déplacé afin de dessiner le motif désiré : la lithographie électronique.

1.4.b - Lithographie électronique

La lithographie électronique génère des électrons de haute énergie (plusieurs dizaines de milliers de volts d'accélération) focalisés par une optique électronique (similaire à celle utilisée dans les microscopes électroniques). Le faisceau de particules est utilisé comme un stylo nanométrique pour dessiner la matière à partir d'un appareil dérivé du microscope électronique, l'*e-beam*. En général, une technique de lithographie est considérée comme rentable pour la production industrielle de masse quand la vitesse d'écriture est d'environ 1 cm²/s. Ce n'est pas le cas de la lithographie électronique car plusieurs heures peuvent être nécessaires pour une seule plaquette. Cependant, cette technique est un outil de choix car le dessin du circuit n'est pas figé sur un masque définitif mais peut être modifié simplement *via* un codage informatique. Elle permet une résolution de 3-5 nm mais ne peut par sa lenteur soutenir la cadence d'un procédé industriel. Mais il est classique de combiner, comme nous le ferons pendant ce projet, lithographie optique et électronique en réservant cette dernière pour des motifs nécessitant une haute résolution.

1.4.c – Evolution

Les limites de résolution prévues dans le futur de la lithographie électronique (ainsi que sa lenteur) imposent la création de nouveaux outils. On tente par exemple de fabriquer des réseaux de pointes de microscopes à effet tunnel capables de fonctionner simultanément. Une nouvelle technique fait également son apparition depuis quelques années : la technique de nanomoulage [Chou, 1997]. Celle-ci consiste à presser un tampon comportant les motifs à définir en relief sur une résine rendue visqueuse par chauffage. La

méthode est rapide, de faible coût et des résolutions inférieures à 10 nm ont déjà été réalisées.

1.5 - Le développement

Cette étape va permettre de révéler le motif latent créé dans la résine après insolation. Après la lithographie, le substrat résiné est plongé dans un bain de développement afin d'éliminer la partie de la résine ayant une solubilité élevée. Ce bain est constitué d'un solvant ou mélange de plusieurs solvants : ceux-ci sont sélectifs en terme de masse moléculaire et ne dissolvent que les chaînes polymériques brisées par la source énergétique dans l'étape précédente. Il est nécessaire de contrôler le temps de développement afin d'éviter une sur-attaque de la résine et par conséquent une perte des motifs les plus fins. Ce temps est proportionnel à l'épaisseur de la résine et à la complexité de la géométrie des motifs.

1.6 - Métallisation

Dans notre étude, le dépôt métallique afin de structurer les électrodes a été réalisé par évaporation sous vide. Dans un bâti maintenu sous un vide poussé (10⁻⁸ torr), les particules métalliques sont sublimées par chauffage vers le substrat dans sa totalité. Deux méthodes de sublimation du matériau existent : la méthode thermique ou par canon à électrons.

Dans le premier cas, une faible quantité de métal est déposée dans un creuset en tungstène et chauffée sous vide au-dessus du point d'ébullition en présence de l'échantillon. Dans le deuxième cas, le métal est chauffé par un canon à électrons. Les vapeurs se condensent alors sur le substrat froid. Cette technique a été préférée car elle permet de concevoir des structures métalliques avec une grande précision à partir d'ouvertures dans des résines gravées [Bessot, 1976].

1.7 - Lift-off

La dernière étape de fabrication consiste à éliminer de la surface de l'échantillon le métal déposé sur la résine. Ainsi, seules les régions où la résine a été préalablement enlevée restent couvertes de métal. Ce processus, nommé *lift-off* (soulèvement), se fait en laissant tremper le substrat le plus souvent dans l'acétone, qui dissout la résine sans distinction de poids moléculaire (Fig. 2.4).

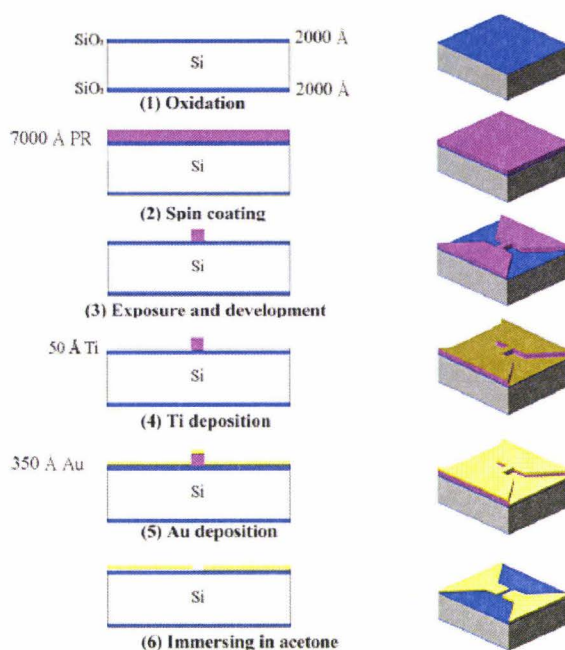


Figure 2. 4 : Fabrication de nanoélectrodes en or par un processus *lift-off*[Tsai, 2005]. (1) Oxydation du substrat (2) Etalement de la résine (3) Exposition énergétique et développement (4) Dépôt d'une couche de titane (5) Dépôt d'une couche d'or (6) Trempage dans l'acétone.

Pour faciliter la dissolution de la résine par l'acétone, il est préférable d'observer un profil dit "en casquette" de la résine au bord des ouvertures. Il faut donc que le dépôt métallique à l'intérieur du motif d'ouverture ne recouvre pas toute la surface découverte afin de favoriser la rupture du film métallique sur les bords de l'ouverture.

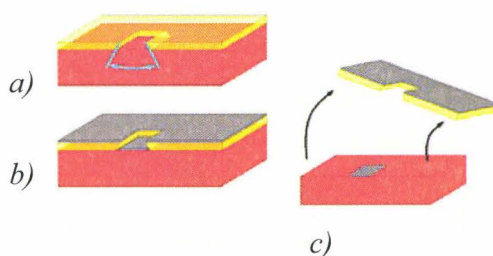


Figure 2. 5 : Principe du profil casquette sur un substrat résiné. (a) Profil en casquette de la résine (jaune) au bord des ouvertures causées par le développement (b) Métallisation (gris) (c) *Lift-off* puis libération des motifs métallisés.

L'origine d'un tel profil est fonction de la source d'énergie. En photolithographie, la lumière est réfléchi à l'interface du film de résine et du substrat puis à l'interface de la résine et de l'air. En lithographie électronique, la dispersion des électrons dans la résine ainsi que la production d'électrons secondaires (créés dans la résine) favorise le profil casquette. Les électrons rétrodiffusés par le matériau sensible vont se propager dans le voisinage. Ce phénomène a pour effet une exposition de la résine plus forte en bas qu'en

haut, minimisant ainsi le risque de déposer un film continu de métal sur la surface qui recouvrirait les parois de la résine dans les ouvertures. Ce phénomène peut être amplifié en utilisant une résine bicouche constituée de deux films de résine déposés l'un sur l'autre et qui possèdent une sensibilité différente au faisceau électronique.

1.8 - Intérêt d'une résine bicouche en e-beam

En lithographie électronique, la largeur du motif obtenue après exposition d'une monocouche de résine électrosensible est souvent plus grande que celle du faisceau électronique durant la gravure. L'utilisation classique d'une résine bicouche, composée de deux résines superposées et qui possèdent une sensibilité différente au faisceau énergétique, permet de réduire les effets de proximité (Fig. 2.6a). La dispersion des électrons secondaires est réalisée sur des épaisseurs plus fines, le niveau inférieur de résine jouant le rôle de substrat pour le niveau supérieur. Il en résulte un accroissement de la résolution. On utilise par exemple en lithographie électronique un film supérieur en polyméthyl méthacrylate (PMMA) qui est moins sensible à l'exposition que le film inférieur, un copolymère à base de méthyl méthacrylate (COPO MMA).

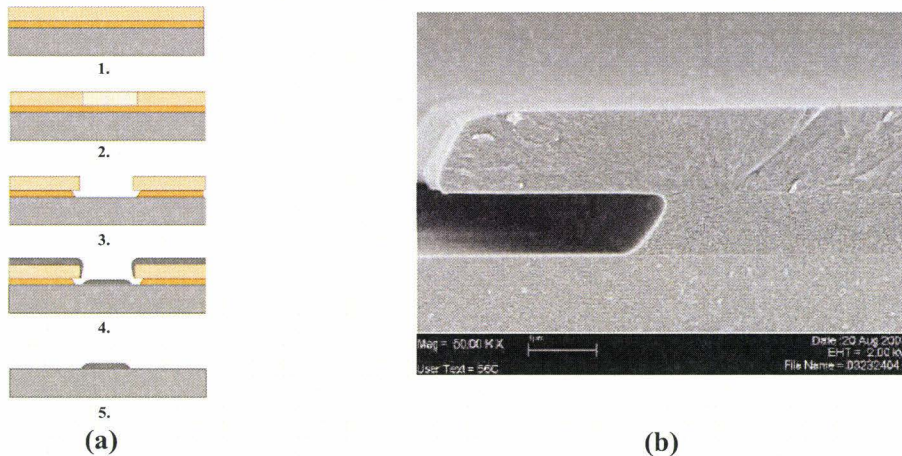


Figure 2. 6 : Utilisation d'une résine bicouche dans un processus *lift-off*. (a) Principe : 1- Dépôt de la double couche. 2 – Exposition. 3 – Développement. 4 – Métallisation. Le profil assure un dépôt discontinu du film métallique. 5 – *Lift-off*. (b) Image d'une bicouche PiRL®III / Shipley 1813 d'épaisseur 0,8/1,5 μm .

^a schéma (a) tiré du site internet de la MicroChem Corp. (<http://www.microchem.com>), image (b) issue de la page de Brewer Science Inc (<http://www.rbewerscience.com>).

2 - Chimie de surface

L'interaction des biomolécules avec des surfaces solides est d'une importance cruciale pour la réalisation d'un dispositif miniaturisé de détection. Une activation du support est nécessaire afin de promouvoir de manière contrôlée et sélective l'attache de ligands puis l'interaction avec un récepteur. Dans ce but sont fréquemment utilisés des films d'épaisseur moléculaire, constitués de molécules orientées perpendiculairement à la surface. Il existe deux types de films : les films de Langmuir-Blodgett et les films auto-assemblés (ou SAMs pour *Self-Assembled Monolayers*).

2.1 - Les films de Langmuir-Blodgett

La conception des films de Langmuir-Blodgett (LB) est basé sur le simple constat qu'une goutte d'huile (molécule amphiphile) déposée sur une surface statique d'eau, s'étale jusqu'à former un film monomoléculaire [Blodgett, 1937; Langmuir, 1917]. Pratiquement, une solution d'un composé organique à longue chaîne typiquement amphiphile, c'est à dire comportant une extrémité hydrophile ($-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{OH}$) et une extrémité hydrophobe ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), est introduite dans une cuve de téflon remplie d'eau déionisée. En raison de sa structure, ce composé va former un film monomoléculaire à la surface de l'eau. Une barrière mobile va ensuite permettre de comprimer ce film afin de ne laisser aucun espace libre sur la surface (voir fig. 2.7). Dans ces conditions, les molécules vont se ranger verticalement, aidées par les interactions de Van der Waals entre chaînes alkyles qui tendent à s'aligner parallèlement. Cet alignement est favorisé par le caractère bivalent des groupements qui cherchent comme voisin une tête de même nature chimique.

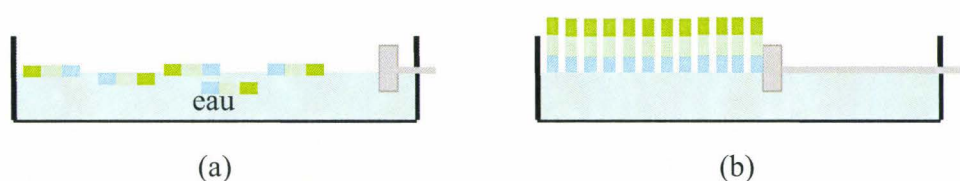


Figure 2. 7 : Synthèse d'un film de LB à l'interface eau-air dans une cuve en téflon. (a) Le film est dense et désordonné. (b) La barrière mobile (en gris) comprime les molécules qui se réorientent selon un ordre défini et un film dense.

On immerge alors perpendiculairement à la surface le substrat-support avant de le retirer doucement à l'aide d'un mécanisme automatique à vitesse constante. En raison du phénomène de capillarité, le film se fixe sur le substrat selon une monocouche presque exempte de défauts. En procédant à plusieurs passages du substrat, il est possible d'empiler jusqu'à plusieurs dizaines de monocouches (Fig. 2.8).

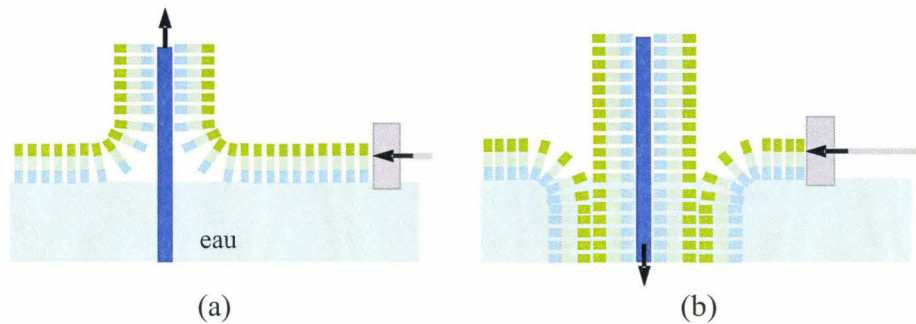


Figure 2. 8 : Formation d'un film de LB sur substrat hydrophile. (a) La surface immergée dans l'eau est retirée : le côté hydrophile du film est transféré sur le substrat. (b) Le substrat peut être replongé afin de déposer une seconde couche de film : le côté hydrophobe vient alors se déposer.

Les films de LB restent cependant fragiles car ils ne sont déposés que par physisorption sur une surface. Ils résistent difficilement aux facteurs extérieurs (contact, température, solvant). A l'inverse, les films auto-assemblés forment des liaisons covalentes avec le substrat.

2.2 - Les films auto-assemblés

Une monocouche auto-assemblée est un assemblage moléculaire qui se forme spontanément sur un substrat mis dans une solution ou en phase vapeur contenant la molécule à greffer. Les molécules utilisées comportent généralement trois parties [Ulman, 1991] :

- un groupement réactif (ou *head group*) permettant à la molécule de s'ancrer sur la surface.
- un groupement de surface (ou *endgroup*) portant la fonctionnalité chimique.
- le corps de la molécule (ou *backbone*), souvent une chaîne alkyle.

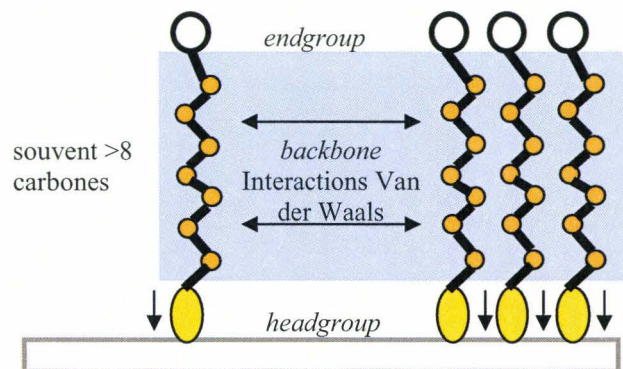


Figure 2. 9 : Représentation simplifiée des molécules formant des films auto-assemblés.

Les films obtenus (Fig. 2.9) forment idéalement un réseau bidimensionnel dense de molécules en position pseudo-verticale sur le substrat et permettent, du fait de la présence d'un groupe réactif en surface, de modifier les propriétés du substrat. Il est ainsi possible de modifier la mouillabilité d'une surface en la rendant hydrophobe ou hydrophile, de servir de précurseur pour le dépôt d'un polymère, de contrôler les propriétés électriques du substrat en tant qu'isolant ou conducteur, et enfin d'assurer l'accrochage maîtrisé de biomolécules durant la conception de biopuces. Ce dernier point nous intéresse plus particulièrement car nous utiliserons les SAMs d'une part pour accrocher des molécules polypeptidiques sur silicium et d'autre part pour contrôler la fiabilité de cet accrochage *via* des biopuces.

On distingue généralement deux catégories de couple tête réactive-surface :

- la réaction des n-alcanethiolates sur une surface métallique (en or le plus souvent) [Poirier, 1996].
- la silanisation entre un organosilane et une surface hydroxylée [Wasserman, 1989].

La première catégorie peut être formée à partir d'une large variété de composés soufrés (thiols [Slowinski, 1997], sulfures [Brown, 1999], disulfures [Brown, 2001]). De plus, la surface en or est inerte chimiquement et ses propriétés conductrices permettent de l'intégrer dans des capteurs. Les structures obtenues par adsorption des n-alcanethiols (voir fig. 2.10) sont souvent bien ordonnées et cristallines et ne nécessitent que quelques minutes de préparation [Sandhyarani, 2003]. D'autres substrats, tels que le platine, palladium, argent, et cuivre, peuvent être utilisés au sein de processus de microfabrication.

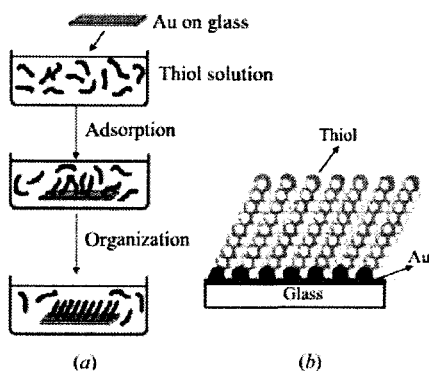


Figure 2. 10 : (a) Principe de la préparation d'une SAM. Une lame de verre couverte d'or est plongée dans une solution éthanolique de thiol. L'adsorption est rapide mais peut être suivie au-delà de 15 heures pour une monocouche dense. **(b) Représentation d'une SAM dans l'espace.**

La seconde catégorie de réaction tête réactive-surface met en jeu une surface hydroxylée -SiOH, issue d'un oxyde de silicium par exemple, et des organosilanes. Ces organosilanes consistent en un atome de silicium tétraédrique lié d'une part à trois groupes

fonctionnels similaires (courtes chaînes alkoxy ou chlorures) et d'autre part à un groupe fonctionnel d'intérêt (amine, aldéhyde, alkyl...). A la différence des liens S-Au, les organosilanes se condensent avec des groupes hydroxyles en formant un film mince de polysiloxane à l'interface (voir structure sur la fig. 2.11). Ce film est beaucoup plus stable thermiquement et forme un système robuste qui est utilisé fréquemment depuis quelques années afin d'immobiliser des protéines [Sugimura, 1997] sur support solide, en particulier du silicium [Ulman, 1991]) sans perte d'activité.

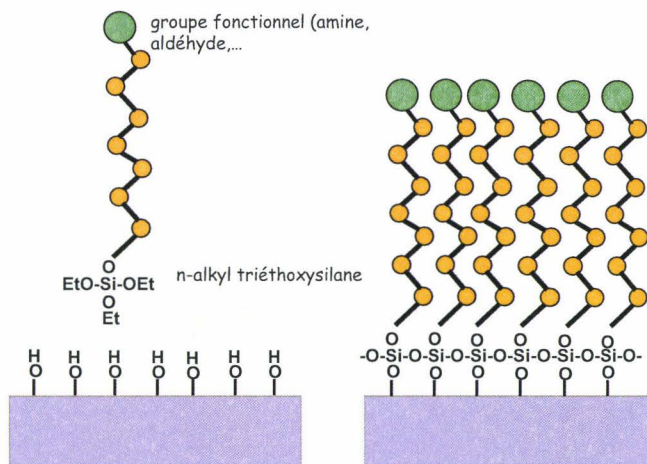


Figure 2. 11 : Principe de l'auto-assemblage d'une organosilane sur une surface hydroxyle.

La fixation est un processus exothermique dans lequel les chaînes alkyles sont structurées de manière ordonnée selon des interactions de Van der Waals et éventuellement des interactions électrostatiques. Cependant, les groupements de surface ne subissent pas ces interactions et peuvent s'orienter de manière désordonnée selon les paramètres expérimentaux [Brzoska, 1994].

Nous aurons donc recours à la formation de ce type de film dans l'espace inter-électrodes. Cette approche pose cependant deux problèmes. En premier lieu, une chimie de contrôle est nécessaire. Nous ne pouvons pas réaliser de manière rigoureuse un traitement chimique pour ancrer des complexes ligand-récepteur sur un biocapteur sans un contrôle-qualité parallèle de la monocouche auto-assemblée. Une telle chimie sera détaillée au sein du **chapitre III**. La seconde limitation provient des dimensions mises en jeu dans nos dispositifs. Nous approchons les dimensions moléculaires dans la mesure où les aires d'intérêt dans lesquelles seront immobilisées les biomolécules sont inférieures à 50 nm et sont de surcroît piégées entre des structures métalliques. Le transfert des chimies de surface évoquées précédemment vers nos dispositifs risque donc de nécessiter des

techniques d'analyse particulières (microscopie électronique, goniométrie) à haute résolution.

2.3 - Techniques d'impression

Travailler entre des microélectrodes sur une surface de quelques μm^2 impose de pouvoir adresser les molécules biologiques dans un espace restreint autour des électrodes. Certaines méthodes consistent à créer une zone de passivation autour de la zone d'intérêt (les électrodes) en greffant par exemple dans les zones non-usitées une monocouche de molécules hydrophobes afin de chasser les solvants utilisés pendant les traitements (souvent de l'eau) vers le gap. On arrive ainsi à confiner localement les biomolécules et à favoriser la chimie dans le gap. Cependant, cette méthode présente l'inconvénient d'augmenter le nombre d'étapes préalables à la détection électrique : réalisation d'un masque optique aux dimensions des fenêtres de passivation, résinage supplémentaire. Or un processus valable est souvent un processus simple et comprenant peu d'étapes.

Nous avons décidé d'adresser les sondes sur le substrat par spotting, technique empruntée au domaine des biopuces. Le but est de générer des microspots (diamètre < 250 μm) permettant d'immobiliser des sondes dans le gap. Il est nécessaire de travailler en parallèle afin d'imprimer plusieurs échantillons en simultané, en automatique à cause du grand nombre d'électrodes, et enfin en miniaturisé pour délivrer un minimum de sonde sur la surface. Il existe actuellement deux grandes méthodes d'impression de sondes, de type jet d'encre (ou inkjet) [Medlin, 2001] ou par contact [Renault, 2002]. Le mode contact repose sur un contact direct entre le substrat et l'appareil d'impression. Les aiguilles de dépôt, de type *solid pin* ou *pin and ring*[®] [Rose, 2000] sont immergées dans une solution liquide afin de transférer un faible volume (0,3-2 nL en général) de la sonde dans l'aiguille. Dans un deuxième temps se produit le contact entre l'aiguille et la surface, générant ainsi le spot dont le diamètre est fonction de l'énergie de surface de l'aiguille, du type de surface utilisé, du tampon dans lequel est solubilisée la sonde et enfin du diamètre de l'aiguille. Si le coût des *microarrayers* de contact est souvent plus faible que ceux fonctionnant en non-contact, nous avons préféré l'utilisation de la technologie inkjet. En effet, cette technique permet d'éviter la dégradation des microélectrodes par un contact direct ainsi que la contamination éventuelle de la pointe par la surface.

L'appareil utilisé dans ce projet est un *Packard Biochip Arrayer* basé sur la technologie des capteurs piézo-électriques cristallins. Chacun des quatre embouts est composé d'un élément piézo-électrique constituant un collier autour d'un tube capillaire en verre. Une pompe aspire dans un premier temps la solution dans le capillaire. Une tension est appliquée sur le piézo amenant une rapide compression de l'échantillon dans le

capillaire (voir fig.2.12). Un tel procédé augmente la reproductibilité des volumes dispensés. De plus, les conditions d'impression sont standardisées et constantes. Les dépôts sont réalisés dans une salle conditionnée à 20°C et sous hygrométrie contrôlée. Un humidificateur maintient une humidité relative de 65 à 75%. L'air est filtré pour éviter la présence de poussières sur les lames.

Le diamètre typique des spots est de 150 à 250 μm et il est possible de travailler selon un format lame de verre sur 25 échantillons en parallèle. Trois réplicats peuvent être réalisés sur la même lame. Le logiciel *Biochip BC Table v3.2* permet de contrôler la position des différentes sondes, le nombre de répétitions, l'espacement entre les spots ainsi que les différents paramètres de lavage des capillaires. De plus, ce dispositif intègre une caméra CCD reliée à un oculaire grossissant trente fois la surface. En mesurant les coordonnées d'un point d'impact, il devient possible de dispenser les sondes avec une grande précision directement sur les gaps.

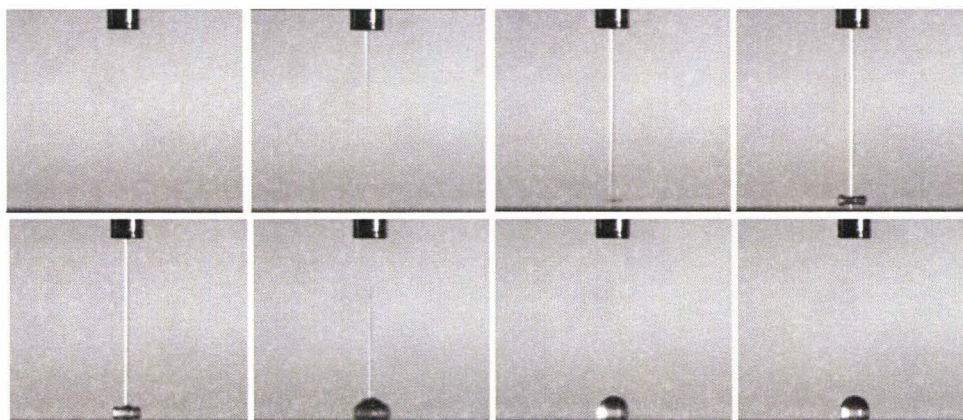


Figure 2. 12 : Image d'un piézo dispensant un volume de cent nanolitres.

3 - Techniques de caractérisation

Les techniques de goniométrie (paragraphe 3.1), de microscopie électronique à balayage (3.2) et de microscopie à force atomique (3.3) ont été fréquemment utilisées durant nos travaux. Elles seront donc plus particulièrement détaillées dans ce chapitre.

3.1 – Angles de contact

3.1.a – Principe

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, il se forme un point triple qui appartient à la fois au gaz, au liquide et au solide. Le mouillage, qui peut

être défini par le phénomène aboutissant à la création d'une interface solide-liquide, est alors caractérisé par l'étalement plus ou moins prononcé de la goutte. La mesure de l'angle de contact θ constitue une méthode simple et précise afin de déterminer l'énergie d'interaction entre un solide et un liquide. Celui-ci est alors défini par le plan tangent à la surface de la goutte au point triple (Fig. 2.13).



| | |
|---------------|--|
| γ_{LV} | Tension superficielle du liquide |
| γ_{SV} | Energie superficielle du solide sous vapeur de liquide |
| γ_{SL} | Tension interfaciale entre le liquide et le solide |

Figure 2. 13 : Bilan des forces interfaciales d'une goutte déposée sur une surface.

L'angle de contact peut varier entre 0 et 180°. Il dépend fortement de l'état de la surface [Brugnara, 2003], notamment de la présence éventuelle de contaminants, de la rugosité et enfin de l'hétérogénéité chimique. La mesure de l'angle de contact sur un film auto-assemblé donne aussitôt des indications sur sa qualité, en comparant les angles obtenus avec les valeurs théoriques. L'angle théorique pour une monocouche hydrophobe d'octadécyltrichlorosilane (OTS) est de $108 \pm 2^\circ$ pour une goutte d'eau déionisée [Cox, 2002; Wasserman, 1989], $43 \pm 2^\circ$ pour une goutte d'hexadécane et $17 \pm 2^\circ$ pour une goutte d'octane (Fig. 2.14).

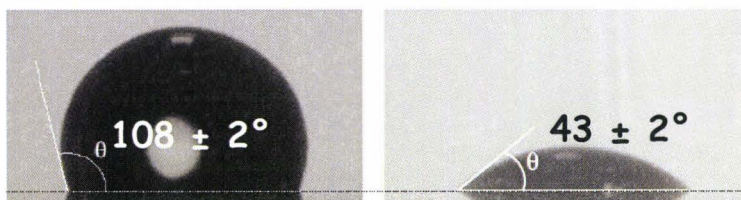


Figure 2. 14 : Angle de contact formé par une goutte d'eau (gauche) et une goutte d'hexadécane (droite) sur une monocouche hydrophobe.

Multiplier le nombre de mesures sur un seul échantillon permet également d'évaluer son homogénéité. Généralement, les liquides possédant une grande composante polaire sont sensibles à la nature des groupements de surface, et par conséquent à la présence de contaminants. Une surface amine tend par exemple à se polluer à l'air ambiant très rapidement (< trois heures), ce qui se traduit par une augmentation progressive de l'angle de contact [Siqueira Petri, 1999]. De plus, le liquide sonde la surface sur plusieurs angströms de profondeur, aussi l'angle ne dépend pas seulement du groupement chimique

terminal, mais aussi des deuxièmes et troisièmes groupements terminant la molécule greffée [Bain, 1988].

Cette technique a le double avantage d'être non destructive et reproductible. Les valeurs obtenues possèdent une faible dispersion de quelques degrés. Au niveau expérimental, une goutte de 1 μL est déposée sur le substrat au sein d'une chambre portée sous un flux d'azote dont la température est réglée à 20°C. L'angle de contact est déterminé automatiquement grâce au logiciel de traitement d'image *Windrop ++ GBX*, à partir de l'ombre de la goutte enregistrée par une caméra CCD. L'appareil utilisé durant ces manipulations est un goniomètre *Digidrop Fast/60* fourni par la société *GBX*.

3.1.b - Calcul de l'énergie de surface

La forme d'une goutte à la surface d'un solide est régit par trois paramètres :

- la tension interfaciale solide-liquide γ_{SL} . Celle-ci a la dimension d'une énergie par unité de surface [J.m^{-2}] ou d'une force par unité de longueur [N.m^{-1}] et reflète les forces attractives intermoléculaires entre la surface solide et une phase liquide.

- la tension interfaciale solide-vapeur $\gamma_{SV} (\gamma_S)$

- la tension interfaciale liquide-vapeur $\gamma_{LV} (\gamma_L)$

Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation de Young en projetant sur la surface les différentes énergies figurant sur la figure 2.13 :

$$-\gamma_{SV} + \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cdot \cos \theta = 0 \quad (2-3)$$

Seuls γ_{LV} et θ sont mesurables. Par conséquent, il est nécessaire d'avoir des relations supplémentaires pour estimer les inconnues γ_{SL} et γ_{SV} . Plusieurs modèles ont été développés pour déterminer ces inconnues (modèle de Neumann, Owens et Wendt), dont celui de van Oss [van Oss, 1987]. Celui-ci analyse la tension superficielle de surface γ_S comme étant la somme de deux composantes :

$$\gamma_S = \gamma_S^{LW} + \gamma_S^{AB} \quad (2-4)$$

avec γ_{SLW} la composante dispersive qui correspond globalement aux interactions dipôle-dipôle entre composés apolaires, γ_S^+ et γ_S^- les paramètres AB accepteur et donneur d'électrons. Ce modèle conduit à l'équation complète de Young-Dupré :

$$(1 + \cos \theta) \cdot \gamma_L = 2 \cdot (\sqrt{\gamma_S^{LW}} \sqrt{\gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+} \sqrt{\gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^-} \sqrt{\gamma_L^+}) \quad (2-5)$$

Par conséquent, si les trois paramètres γ_L^{LW} , γ_L^+ et γ_L^- sont connus pour trois liquides différents, l'écriture des trois équations pour ces trois liquides déposés mène à un système de trois équations à trois inconnues permettant d'accéder aux valeurs de γ_S^{LW} , γ_S^+

et γ_s^- , caractérisant ainsi la surface étudiée. La littérature décrit précisément les paramètres de tension de surface relatifs aux solvants usuels [Rankl, 2003]. Dès lors, la tension superficielle de surface peut être déterminée suivant l'équation :

$$\gamma_s = \gamma_s^{LW} + 2 \cdot \sqrt{\gamma_s^+} \sqrt{\gamma_s^-} \quad (2-6)$$

3.2 - La microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage consiste à balayer la surface d'un échantillon conducteur à l'aide d'une sonde électronique. L'observation est basée sur l'émission d'électrons et la détection de signaux issus de l'interaction de ces électrons avec la surface à étudier. Le faisceau électronique pénètre ponctuellement dans le substrat et diffuse dans un volume qui dépend du numéro atomique moyen de l'échantillon ainsi que de l'énergie des électrons incidents et donc de la tension d'accélération du microscope. Il est possible de former des images avec une haute résolution (3-5 nm), condition impérative afin d'observer des nanoélectrodes ainsi que des nanoparticules métalliques de diamètre proche de vingt nanomètres.

Dans le volume d'interaction (dit poire d'interaction, voir figure 2.15), les électrons vont perdre leur énergie au cours de multiples collisions avec les atomes du matériau générant ainsi plusieurs types de phénomènes secondaires (Fig. 2.16). Ces radiations sont produites en même temps et permettent l'observation ainsi que l'analyse d'un objet choisi. Les électrons émis par l'échantillon sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent le signal à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec le balayage de l'objet.

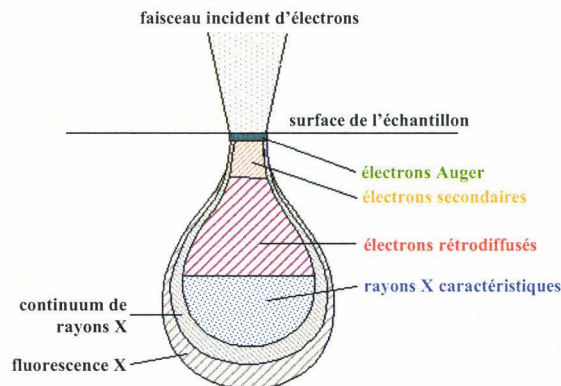


Figure 2. 15 : Schéma de la poire de diffusion.

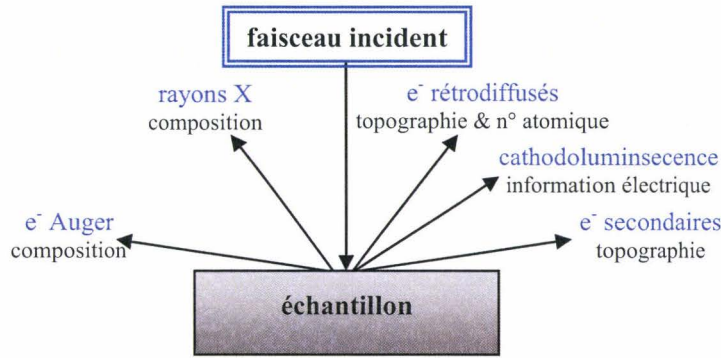


Figure 2. 16 : Radiations émises pendant l'interaction du faisceau électronique sur l'échantillon.

Les électrons secondaires sont créés par ionisation après le passage d'un électron incident près d'un atome. Ce dernier peut transmettre une partie de son énergie à un électron provoquant ainsi son éjection. Ces électrons ont une faible énergie cinétique (<50 eV). Par conséquent, seuls ceux émis près de la surface (<10 nm) peuvent s'échapper de l'échantillon et être recueilli par le détecteur. Ils sont donc très sensibles à la topographie de la surface.

Les électrons primaires accélérés pénètrent dans l'échantillon. Le parcours plus ou moins important dans la matière leur fait perdre une partie de leur énergie. La trajectoire suivie étant aléatoire, ils peuvent revenir vers la surface et être détectés. Du fait de leur énergie quasiment identique à celle des électrons primaires, les électrons rétrodiffusés se déplacent en ligne droite et peuvent provenir d'une profondeur importante. La résolution sera moins bonne (6-10 nm) qu'en électrons secondaires.

L'émission d'un photon X permet à un atome ionisé, suite à l'impact du faisceau d'électrons primaires, de revenir à l'état fondamental non excité. Ce retour s'effectue par des transitions électroniques libérant l'énergie correspondante notamment sous forme de rayons X. Ils sont émis d'un volume d'interaction de l'ordre du micron cube. Les longueurs d'ondes et les énergies du spectre discret de raies X sont caractéristiques de l'élément excité, la résolution spatiale étant voisine du micromètre.

Pratiquement, le contrôle du balayage de la surface du substrat est ensuite assuré par des bobines de déflexion alimentées par une source électrique permettant le déplacement du faisceau selon deux axes perpendiculaires. Ce balayage est synchronisé avec un oscilloscope cathodique. Il suffit d'appliquer un courant provenant d'une même source aux bobines de déflexion de la colonne du microscope et de l'oscilloscope afin de maintenir une relation directe entre un point de l'échantillon et un point de l'écran (voir exemples de clichés fig. 2.17).

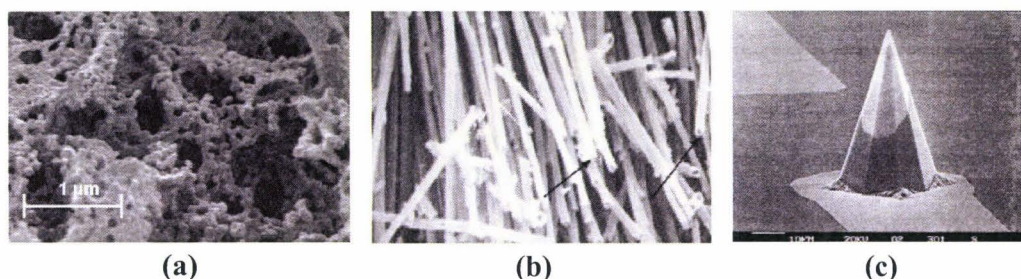


Figure 2. 17 : Exemples d'images MEB. (a) Oxyde dérivé du niobium^V [Bayot, 2005]. (b) Nanotubes de carbone : diamètre 80 nm, longueur 10 µm[Maiyalagan, 2005]. (c) Microélectrode en platine : hauteur 47 µm[Thiébaud, 2000].

3.3 - La microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique (AFM pour *Atomic Force Microscopy*) permet d'observer des surfaces au niveau atomique, sous vide ou dans l'air [Binnig, 1987]. Il peut aussi fonctionner en milieu liquide, permettant le transfert de cette technique à la biologie. Aux applications classiques d'imagerie topographique, selon une résolution actuelle allant jusqu'à 5 Å, se sont ajoutées les mesures de forces d'interaction intra- et intermoléculaires ainsi que des méthodes de manipulation moléculaire. L'AFM s'est imposée au carrefour de la biologie, chimie et physique, comme un outil indispensable au développement des nanosciences.

3.3.a - Principe

Une pointe placée à l'extrémité d'un levier souple, appelé cantilever, balaye la surface et les forces s'exerçant entre la pointe et la surface provoquent les déflexions du levier. Ces déflexions sont ensuite détectées par un système optique [Meyer, 1988]. Un avantage de l'AFM par rapport au STM est qu'il peut être utilisé avec des échantillons non-conducteurs, ce qui facilite l'étude d'échantillons biologiques. De plus, au contraire du MEB, il n'est pas utile de faire le vide autour de la surface à étudier. L'échantillon (ou la pointe selon l'appareillage) est monté sur un tube piézo-électrique qui permet des déplacements dans les trois directions de l'espace x, y et z (Fig. 2.18).

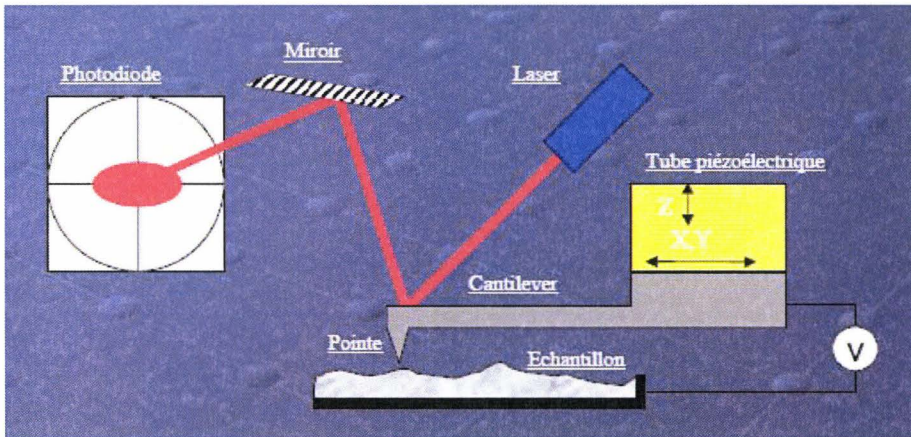


Figure 2. 18 : Principe de la microscopie à force atomique.

La pointe, souvent en nitrure de silicium Si_3N_4 [Albrecht, 1990], peut être mise en vibration à une fréquence ν . Il existe donc quatre degrés de liberté pour une pointe AFM qui permettent de définir les différents modes de travail usuels (voir schéma fig. 2.19).

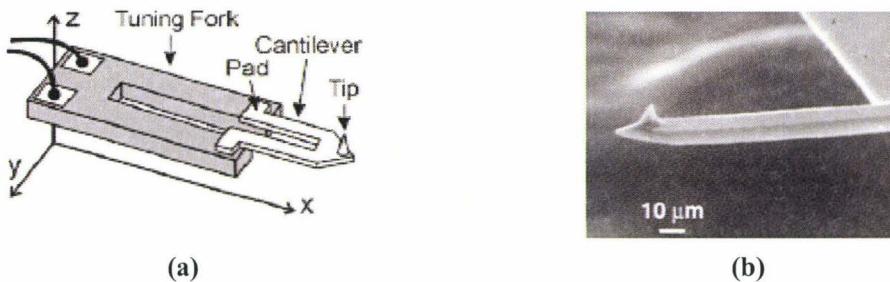


Figure 2. 19 : Observation de la micropointe. (a) Schéma d'un cantilever[Akiyama, 2003]. (b) Image MEB d'une pointe AFM couverte d'un film de carbone[Salvadori, 2001].

L'interaction entre la pointe et la surface est caractérisée par la mesure d'une donnée physique du cantilever (déflexion, amplitude de vibration...) provenant de l'action de différentes forces à courte portée ($< 10 \text{ nm}$) et longue portée ($> 10 \text{ nm}$) [Butt, 1991]. Les principales forces à courte portée, dites répulsives, apparaissent pour des distances pointe-surface inférieures au nanomètre (voir le schéma des forces fig. 2.20) :

- les forces de liaison pointe-surface, notamment des liaisons hydrogènes attractives.
- les forces de friction qui tendent à tordre la pointe.
- les forces de déformation élastique et plastique de l'échantillon suite aux fortes interactions avec la pointe.

Les forces à longue portée sont attractives :

- les forces de Van der Waals, qui proviennent d'interactions entre dipôles permanents et/ou induits. Elles agissent sur des distances supérieures à 100 nm et sont assez fortes pour provoquer une déflexion du levier.

- les forces capillaires. Quand la mesure est effectuée en conditions ambiantes, une mince couche d'eau (~ 1 nm) est présente sur la surface et cause une force de capillarité attractive entre la sonde et l'échantillon. Celle-ci est en principe constante pendant la mesure mais peut mener la pointe à imager la surface de la couche de fluide. Ce problème est éliminé en travaillant sous atmosphère contrôlée sèche, sous vide ou en solution où la force capillaire est isotrope.

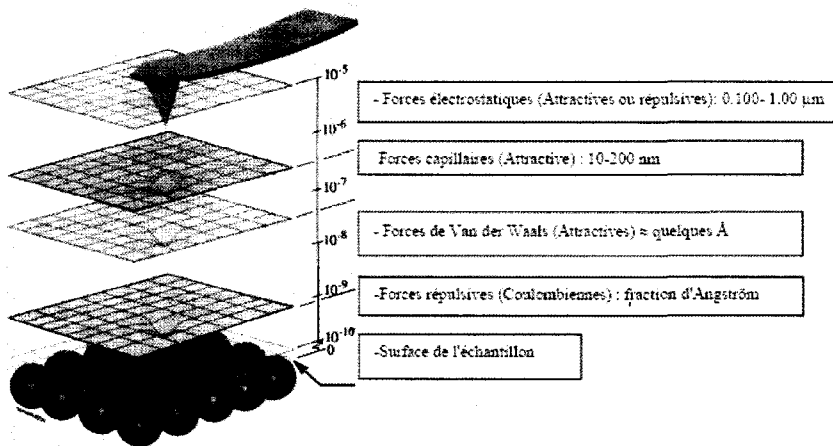


Figure 2. 20 : Schéma des différentes forces (axe en mètre) en fonction de la distance pointe-échantillon.

La mesure est généralement faite en envoyant un faisceau laser sur la partie supérieure du cantilever puis en détectant le faisceau réfléchi à l'aide d'une diode photoélectrique à quatre segments. Deux tendances dans la déflexion du cantilever sont distinguées : l'action des forces normales selon la distance pointe-surface et l'action des forces de torsion [Overney, 1992].

3.3.b - Courbe de force

Une courbe de force est la représentation de la force d'interaction entre la pointe et le substrat en fonction de la distance les séparant. La distance pointe-surface est donc fixée par l'utilisateur. On se place cette fois en un point de l'échantillon et on enregistre les variations de déflexion du levier quand la position verticale z varie. Une courbe de force typique (Fig. 2.21) est composée des cinq parties suivantes.

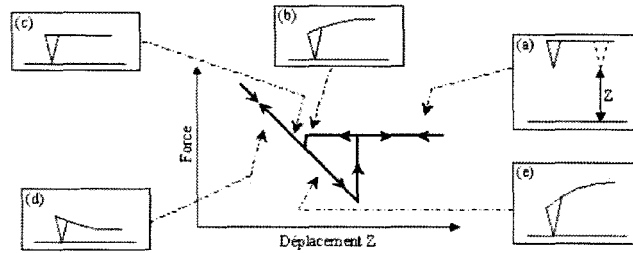


Figure 2. 21 : Comportement du cantilever en fonction de la distance Z entre la pointe et l'échantillon.

Quand la pointe est assez éloignée du support (partie horizontale a), il n'y a pas interaction et donc aucune déflexion du levier. Inversement, il se produit un saut de contact quand la pointe s'approche (b) progressivement du substrat. Les interactions attractives de Van der Waals peuvent vaincre la raideur du levier, augmentant ainsi la déflexion. La force redevient nulle quand la pointe est en contact (c) avec la surface et ne peut vibrer. Lors du retrait de la pointe (d), les forces d'adhésion pointe-surface produisent une déflexion plus importante qu'à l'aller. On dépasse progressivement le point où s'était établi le contact (e). La force exercée par le levier devient ensuite supérieure aux forces adhésives. Il y a alors rupture brutale du contact et la déflexion revient à zéro.

3.3.c - *Le mode contact*

En mode contact, la pointe est en contact physique avec la surface, faisant ainsi intervenir des forces répulsives de très courte portée (quelques nm au maximum). La pointe est balayée suivant x et y pendant que l'altitude z est asservie afin de maintenir la déflexion du cantilever constante. L'observation se fait donc selon une force de consigne constante. Le point de fonctionnement selon la figure 2.21 est choisi sur la partie de la courbe de force correspondant au retrait de la pointe. Deux modes d'imagerie sont applicables : le mode hauteur et le mode force (Fig. 2.22).

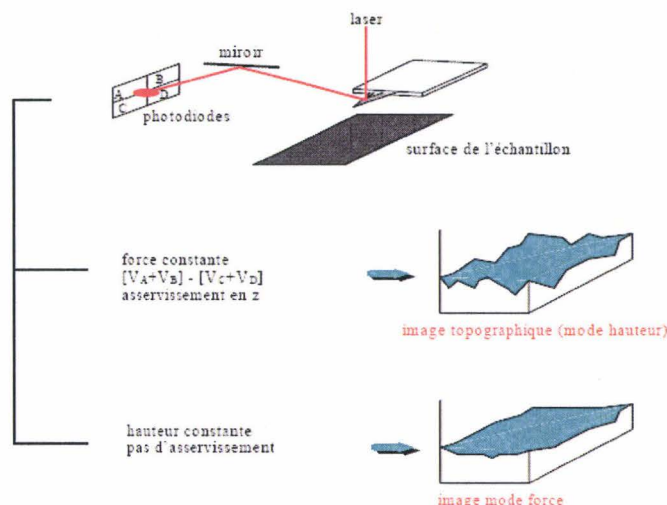


Figure 2. 22 : Schéma des modes hauteur et force.

Le mode hauteur (ou à force constante) est le plus utilisé. La déflexion du cantilever est maintenue constante. Le contraste de l'image est uniquement causé par le déplacement en z du piézo. Si l'échantillon est homogène, c'est-à-dire constitué d'un même matériau, les variations Δz sont assimilées à la topographie de surface. Cette méthode permet de mesurer des variations en hauteur de l'ordre de 0,01 nm. Si l'axe de déplacement de la pointe est perpendiculaire à l'axe du cantilever, on peut également enregistrer la torsion du levier. Il s'agit du mode de force latérale pour lequel le contraste est lié à la friction entre la pointe et la surface.

3.3.e - Le mode tapping ou contact intermittent

En mode contact intermittent, la pointe ne vient que périodiquement en contact avec la surface de l'échantillon. La fréquence d'excitation de la pointe se fait à une fréquence proche de la fréquence de résonance propre du levier (plusieurs centaines de kHz) selon une amplitude de quelques dizaines de nanomètres. De cette manière, la pointe traverse la couche d'eau présente sous atmosphère ambiante. Quand le levier rencontre un creux ou une bosse sur la surface, l'amplitude de vibration est perturbée et entraîne une déflexion du laser. Une boucle de régulation modifie le Δz afin de retrouver l'amplitude initiale. L'enregistrement de ces variations permet d'obtenir une image de force en trois dimensions de la surface.

3.3.f - Performances

Les capteurs piézo qui assurent le déplacement de la pointe ou du substrat limitent à environ 100 μm la taille du balayage dans le plan avec une amplitude verticale de 7-10 μm .

Il est donc impossible de faire un premier agrandissement visant à sélectionner la zone d'intérêt. De plus, le temps d'acquisition d'une image varie de une à dix minutes selon l'ampleur du balayage et la nature de l'échantillon. Par exemple, utiliser l'AFM en biologie nécessite, à la différence de la physique et la chimie, des forces de balayages très faibles afin d'éviter la déformation d'objets mous. Ainsi, des mesures en AFM ont permis d'obtenir des informations topographiques de la surface de cellules eucaryotes, procaryotes et végétales (voir fig. 2.23) avec une résolution bien supérieure à la microscopie optique [Drake, 1989].

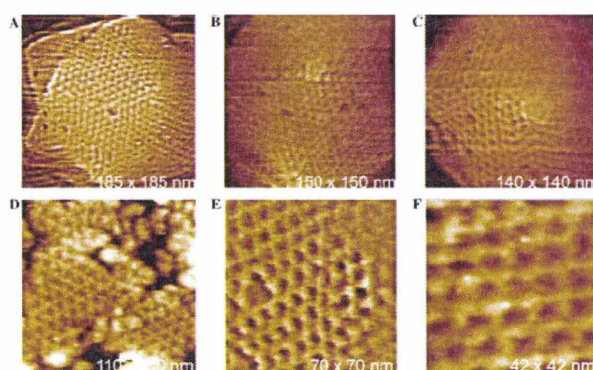


Figure 2. 23 : Clichés AFM de la structure du virus *paramecium bursaria* type 1 PBCV-1 [Kuznetsov, 2005].

De plus, cette technique a permis d'étudier les changements conformationnels de l'ADN induits par des ligands [Berge, 2002] ainsi que sa structure tertiaire [Lyubchenko, 1997]. Une autre approche consiste à mesurer la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon pour déterminer des forces de liaison entre deux biomolécules [Onoa, 1998; Ouerghi, 2002; Poma, 2005].

L'appareillage de base classique de l'AFM peut également subir des modifications afin d'obtenir des informations autres que la topographie. Ainsi, la force magnétique entre la pointe et la surface peut être mesurée (*Magnetic Force Microscopy*) afin de réaliser une topographie magnétique [Martin, 1987]. Il est également possible d'appliquer une tension entre la pointe et la surface pour i) observer d'une la déviation de la pointe selon les charges de la surface [Göddenhenrich, 1990] (EFM pour *Electrostatic Force Microscopy*) ii) mesurer des capacités [Barrett, 1991] ainsi qu'une force induite [Leveque, 1998; Wittpahl, 1998].

3.4 - Caractérisation électrique

Notre projet a pour but de détecter des variations d'intensité entre des électrodes nanostructurées dans lesquelles ont été greffées des complexes biologiques de type ligand-

récepteur. Les mesures ainsi réalisées sont des caractéristiques courant-tension, l'appareillage imposant des balayages de tension qui n'excèdent jamais la gamme [-5→5V]. En effet, des tensions supérieures pourraient dégrader les électrodes. L'information obtenue correspond donc à la réponse en intensité (fonction de la conductivité) du système électrode-gap-électrode.

Les mesures de courbe intensité-tension (ou i de v) sont réalisées avec un pico-ampèremètre *HP4140B* relié à un banc de mesures sous atmosphère passivée à l'azote dont la teneur en eau et oxygène est constamment maintenue sous le seuil de 0,1 ppm. Ce banc comporte des micropointes métalliques mobiles à l'aide de vis micrométriques afin de réaliser les contacts électriques entre l'ampèremètre et les électrodes.

3.5 - Scanner à fluorescence

Notre étude nécessite l'utilisation d'un scanner à fluorescence pour deux raisons :

- la nécessité de caractériser nos surfaces en silicium après traitement chimique. Un protocole a été défini à l'Institut de Biologie de Lille sur lames de verre. Celles-ci, traitées en parallèle avec nos surfaces, sont trempées dans une solution contenant un peptide fonctionnel rhodaminé spécifique (sonde positive). Un contrôle est réalisé sur un autre lot de lames à l'aide d'un peptide ne possédant pas de fonction d'ancrage. Après lecture au scanner, le test positif doit émettre un signal de fluorescence uniforme sur la surface et un différentiel important doit être obtenu avec le contrôle.

- l'observation puis la quantification d'anticorps rhodaminés que nous serons amenés à déposer sur silicium.

La localisation des molécules sur surface solide est observée pour i) voir si la reconnaissance biomoléculaire s'est réalisée correctement, ii) comparer des intensités de fluorescence en fonction de paramètres précis (sondes différentes, solvants différents...).

3.5.a – Principe

Le principe de fonctionnement du scanner est le suivant. Un laser balayant la surface excite le fluorophore à une longueur d'onde donnée. Le signal fluorescent émis en retour est collecté par un tube photomultiplicateur couplé à un microscope confocal puis converti en un niveau d'intensité (voir schéma sur fig. 2.24). Les résultats décrits dans ce manuscrit sont obtenus en utilisant un scanner *Affymetrix 418 Array* conçu pour des échantillons au format standard lame de verre (75 x 22 mm²). Les images obtenues sont enregistrées au format .tif 16 bits ce qui correspond à $2^{16}-1$ niveaux de gris. La gamme d'intensité détectée est donc comprise entre 0 (noir) et 65535 (blanc). Pour plus de

commodité dans la présentation, les images peuvent être colorées artificiellement (format .bmp) avant d'être analysées puis quantifiées par un logiciel de traitement.

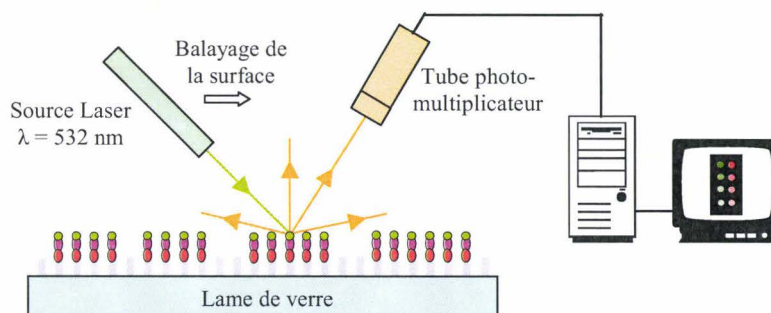


Figure 2. 24 : Principe de la détection d'un fluorophore (rhodamine) par un scanner à fluorescence.

La résolution spatiale du scanner peut descendre jusqu'à $10 \mu\text{m}/\text{pixel}$ et la sensibilité pendant balayage est inférieure à une molécule fluorescente par micron. Il est possible de jouer sur la puissance laser et le gain du photomultiplicateur pour moduler la sensibilité du scanner. La vitesse de lecture est également modulable de 5 secondes à une minute en résolution maximale. Enfin, l'aire de lecture est réglable et peut varier de 1 mm^2 jusqu'à la totalité de la lame.

3.5.b – Molécule fluorescente utilisée

Le fluorophore employé dans nos travaux est la tétraméthylrhodamine (Fig. 2.25). La longueur d'onde d'excitation est située dans la gamme 530-560 nm, la longueur d'onde d'émission à 572 nm. Ce spectre d'émission est compatible avec le canal Cy3 (absorption 556 nm, émission 570 nm) du scanner utilisé.

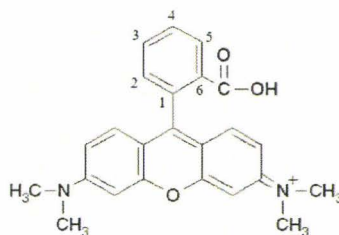


Figure 2. 25 : Structure de la 6-carboxytétraméthylrhodamine.

Les fonctions amines sont bloquées par fixation de groupes méthyls afin d'empêcher leur réaction avec la fonction acide d'une autre rhodamine. De plus, le groupe carboxy peut être placé en position 5 ou 6, les deux isomères étant présents en solution.

3.5.c – Applications générales

Plusieurs informations sont relevées après une observation en fluorescence. Il est tout d'abord possible de valider le traitement chimique d'une surface en vérifiant l'uniformité de ce traitement (fluorescence globale) et sa spécificité en comparant la fluorescence observée avec un contrôle négatif. Dans un deuxième temps, une fois le contrôle-qualité des lames réalisé, le scanner peut permettre de localiser des molécules biologiques (Ac rhodaminés par exemple, voir fig. 2.26) au cours de processus impliquant des interactions ligand-récepteur [Casey, 1988].

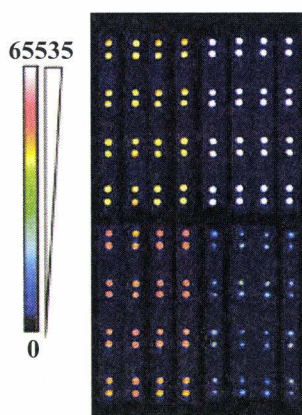


Figure 2. 26 : Image scannée d'une biopuce comportant 32 spots de peptides p21 $10^{-3}M$ (blanc), $10^{-4}M$ (rouge), $10^{-5}M$ (jaune) et NS4 $10^{-5}M$ (bleu) après incubation avec un sérum hépatite C p21 et NS4 positif [Melnik, 2002].

Dans ce cas précis, si les lames présentent des hétérogénéités ou des faibles signaux en fluorescence, de nouvelles mesures permettent d'évaluer les facteurs favorables ou défavorables (concentration de réactifs, temps d'incubation...) à la reconnaissance biomoléculaire.

4 - Point statistique et traitement des données

Un nombre important de données a été généré au cours de cette étude. Les travaux réalisés nécessitent souvent la comparaison de données (angles de contact, intensité de fluorescence, intensité électrique...) issues de l'analyse de différents échantillons ou collectées au sein d'un même substrat. De manière à pouvoir analyser de façon pertinente ces données, un traitement particulier selon une analyse statistique est indispensable. Au cours de ce paragraphe, nous présenterons les bases de l'analyse statistique effectuée [Miller, 1993; Schwartz, 1993].

L'analyse statistique d'un ensemble de valeurs expérimentales permet de dégager deux caractéristiques :

- l'indice de tendance centrale. Celui-ci indique la tendance la plus représentative du groupe de données en ramenant les valeurs à une valeur type qui se situerait au "centre" de la distribution.

- l'indice de dispersion. Cet indice exprime la variabilité des observations. Les données peuvent être concentrées autour de la tendance centrale ou au contraire très dispersées.

Il existe deux sortes de valeurs centrales : les valeurs de synthèse (moyennes) et les valeurs de position (médiane). Les moyennes indiquent le centre d'une série statistique. Parmi les différentes moyennes existantes (quadratique, harmonique...), la moyenne arithmétique est la plus utilisée. Elle est simplement calculée en additionnant toutes les valeurs x_1, x_2, \dots, x_n puis en divisant cette somme par l'effectif :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2-7)$$

Une fois ce paramètre calculé, il est nécessaire de voir comment les valeurs se répartissent autour de la moyenne. L'écart-type σ , qui est aussi la racine carrée de la variance, permet de caractériser l'écart plus ou moins grand de l'ensemble des valeurs par rapport à la valeur moyenne. La variance correspond à la moyenne arithmétique des carrés des écarts à la moyenne :

$$\sigma^2 = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad (2-8)$$

Si la dispersion est faible, cela signifie que les résultats sont groupés autour de la moyenne. Les tests statistiques issus de ces calculs supposent une loi de normale de distribution des données (ou distribution gaussienne). Ces tests dits paramétriques sont généralement utilisés quand la population ou les échantillons à analyser sont supérieurs à trente individus. Ils permettent par exemple de comparer les moyennes de plusieurs échantillons entre elles et de valider certaines techniques en calculant leur probabilité de réussite. La pertinence (ou puissance) d'un test est liée à plusieurs facteurs. Les tests paramétriques appliqués dans des conditions de normalité sont les plus puissants mais restent dépendants de la taille de l'échantillon et de la probabilité de risque sur les mesures. On considère que ces tests sont valables pour un nombre d'échantillons n supérieur à trente.

Quand $n < 30$, les tests entrant en jeu sont dits non paramétriques et ne font aucune hypothèse sur les distributions. Ces conditions sont identiques à celles observées durant nos travaux. En effet, le contrôle d'une surface en silicium est réalisé à l'aide d'une dizaine de mesures d'angle de contact et une valeur aberrante n'est jamais exclue des expériences. Or, la moyenne est fortement influencée par les valeurs aberrantes, ce qui signifie que la

distribution de la population s'écarte d'une distribution normale. Dès lors, l'indice de tendance centrale significatif est la médiane.

La médiane (ou Q_2) est la valeur de la variable qui partage la série statistique en deux sous-séries d'effectifs égaux. Elle divise donc exactement en deux la distribution de l'échantillon de manière à ce que 50% des données soient au-dessus et 50% au-dessous. Il est donc nécessaire de ranger la série par ordre croissant. Si n est impair, la médiane correspond à l'observation centrale. Par contre, si n est pair, la médiane est la moyenne des deux termes centraux. La dispersion autour de la médiane s'exprime selon les quartiles Q_1 et Q_3 . Le premier quartile Q_1 est calculé tel que 25% des termes de la série lui soient inférieurs. Inversement, 25% des termes sont supérieurs au troisième quartile Q_3 . La valeur $Q_3 - Q_1$ est nommée l'intervalle interquartile. Concernant les représentations graphiques, nous avons utilisé une représentation simplifiée du diagramme en boîtes (ou de Tuckey, fig. 2.27).

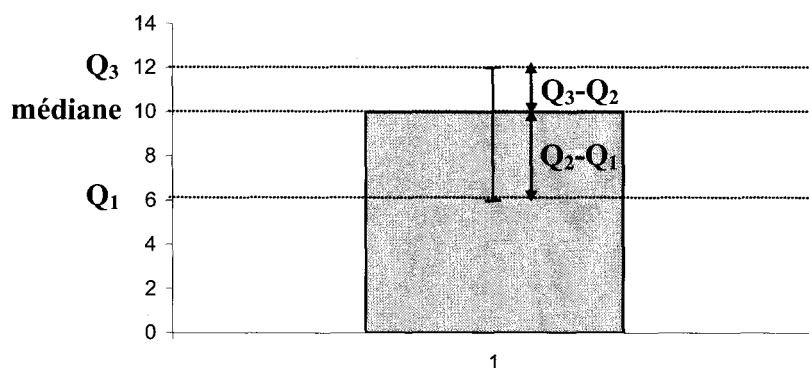


Figure 2. 27 : Représentation de Tuckey des écarts interquartiles autour d'une valeur médiane.

La médiane n'est que peu influencée par les valeurs aberrantes ce qui permet de mieux représenter la position d'un échantillon sur une échelle de valeurs. Il est ainsi possible de comparer simplement des variations de médianes encadrées par les quartiles.

Chapitre III - Caractérisation chimique d'un nanogap

| | |
|---|-----------|
| 1 – PROBLEMATIQUE DE LA CHIMIE DANS UN NANOGAP | 68 |
| 2 – FABRICATION DES NANO ELECTRODES | 70 |
| 2.1 – GEOMETRIE DES ELECTRODES | 70 |
| 2.2 – PROTOCOLE EXPERIMENTAL | 71 |
| 2.3 – OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE..... | 72 |
| 3 – SYNTHÈSE DE LA FONCTION SEMICARBAZIDE ET CONTROLE-QUALITE DES SURFACES..... | 73 |
| 3.1 – FORMATION DU SEMICARBAZIDE | 73 |
| 3.2 - REVELATION DES SURFACES..... | 74 |
| 3.3 - QUANTIFICATION DES LAMES | 75 |
| 4 – ETUDE DU GREFFAGE PAR GONIOMETRIE | 76 |
| 4.1 - INTRODUCTION..... | 76 |
| 4.2 - PARTIE EXPERIMENTALE..... | 76 |
| 4.3 - RESULTATS..... | 77 |
| 4.4 - CONCLUSIONS | 78 |
| 5 – SYNTHÈSE ET DEPOT D'UNE NANOPARTICULE D'OR α-OXO ALDEHYDE..... | 78 |
| 5.1 - LES NANOPARTICULES COLLOÏDALES | 79 |
| 5.2 - SYNTHÈSE DES PARTICULES FONCTIONNELLES | 81 |
| 5.2.a – Réactifs mis en jeu | 81 |
| 5.2.b - Préparation des nanoparticules d'or fonctionnelles COCHO..... | 82 |
| 5.2.c - Préparation des particules témoins or-C(O)NH ₂ | 83 |
| 2.2.e - Suivi des réactions par spectrométrie-vis et DLS..... | 83 |
| 5.3 - TESTS DE REACTIVITE PAR PRECIPITATION AU SEL D'ARGENT | 86 |
| 5.4 - DEPOT SUR LES NANO ELECTRODES..... | 88 |
| 5.5 - CONCLUSIONS | 90 |
| 6 – ETUDE PAR AFM DE FORCE DU NANOGAP..... | 91 |
| 6.1 - LA MICROSCOPIE A FORCE CHIMIQUE | 92 |
| 6.2 - OBSERVATION DU NANOGAP EN AFM CLASSIQUE..... | 93 |
| 6.3 – ETUDE DU NANOGAP NON FONCTIONNALISE | 94 |
| 7 - CONCLUSIONS | 95 |

Cette étude propose de détecter l'interaction modèle entre la protéine A et les immunoglobulines G sériques par l'intermédiaire d'un signal électrique. L'approche choisie consiste à fixer les molécules entre deux électrodes en or séparées d'une distance inférieure à cent nanomètres puis à mesurer un changement éventuel de la conductivité. Des traitements chimiques particuliers comme la silanisation ont été choisis afin d'immobiliser la protéine A dans l'espace inter-électrodes.

Cependant, à de telles dimensions, il n'est pas évident de vérifier la réactivité du gap vis-à-vis de ces traitements. En effet, la surface en silicium et la géométrie des électrodes en or peuvent bloquer l'insertion des biomolécules dans les quelques micromètres carrés concernés. Ce chapitre présente donc une analyse du comportement de cette aire d'intérêt par rapport à la chimie d'immobilisation choisie.

1 – Problématique de la chimie dans un nanogap

Le silicium orienté (100) couvert d'une couche d'oxyde de 200 nm, n'est pas une surface régulière. Pendant les traitements chimiques, les molécules réactives sont distribuées aléatoirement sur le substrat formant ainsi des îlots discontinus. De plus, il n'existe que peu d'études dans la littérature sur la fonctionnalisation chimique de nanogaps et l'immobilisation contrôlée de biomolécules. La méthode retenue afin de détecter la forte interaction entre la protéine A et les IgG humaines dans le gap consiste à amplifier une hausse éventuelle de conductivité à l'aide d'un anticorps secondaire anti-humain marqué avec des nanoparticules d'or de diamètre 25 nanomètres. Pour favoriser le transfert électronique entre chaque électrode, il est nécessaire d'utiliser un gap de faible distance susceptible de ne piéger qu'un faible nombre de biomolécules (et donc de nanoparticules d'or). Pour cela, les électrodes que nous utilisons dans le chapitre V comportent un gap variable de 30 à 90 nanomètres, soit au mieux trois billes d'or disposées côté à côté. Le protocole de fabrication des nanostructures est détaillé dans la **partie 2**.

Une fois les nanoélectrodes conçues, la surface doit être traitée chimiquement pour immobiliser la protéine A dans le gap. La stratégie employée consiste à silaniser nos surfaces pour obtenir une monocouche de fonctions amines sur la surface. La protéine A peut ensuite s'adsorber sur ce support hydrophile par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques. Cependant, rien n'indique que notre stratégie d'immobilisation fonctionne dans un espace nanométrique et piégé entre des électrodes métalliques. C'est à ce stade qu'entre en jeu l'interaction basée sur l'immobilisation chimiosélective de peptides glyoxylyls sur des lames de verre fonctionnalisées par la fonction semicarbazide (**partie 3**). Ce traitement, applicable à une surface de silicium oxydée, aboutit à la formation d'un

lien covalent α -oxo semicarbazone très stable dont la silanisation amine est la première étape de synthèse.

L'objectif de ce chapitre consiste à étudier si cette chimie est applicable à nos structures (voir principe sur fig. 3.1). Si tel est le cas, nous prouvons que l'immobilisation du complexe [protéine A – IgG – anticorps or] dans un nanogap est contrôlée et sélective. Il s'agit d'une condition impérative avant de réaliser des mesures électriques.

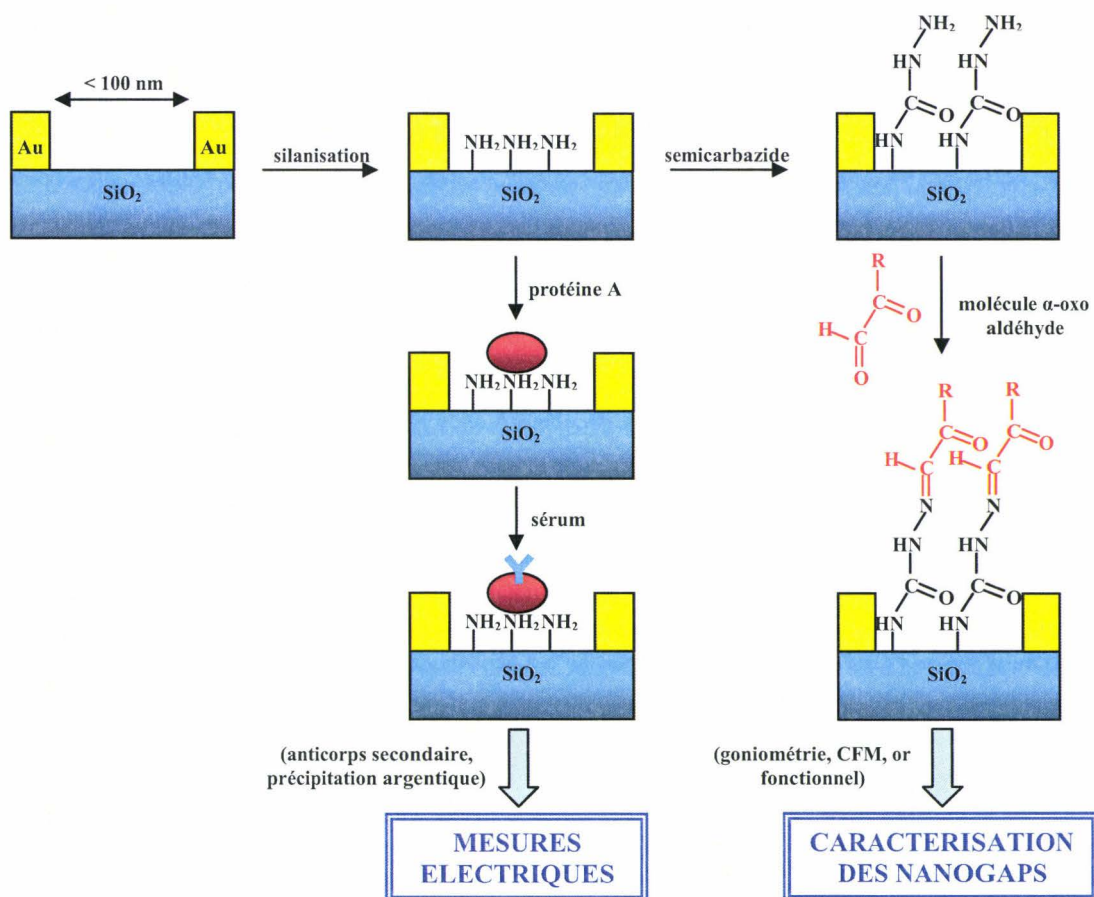


Figure 3. 1: Principe de l'immobilisation des biomolécules et de l'étude du nanogap.

Dans un premier temps, les différentes étapes de la synthèse du semicarbazide sont étudiées par des mesures d'angle de contact (**partie 4**). Ces mesures sont mises à profit afin d'évaluer le mouillage des électrodes au niveau macroscopique. Une première alternative (**partie 5**) consiste à fabriquer des nanoparticules d'or portant la fonction glyoxyl puis à les déposer dans un nanogap présumé semicarbazide. Des observations en microscopie électronique permettent d'observer la chimiosélectivité des particules et donc de vérifier si le gap porte effectivement la fonction d'ancrage.

La seconde alternative (**partie 6**) vise à utiliser la technique récente de microscopie à force chimique (ou CFM). Celle-ci utilise une pointe de mesure modifiée chimiquement afin de sonder les forces d'adhésion dans le nanogap. Dans notre cas, une pointe dérivée par la streptavidine se déplace le long de la surface préalablement biotinyllée. Cette dernière est obtenue après réaction entre la surface semicarbazide et la biotine α -oxo aldéhyde (notée COCHO).

Enfin, un bilan est établi dans la **partie 7** de ce chapitre.

2 – Fabrication des nanoélectrodes

Les nanogaps sont préparés par lithographie électronique sur un substrat de silicium comportant un oxyde thermique de 200 nm. Cette technique n'étant pas adaptée à la réalisation de larges motifs, les plots de contact (500 μm de côté) utilisés pour la connexion des électrodes au dispositif de mesure électrique, sont conçus par photolithographie puis *lift-off* d'une double couche métallique Ti/Au 10/40 nm.

2.1 – Géométrie des électrodes

Le dessin par informatique des motifs, nécessaire afin de guider *l'e-beam*, est organisé comme suit. Chaque surface comprend cent paires d'électrodes (dix lignes x dix colonnes) localisées sur une surface totale de 8,7 x 6,7 mm² (Fig. 3.2).

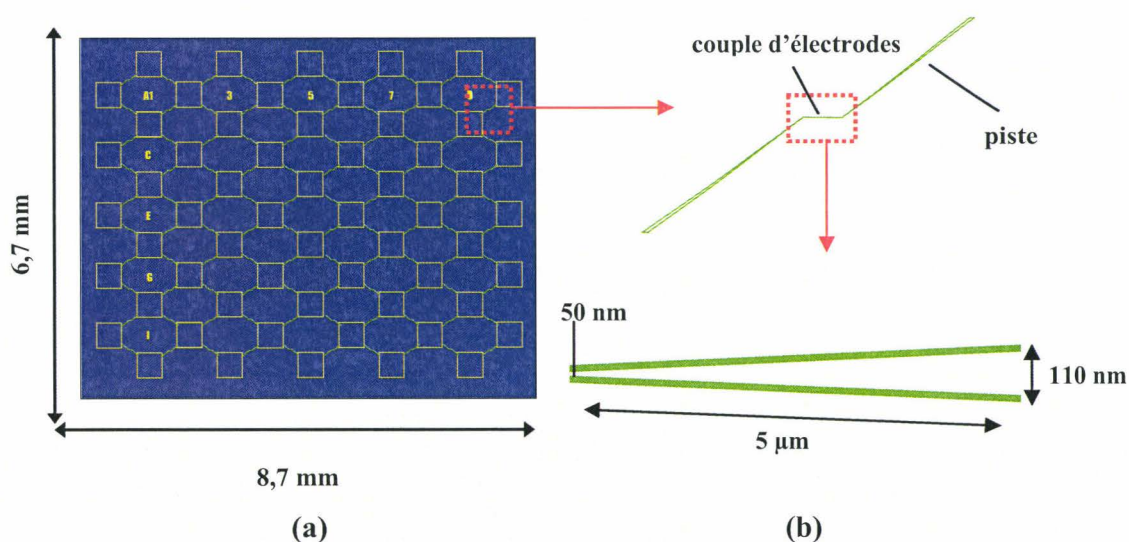


Figure 3. 2 : Géométrie des nanogaps.

(a) Vue d'ensemble du dispositif comportant cent paires d'électrodes. Les plots de contact sont représentés en jaune, les pistes et les électrodes en vert. (b) Zoom sur les pistes et les électrodes.

Chaque électrode est dessinée selon une longueur de cinq micromètres pour une épaisseur de 150 nanomètres. Enfin, les gaps prévus sont volontairement supérieurs de 20 nanomètres aux dimensions désirées. Il est en effet classique d'observer après la fin du processus des motifs métalliques supérieurs d'une dizaine de nanomètres à ceux souhaités initialement. Ce phénomène est donc pris en compte en augmentant d'autant plus la distance inter-électrodes.

2.2 – Protocole expérimental

Le procédé de fabrication est détaillé dans le tableau 3.1. L'*e-beam* est réalisé sur une double couche conventionnelle de résine COPO 4% MMA8,5 / PMMA 3% 495K [Brands, 2005; Kryszewski, 1998]. Le film supérieur est une couche de résine positive polyméthyl méthacrylate 3% en masse de poids moléculaire 495000 (longueur de la chaîne) dans l'anisole. Celui-ci est moins sensible au bombardement électronique que le film inférieur, un copolymère dérivé. Après développement par une solution de méthylisobutylcétone (MIBK), les électrodes sont métallisées par procédé *lift-off* d'une bicouche Ti/Au 5/15 nm (Tab. 3.1).

| | Echantillon | Wafer Si (100)/SiO ₂ 200 nm |
|---------------------------------------|-----------------|--|
| Définition des nanogaps | Nettoyage | . Dégraissage CHCl ₃ . Décapage H ₂ SO ₄ :H ₂ O ₂ 1:1 (v:v) 1 heure . Plasma O ₂ 50 secondes 100W 0,1T . Rinçage eau mQ puis IPA, séchage à l'azote |
| | Résinage | . EL 4% (maa 8,5) épaisseur 497 Å . Recuit 1 mn à 80°C puis 30 mn à 170°C . PMMA 3% (495 K) épaisseur 273 Å . Recuit 1 mn à 80°C puis 30 mn à 170°C |
| | <i>E-beam</i> | Dose du faisceau : 220 μC/cm ² Energie : 50 kV |
| | Révélation | Bain MIBK:IPA 1:2 (v:v) 50 sec |
| | Métallisation | Ti 5nm puis Au 15nm |
| | <i>Lift-off</i> | . Bain acétone 6h sous ultrasons . Rinçage eau mQ puis IPA |
| Définition des plots de contact | Résinage | . Spin-coating résine S1818 épaisseur 1,43μm . Recuit 1 mn à 120°C |
| | Insolation UV | 8 sec / puissance lampe 7-7,2 mW/cm ² Distance masque chromé-surface : 40 μm |
| | Révélation | . Bain MF319 40 sec sous agitation mécanique . Rinçage eau mQ 15 sec puis séchage à l'azote |
| | Métallisation | Ti 10nm puis Au 40nm |
| | <i>Lift-off</i> | . Bain acétone sous ultrasons 40 minutes . Rinçage eau mQ puis IPA |

Tableau 3. 1 : Processus de fabrication des nanoélectrodes par lithographie électronique.

La conception des plots met en jeu un masque optique aligné sur les nanoélectrodes avant de procéder à l'insolation UV. L'alignement doit être précis afin de connecter les motifs avec les plots. En effet, les pistes ont été prévues pour empiéter de seulement 5 μm sur l'espace consacré pour les plots.

2.3 – Observations en microscopie

Certains défauts sont apparus en microscopie optique après le résinage S1818 et se sont répercutés jusqu'au *lift-off* (voir clichés sur fig. 3.3). L'image (a) montre un débordement du faisceau UV durant l'insolation. Ce phénomène peut provenir d'un défaut initial du masque en chrome. La figure parasite ainsi formée se reproduit après le trempage dans l'acétone et court-circuite les électrodes.

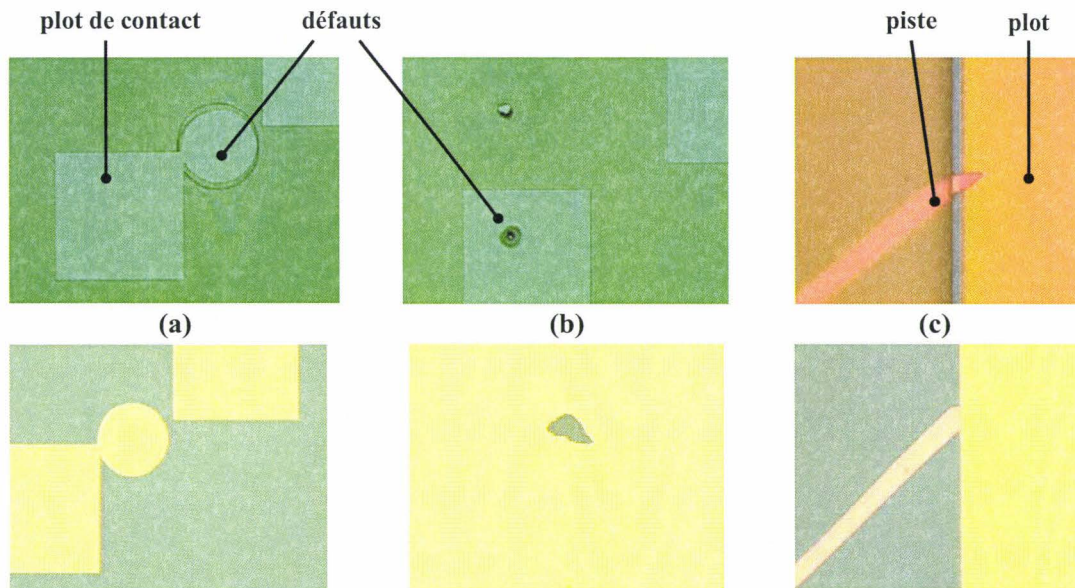


Figure 3.3 : Clichés en microscopie optique des structures formées durant le dépôt de la résine photosensible. Les images supérieures sont réalisées avec un filtre pour ne pas irradier la résine avec une lumière classique. Celles du bas sont prises après le *lift-off* final.

Des déchirures peuvent apparaître (b) et sont probablement causées par la présence de poussières sur la tournette durant le résinage. Celles-ci bloquent l'irradiation localisée d'une faible surface qui sera découverte pendant le *lift-off*. Cependant, ce genre d'inconvénient est très rare et ne concerne qu'un couple d'électrodes sur 100 environ. Les connexions entre les pistes et les plots de contact (c) se sont parfaitement déroulées.

L'observation des nanostructures en microscopie électronique à balayage (Fig. 3.4) montre clairement que les gaps obtenus sont inférieurs d'une vingtaine de nanomètres à ceux dessinés par informatique.

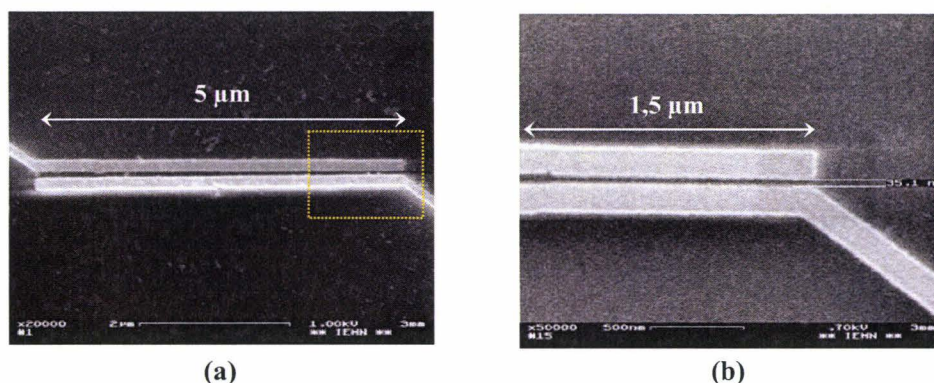


Figure 3. 4 : Clichés MEB des électrodes après fabrication. (a) Vue globale. (b) Zoom sur le gap minimal (35,1 nm).

3 – Synthèse de la fonction semicarbazide et contrôle-qualité des surfaces

L'UMR 8525 de l'Institut de Biologie de Lille (IBL) développe l'immobilisation chimiosélective de peptides glyoxylyls sur lames de verre fonctionnalisées par des fonctions semicarbazide. Cet ancrage entraîne la formation d'une liaison α -oxo semicarbazone très stable et facile à mettre en oeuvre [Duburcq, 2004]. Cette chimie est mise à profit dans notre projet pour immobiliser, d'une part, la protéine A par adsorption sur une monocouche hydrophile et pour valider, d'autre part, sur verre le traitement de chaque dispositif comprenant des nanoélectrodes. Ainsi, durant chacun des traitements de nos surfaces en silicium, un nombre déterminé de lames de verre a été plongé dans les mêmes solutions chimiques et dans les mêmes conditions expérimentales.

3.1 – Formation du semicarbazide

La fonctionnalisation des lames de verre semicarbazide met en jeu plusieurs étapes de trempage (Fig. 3.5).

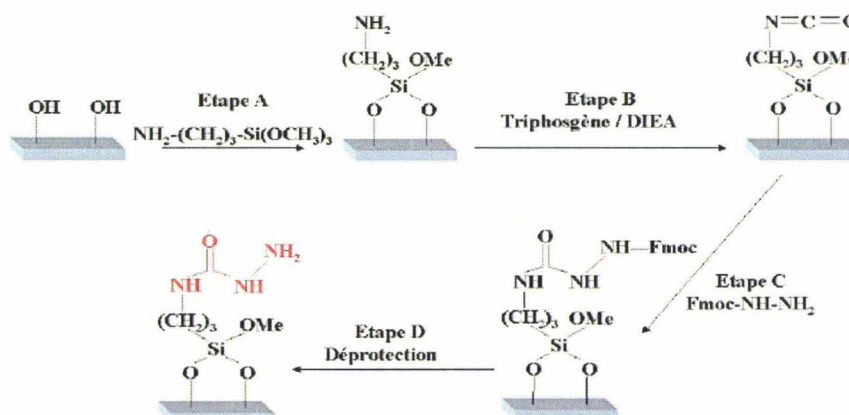


Figure 3. 5 : Schéma de synthèse des lames semicarbazides.

La première étape (voir protocole complet tableau 3.2) consiste à décaper la surface *via* une solution de piranha (eau oxygénée / acide sulfurique) puis à silaniser amine la surface (**A**) par de l'aminopropyltriméthoxysilane (APTMS). Ensuite, les lames sont plongées dans une solution de triphosgène / diisopropyléthylamine (DIEA) de manière à former un isocyanate (**B**). Les substrats sont alors traités par de la 9-fluorénylméthoxycarbonylhydrazine Fmoc-NH-NH₂ (**C**), puis déprotégés (**D**) à l'aide d'une solution de DMF contenant de la pipéridine et du DBU (1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène). Enfin, les lames sont stockées à température ambiante dans une enceinte close et purgée à l'azote.

| | |
|---|--|
| Décapage | . Piranha H ₂ O ₂ :H ₂ SO ₄ 1:1 pendant 1 heure . 3 rinçages eau mQ . 1 rinçage MeOH |
| Silanisation | . APTMS 3% dans MeOH/eau mQ 95% 30mn sous ultrasons . 1 rinçage MeOH . 2 rinçages eau mQ . 1 rinçage MeOH . étuve 110°C 15mn |
| Formation de l'isocyanate | . Triphosgène 100mM et DIEA 800mM en solution dans 1,2-dichloroéthane 2 heures sous ultrasons |
| Fonctionnalisation par semicarbazide | . Fmoc-NH-NH ₂ 22mM dans DMF 2 heures sous ultrasons . 2 rinçages DMF |
| Clivage du Fmoc | . Pipéridine 0,2% (v:v) et DBU 2% (v:v) dans DMF 30 minutes . 1 rinçage DMF . 2 rinçages eau mQ . 1 rinçage MeOH . Séchage sous vide puis stockage sous N ₂ |

Tableau 3. 2 : Protocole de synthèse.

Les lames de verre sont ensuite contrôlées en fluorescence. Il est nécessaire de vérifier la bonne marche de la fonctionnalisation semicarbazide et de la quantifier.

3.2 - Révélation des surfaces

Ainsi, une sonde peptidique α -oxo aldéhyde (notée COCHO) marquée à la rhodamine et son contrôle négatif avec une extrémité amide ont été synthétisés.



Un lien semicarbazone stable s'établit entre la sonde dite COCHO et la lame de verre semicarbazide alors qu'il ne se produit qu'une simple physisorption éliminée en grande partie durant les phases de lavage avec la sonde C(O)NH₂. Une lecture au scanner *Affymetrix 418 Array* permet ensuite de quantifier la fluorescence. Le protocole de révélation que nous avons utilisé est le suivant (Tab. 3.3).

Les lames semicarbazides sont trempées pendant une heure à 37°C dans un bain contenant le peptide rhodaminé (soit COCHO, soit amide) mis en solution à 0,1 mM dans un tampon acétate 100 mM à pH=5,5. Les surfaces sont ensuite placées dans un bain de K₂HPO₄ à 5% dans l'eau mQ pendant deux heures sous ultrasons, puis trente minutes dans un tampon à pH=5,5 de TRIS [Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane] en présence d'acide acétique et de Tween 20 (0,1%). Enfin, les substrats sont séchés sous vide puis scannés. La fluorescence est détectée en utilisant la longueur d'onde de détection du Cy3.

| | |
|--|--|
| Réaction avec peptide rhodaminé | <ul style="list-style-type: none"> . Sonde rhodamine-COCHO - ou C(O)NH₂ - 0,1mM dans tampon acétate 100mM pH=5,5 . 2 rinçages eau mQ |
| Lavages | <ul style="list-style-type: none"> . K₂HPO₄ 5% dans eau mQ 2 heures sous ultrasons . 2 rinçages eau mQ . TRIS 100mM tween 20 0,1% pH=5,5 réglé par acide acétique 30mn . 2 rinçages eau mQ . 1 rinçage MeOH . Séchage sous vide puis stockage sous N₂ |

Tableau 3. 3 : Protocole de contrôle des lames.

3.3 - Quantification des lames

L'intensité de fluorescence rend compte de la densité de groupements semicarbazides accessibles à la surface des supports. Le contrôle consiste à comparer les intensités de fluorescence entre les deux différentes sondes afin de vérifier le différentiel et donc la réactivité des fonctions semicarbazides. Le logiciel du scanner fournit une image en niveau de gris (.tiff) souvent transformée en image de couleur (.bmp) par commodité. Par convention, la couleur noire correspond à une absence de signal et le blanc à un signal maximal saturé. La lame 1 (Fig. 3.6) est une image type de la fluorescence émise après trempage dans une solution de sonde carboxamide rhodaminée (faible signal), à la différence de la lame 2 traitée par la sonde spécifique COCHO (signal important).

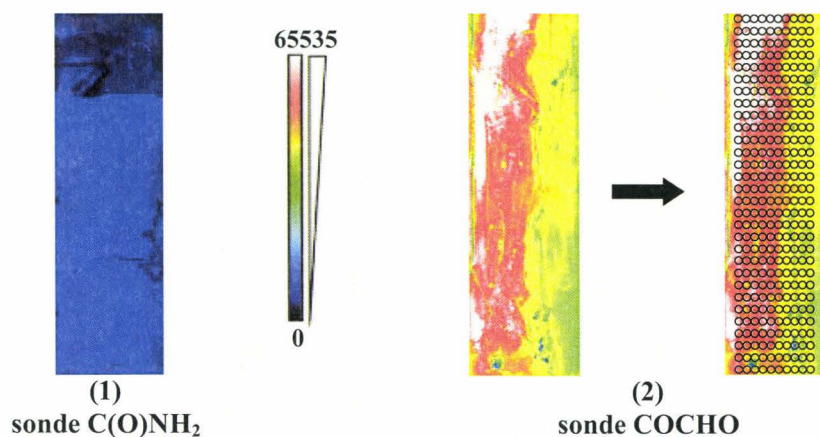


Figure 3. 6 : Images .tif de la fluorescence émise après traitement par les deux sondes contrôles.

L'image est ensuite segmentée à l'aide du logiciel *ScanAlyse* distribué par l'Université de Stanford. Une grille régulière de spots virtuels de 300 μm de diamètre, comprenant 10 colonnes et 30 lignes, est répartie sur la surface. La dernière étape consiste à déterminer l'intensité de fluorescence de chaque spot. Le logiciel calcule automatiquement les valeurs des intensités et les visualise sous un format texte (.dat). Ces fichiers sont traités sous *Excel* de la manière suivante : la moyenne ainsi que l'écart-type des 300 valeurs sont calculés pour chaque type de sonde afin de vérifier l'homogénéité des lames. Les critères permettant de valider ou rejeter une fonctionnalisation ont été définis par rapport aux valeurs habituelles obtenues dans le laboratoire. La fluorescence moyenne sur la lame après réaction avec la sonde positive doit être au moins quatre fois supérieure à celle obtenue avec la sonde contrôle carboxamide et l'écart-type de fluorescence au sein d'une même lame ne doit pas dépasser 15% du signal moyen.

4 – Etude du greffage par goniométrie

4.1 - Introduction

La mesure de l'angle de contact est directement liée aux forces interfaciales agissant entre la goutte déposée et la surface. Cependant, déposer une goutte de solvant particulier directement sur une surface Si/SiO₂ portant nos nanoélectrodes en or n'aurait aucun sens, étant donné l'hétérogénéité de la surface au niveau microscopique et la difficulté pour reproduire les mesures. Nous avons donc étudié la mouillabilité des nanoélectrodes en distinguant deux types de surface homogènes : une surface vierge comportant un oxyde de silicium de 200 nm, similaire au nanogap, et la même surface couverte d'une double couche de titane/or afin d'imiter à plus grande échelle les électrodes. La fonctionnalisation du gap nécessite le trempage de la surface par différentes solutions de composés organiques.

4.2 - Partie expérimentale

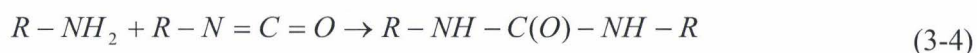
Un wafer de silicium comportant un oxyde thermique de 200 nm est découpé en dix carrés de un centimètre de côté environ (**surface 1**). Cinq fragments sont couverts d'une double couche de titane/or 5/15 nm par évaporation sous vide (**surface 2**). Les échantillons, après un nettoyage préalable par plasma à oxygène de 50 secondes, sont fonctionnalisés semicarbazide (voir le tableau 3.2). Entre chaque étape déterminante - le plasma, la silanisation amine, la protection Fmoc et le semicarbazide final - un fragment issu de chaque groupe **1** et **2** est retiré, lavé à l'eau mQ puis séché à l'azote. Des mesures d'angle de contact sont ensuite réalisées avec de l'eau mQ en dix points de la surface.

4.3 - Résultats

L'étape conduisant à la formation de l'isocyanate n'est pas contrôlée par mesure d'angle de contact. En effet, le groupement $-N=C=O$ est une terminaison très réactive qui réagit avec l'eau afin de former un acide carbamique. Celui-ci est susceptible de se décomposer en amine avec perte de CO_2 :



Passée cette première étape, l'amine formée peut réagir avec un isocyanate contigu n'ayant pas encore réagi avec l'eau afin de former une urée :



Le tableau 3.4 résume l'ensemble des valeurs mesurées après un temps de stabilisation de la goutte d'eau de dix secondes.


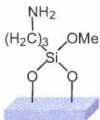
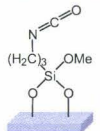
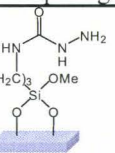
| Etape | Si/SiO ₂ 200nm (°) | | | Si/SiO ₂ 200nm + Ti/Au 5/15nm (°) | | |
|---|----------------------------------|-------------|----------------|--|-------------|----------------|
| | Q ₁ | médiane | Q ₃ | Q ₁ | médiane | Q ₃ |
|  plasma O ₂ | 28,7 | 29,5 | 30,4 | 41,9 | 42,5 | 42,9 |
|  amine | 24,5 | 25,1 | 26,3 | 42,8 | 45,7 | 47,6 |
|  Fmoc protégé | 49,5 | 50,9 | 51,6 | 43,9 | 44,8 | 47,3 |
|  semicarbazide | 46,8 | 47,2 | 47,7 | 43,5 | 45,8 | 46,3 |

Tableau 3. 4 : Angles de contact en fonction du type de surface et de l'étape de synthèse.

La surface 1 (Si/SiO₂) amine est plus hydrophile que la surface fonctionnalisée semicarbazide (angles de 47,2 et 29,5° respectivement), ce qui la rend théoriquement plus sensible aux contaminants extérieurs. L'étape intermédiaire menant à la protection Fmoc confirme une hausse de l'hydrophobie de la surface (Fig. 3.7).

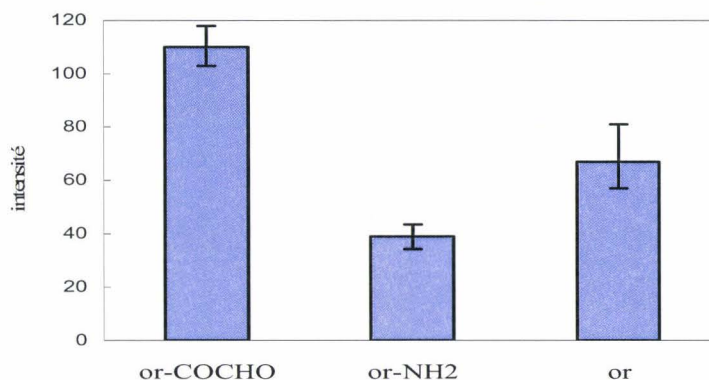


Figure 3. 7 : Evolution des angles de contact.

Les résultats obtenus d'après la surface **2** sont plus linéaires. Les médianes n'évoluent quasiment pas ($\sim 45^\circ$). Nous pouvons donc en déduire une certaine hydrophobicité intrinsèque de la surface après le nettoyage par plasma. Une expérience complémentaire consiste à déposer sur des échantillons **2** séparés après chaque étape de synthèse un faible volume ($\sim 50 \mu\text{L}$) du milieu réactionnel utilisé pour l'étape suivante. Dans l'ensemble des cas, la solution ne se dépose pas et tend à être chassée de la surface.

4.4 - Conclusions

La synthèse de la fonction semicarbazide sur Si/SiO_2 est maîtrisée expérimentalement et de surcroît caractérisée par fluorescence. Inversement, l'étude d'une surface similaire présentant une couche d'or montre un comportement hydrophobe lié au métal. L'or est connu pour ne pas réagir avec les silanes, ce qui explique la linéarité des angles de contact mesurés sur une surface entièrement en or.

5 – Synthèse et dépôt d'une nanoparticule d'or α -oxo aldéhyde

L'objectif de cette étude consiste à contrôler la fonctionnalisation semicarbazide dans un nanogap à l'aide d'un réactif fonctionnel. Il est donc nécessaire d'insérer entre les électrodes une entité de dimension inférieure au gap et présentant la fonction α -oxo aldéhyde (voir principe, fig. 3.8). De plus, cette entité doit être facilement observable dans les nanostructures. Pour cela, notre choix s'est porté sur l'utilisation de nanoparticules d'or colloïdal.

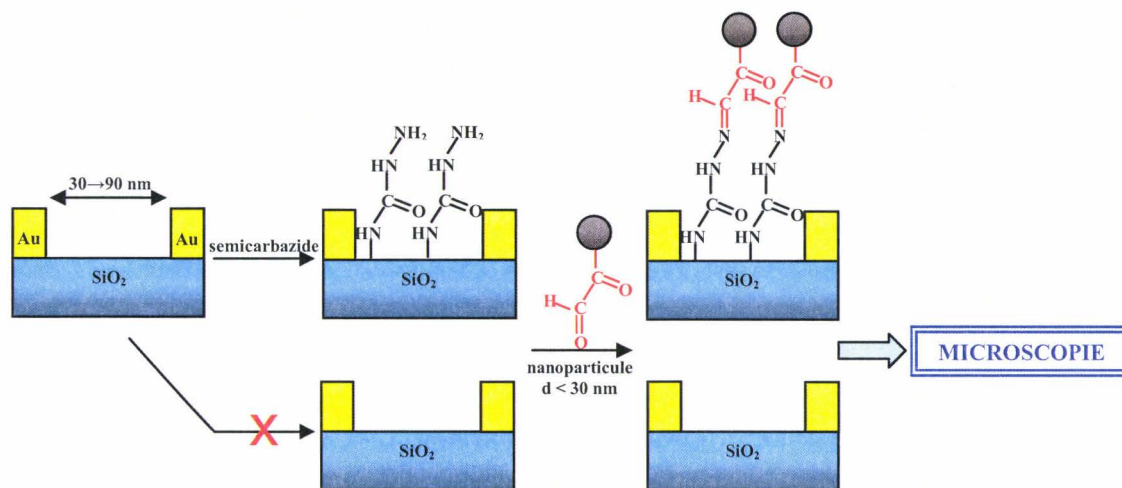


Figure 3. 8 : Principe de l'étude du nanogap par des particules fonctionnelles.

Ces particules, aisément observables en microscopie électronique, forment un lien covalent avec des réactifs organiques par l'intermédiaire de groupements thiolés ou de ponts disulfures. Il est donc envisageable, à l'aide d'un peptide α -oxo aldéhyde adéquat, de synthétiser des colloïdes d'or (diamètre < 30 nm) susceptibles de s'ancrer chimiosélectivement dans le gap.

5.1 - Les nanoparticules colloïdales

Le terme "colloïde" désigne des dispersions de particules stabilisées électrostatiquement dont le diamètre individuel est supérieur à dix nanomètres. La modification de particules colloïdales avec des biomolécules est très utilisée pour amplifier des réactions de biorecognition [Lin, 2000; Patolsky, 2000; Zhao, 2001] ou pour utiliser leurs propriétés électroniques de transduction [Dubertret, 2001; Park, 2002; Powell, 1997]. De nombreuses études reportent des méthodes de préparation de particules d'or protégées par des monocouches d'alkanethiolates. Ces nanoparticules (NP) modifiées combinent les propriétés de leur noyau métallique à leur capacité de liaison avec une large gamme de molécules organiques. A titre d'exemple, il est possible de dériver des colloïdes d'or avec des thiols comportant des groupes fonctionnels amides.

Quand une suspension colloïdale est stable, deux types de forces se compensent mutuellement : une force de répulsion qui tend à écarter les particules chargées de la même manière les unes des autres et une force d'attraction de types LW qui les rassemble afin de minimiser l'énergie potentielle du système. Généralement, les nanoparticules d'or (NPAu) nues sont chargées négativement en raison des groupements citrates présents en surface. Ces derniers sont issus de la synthèse des colloïdes souvent réalisées par réduction en

milieu aqueux de HAuCl_4 par du citrate de sodium [Hostetler, 1998]. La présence de cette charge en surface de la particule affecte la distribution des ions dans la région interfaciale. Cette répartition est modélisée par une double couche (Fig. 3.9) qui comprend une région intérieure (la couche de Stern) dans laquelle les ions positifs sont fortement retenus par attraction électrostatique. Cette couche se déplace avec la particule et abaisse sa charge réelle. La concentration de ces ions diminue en s'éloignant de la particule^a. Il existe une seconde couche diffuse, dite couche de Gouy, formant un nuage autour du noyau qui devient nul à une certaine distance de la particule. Quand cette dernière se déplace en suspension, les ions présents dans la couche diffuse se déplacent également. La densité de charge est importante près du colloïde et diminue graduellement jusqu'à zéro quand la concentration des ions positifs et négatifs devient égale. Le potentiel à la frontière délimitant la couche diffuse et la solution correspond au potentiel zéta. Celui-ci dépend du pH, de la force ionique du milieu et donc à la fois du type et de la concentration ionique en solution [Hunter, 1971]. Il est mesurable par électrophorèse et donne une indication sur la stabilité potentielle du système colloïdal.

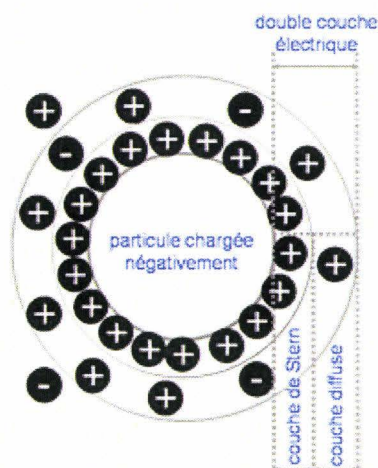


Figure 3.9 : Schéma de la double couche électrique entourant une particule colloïdale.

L'équilibre de la double couche peut être rompu quand les particules se rapprochent et les forces de LW deviennent prédominantes : il se produit alors l'agglomération des particules jusqu'à une taille approchant le millimètre. Un changement de pH ou de salinité peuvent être à l'origine de ce phénomène en atteignant le point de charge nulle des particules ou bien en comprimant la couche diffuse. Cependant, plusieurs solutions existent afin de remédier à ce problème : il peut s'agir de couches protectrices déposées en surface des particules (agents tensioactifs, polymères, protéines...) afin de stabiliser la suspension.

^a la force d'attraction varie inversement avec r^6 , r étant la distance au centre de la particule

Afin de conjuguer des molécules organiques à de l'or colloïdal, il est nécessaire de tirer profit de l'attraction entre les NP chargées négativement et les différents sites positifs disponibles qui peuvent être des poches hydrophobes dans le cas de protéines. L'existence de liaisons datives entre l'or et des groupes sulfhydryls est également démontrée [Sasaki, 1997]. Dans ce dernier cas, plusieurs méthodes de synthèse sont envisageables : de longues chaînes thiolées peuvent être introduites directement durant la réduction d'acide chloroaurique afin de stabiliser et dériver en une seule étape les particules produites [Bartz, 1999; Liu, 2000]. La procédure usuelle consiste à mélanger dans l'eau un thiol (ou un disulfure) avec l'acide tétrachloroaurique HAuCl_4 avec un excès de NaBH_4 [Svarovsky, 2005].

Une alternative consiste à mettre en présence les agents thiolés sur des NP préformées non dérivées, c'est-à-dire nues. Il est nécessaire de rompre la couche ionique négative de surface afin d'en réduire les effets masquants. Ceci est généralement réalisé par une plus grande affinité du nouveau ligand envers l'or. Dans un second temps, après accroche du ligand, il est nécessaire de bloquer les derniers sites libres avec par exemple du polyéthylène glycol, de la BSA ou de la gélatine [Birrell, 1987].

5.2 - Synthèse des particules fonctionnelles

5.2.a – Réactifs mis en jeu

Les particules d'or colloïdal sont fournies par la société *Sigma*. Le diamètre annoncé est de 20 ± 2 nanomètres pour une concentration de $5,2 \cdot 10^{12}$ particules par mL de solution. D'autres rayons sont disponibles commercialement mais celui-ci a paru plus adapté aux deux conditions posées par le contrôle des nanogaps : les particules doivent être visible en microscopie électronique (limites de résolution de notre appareil ~ 10 nm) tout en étant assez petite pour permettre un contrôle, c'est à dire un fort remplissage, des gaps. Le produit commercial présente un pic d'absorption vers la longueur d'onde 520 nm et varie fréquemment durant les procédures de conjugaison [Mangeney, 2002] : cette donnée sera donc suivie durant l'addition des peptides fonctionnels par spectrométrie dans le visible.

Deux peptides 6-mères, synthétisés par Marjorie LEFEBVRE et Nathalie OLLIVIER respectivement doctorante et ingénieur d'étude à l'IBL, porteurs d'un pont disulfure ont été mis en réaction avec les particules d'or. Le peptide **1** présente la fonction α -oxo aldéhyde (COCHO en vert sur la fig. 3.10) [Olivier, 2003]. Le peptide **2** est quand à lui utilisé en tant que contrôle de la chimiosélectivité *via* le groupe fonctionnel

carboxamide (en rouge). Celui-ci ne peut se lier de manière covalente avec la fonction semicarbazide mais seulement se physisorber de manière non spécifique.

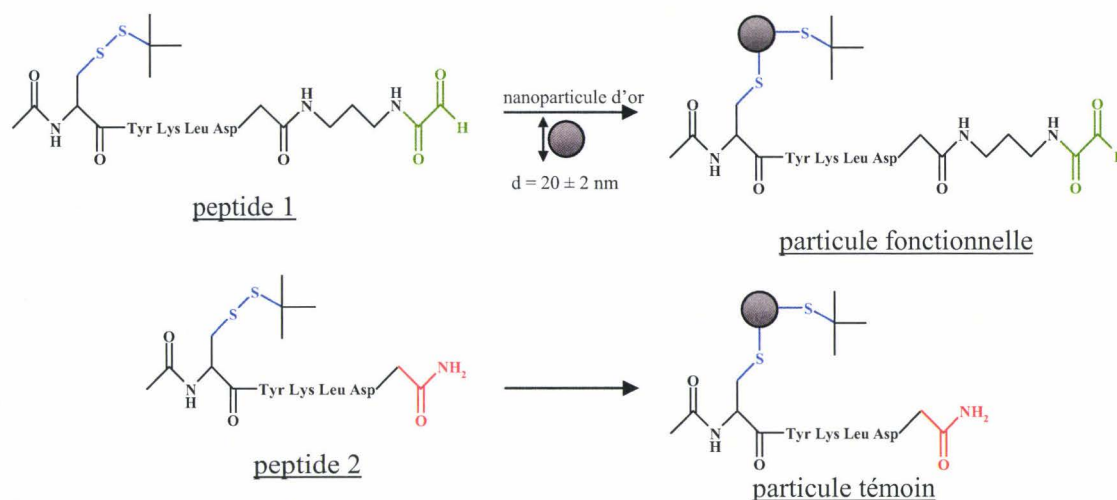


Figure 3. 10 : Réaction des peptides 1 et 2 avec une nanoparticule d'or.

Le pont disulfure (en bleu) permettant la liaison avec les particules d'or est formé par la protection ter-butyldisulfényle de la chaîne latérale de la cystéine. Chaque peptide lyophilisé est dissout après synthèse dans un tampon **A** K_2CO_3 0,26 mM NaN_3 0,2% identique au tampon commercial stabilisant les colloïdes d'or selon une concentration de 1 mg/mL.

5.2.b - Préparation des nanoparticules d'or fonctionnelles COCHO

Dans un eppendorf, 10 μ L de peptide 1 dissous dans un tampon **A** sont introduits dans 500 μ l de solution commerciale d'or colloïdal de diamètre 10 nm. La solution est ensuite stabilisée après 3 minutes de réaction par addition de 75 μ L de tampon **B** PBS BSA 0,2 %. Le milieu est centrifugé 10 minutes à 12000 rpm (température fixée à 20°C). Les particules d'or conjuguées forment un culot sédimenté qui, après avoir retiré la solution surnageante contenant les peptides libres, est redispersé dans un volume minimum de tampon **B**. La réaction, suivie initialement sur une longue durée par spectrométrie d'absorption dans le visible (avec **A** comme tampon de référence), s'avère stabilisée après seulement trois minutes. Nous avons établi qu'un second cycle de lavage n'était pas nécessaire car l'analyse du surnageant par chromatographie a révélé l'absence de peptide.

5.2.c - Préparation des particules témoins *or-C(O)NH₂*

La synthèse du témoin s'est avérée plus ardue qu'avec le peptide 1. Le protocole précédent appliqué au peptide 2 mène à l'agrégation complète et quasi-immédiate (< 1 minute) des particules, caractérisée par une solution passant du rose vin (particules nues) au violet. Un changement de la quantité de peptides introduit (10 μL de solution à $1 \rightarrow 10^{-10}$ mg/mL) selon des dilutions sérielles dans le tampon A n'a pas permis d'amélioration. De plus, l'ajout de méthanol comme co-solvant, susceptible de modifier la force ionique du milieu, dans des proportions variant de 5 à 100% a également mené à l'agrégation des particules.

D'après la littérature [Slot, 1985], l'addition d'une protéine sur des colloïdes métalliques doit se faire dans un tampon dont le pH approche le point isoélectrique de la protéine. Dans notre cas, différents pH ont été testés par ajout de volumes croissants de soude 0,1 mM aux 500 μL de solution commerciale d'or colloïdal. Le tableau 3.5 suivant résume les observations consécutives à ce test :

| Volume de NaOH 0,1 mM ajouté (μL) | pH | Ajout de 10 μL de peptide 2 | Ajout de 75 μL de tampon B après 3 mn | Lavage au tampon B par centrifugation | λ_{max} (nm) |
|---|------|---|---|--|--------------------------------|
| 0 | 7,9 | O | X | X | X |
| 10 | 8,0 | O | O | O | 525,7 |
| 30 | 8,5 | O | O | O | 529,2 |
| 50 | 9,0 | O | O | X | X |
| 100 | 9,4 | O | O | X | X |
| 200 | 9,9 | X | X | X | X |
| 300 | 10,4 | X | X | X | X |

Tableau 3. 5 : Etude de l'influence du pH sur la stabilité des particules d'or conjuguées au peptide 2. X indique une agrégation des particules, O un maintien de la stabilité colloïdale.

Le pH influence clairement le comportement des particules pendant l'addition du peptide carboxamide. Suite à ce test, nous avons retenu l'addition de 10 μL de soude comme paramètre final dans la synthèse.

2.2.e - Suivi des réactions par spectrométrie-vis et DLS

Dans un premier temps, l'évolution des longueurs d'ondes λ_{max} est suivie en fonction du temps (Fig. 3.11) après addition de chaque peptide sans ajout de B selon les protocoles définis précédemment. La courbe grise pointillée correspond au λ_{max} de l'or 10 nm commercial et sert de référence.

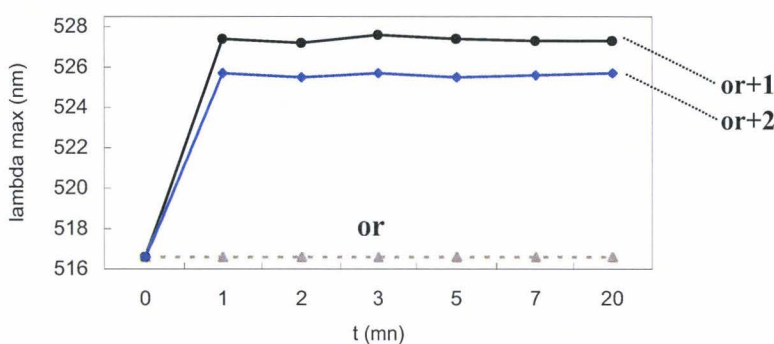


Figure 3. 11 : Evolution du λ_{max} après ajout des peptides 1 et 2.

Le lambda max initial de l'or à t_0 , d'une valeur de 516,6 nm, augmente fortement jusqu'à 527,4 et 525,7 nm (respectivement pour les peptide 1 et 2) en moins d'une minute. Ces valeurs n'évoluent plus sur une durée de vingt minutes. La réaction peut donc être considérée comme achevée après trois minutes de traitement. Ce temps de référence est repris dans une nouvelle expérience dans laquelle la réaction est quenchée par le tampon **B** avant lavage par centrifugation dans ce même tampon. Le tableau 3.6 résume les valeurs observées.

| | t (mn) | or commercial | or-COCHO | or-C(O)NH ₂ |
|--------------------------|----------------|---------------|--------------|------------------------|
| | 0 | 516,6 | 516,6 | 516,6 |
| | 1 | X | 527,4 | 525,7 |
| | 2 | X | 527,2 | 525,5 |
| | 3 | X | 527,6 | 525,7 |
| + 75 μ L de B | Q ₃ | 517,6 | 528,8 | 526,7 |
| | médiane | 517,3 | 528,4 | 526,4 |
| | Q ₁ | 517,1 | 528,2 | 526,3 |
| Lavage | Q ₃ | 517,4 | 526,4 | 525,2 |
| | médiane | 517,2 | 526,1 | 525,0 |
| | Q ₁ | 517,1 | 526,1 | 524,8 |

Tableau 3. 6 : λ_{max} mesurés par spectrométrie dans le visible après ajout du tampon **B**.

Il apparaît tout d'abord que le tampon **B**, probablement à cause de la protéine BSA, a une légère incidence sur l'évolution du coefficient λ . La preuve en est donnée par la faible variation ($\Delta = +0,7$ nm) de la longueur d'onde après ajout du tampon sur des particules commerciales. Les particules mises en contact avec les peptides 1 et 2 voient leur λ_{max} augmenter dans des proportions différentes après le lavage final (+9,5 et +8,4 respectivement). Cette variation montre un changement en surface des nanoparticules mais ne permet pas de le caractériser.

Un test complémentaire afin de s'assurer qu'une transformation a réellement eu lieu met en jeu la technique de DLS (*Dynamic Light Scattering*) ou de diffusion élastique de la lumière. Cette dernière permet de connaître le rayon hydrodynamique R_h des particules sphériques d'après le coefficient de diffusion D issu de l'équation de Stokes-Einstein [Bonn, 2003]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (3-5)$$

avec k_B la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité du solvant et R_h le rayon des particules.

Expérimentalement, les particules en suspension, dont le mouvement est supposé constant et aléatoire (mouvement Brownien), sont illuminées par un laser. La distribution particulaire diffuse et interfère avec le faisceau. Un détecteur permet de mesurer la variation de l'intensité du signal avec le temps par rapport au signal constant non-retardé. Un logiciel permet ensuite de calculer la constante de diffusion puis le rayon hydrodynamique. Notre étude est réalisée sur un système *ProteinSolutions* de chez *Dynapro* géré par le logiciel *Dynamics v.6.1.08*. Les suspensions filtrées sur des filtres *Whatman* 0,22 μ m sont introduites dans des cuves en quartz avant analyse. Chaque type de particules (or, or-COCHO, or-C(O)NH₂) est analysé séparément. Une analyse du mélange or commercial/or-C(O)NH₂ est également réalisée (Tab. 3.7 et fig. 3.12).

| | $R_h \pm \text{écart-type}$ (nm) |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| 1 or | 10,05 \pm 1,4 |
| 2 or-COCHO | 12,35 \pm 2,4 |
| 3 or-C(O)NH ₂ | 12,65 \pm 2,2 |
| 1+3 | 8,05 \pm 1,4 29,5 \pm 6 |

Tableau 3.7 : Rayons hydrodynamiques obtenus sur *Dynamics v6.1.08* pour l'or seul (1), l'or-COCHO (2) et -C(O)NH₂ (3) et le mélange (1+3).

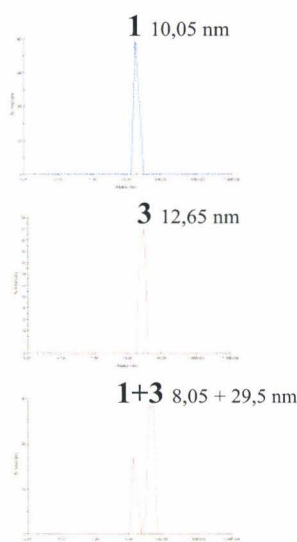


Figure 3. 12 : % de l'intensité du signal en fonction du R_h .

Les R_h des particules individuelles 1, 2 et 3 sont équivalents si l'on tient compte de l'écart-type. La résolution de l'appareil ne permet pas de distinguer la faible variation du R_h après ajout du peptide. Par contre, l'analyse des particules 1 et 3 dans une même cuve révèle deux produits distincts. Le premier ($8,05 \pm 1,4$ nm) semble correspondre aux billes d'or nues alors que le second, de R_h trois fois supérieur ($29,5 \pm 6$ nm), pourrait résulter d'interactions électrostatiques entre les deux types de particule. Dans tous les cas, le graphe indique clairement la présence de deux molécules distinctes, confirmant ainsi une modification de la surface des NPAu nues.

Dès lors, des tests de réactivité s'imposent afin de vérifier la spécificité de la fonction COCHO sur des surfaces semicarbazide et, à terme, sur les supports portant nos électrodes.

5.3 - Tests de réactivité par précipitation au sel d'argent

Un test simple ne nécessitant pas d'observation microscopique consiste à déposer sur des lames de verre portant la fonction semicarbazide les différentes nanoparticules, à procéder aux lavages habituels et enfin à précipiter un sel d'argent catalysé par la présence d'or. Cette méthode se base sur la réduction d'ions Ag^+ en argent métallique par un agent réducteur en surface de particules d'or, causant ainsi la formation d'un précipité visible à l'œil nu. Les nanoparticules (NP) métalliques jouent donc le rôle de catalyseur [Alexandre, 2001]. Cette méthode est quantitative en niveau de gris et devrait donc nous permettre

d'observer un différentiel entre les particules COCHO sensées se lier de manière covalente à la surface et les témoins (or-carboxamide et or commercial).

Cinq lames de verre sont fonctionnalisées par le groupement semicarbazide. Neuf “macrospots” de 10 μL sont déposés sur les surfaces pour chaque type de particules 1, 2 et 3 avant incubation dans une chambre d'hybridation en polycarbonate à 37°C sous atmosphère humide (voir protocole tab. 3.8). Il faut noter que chaque suspension a été préalablement concentrée dix fois par centrifugation dix minutes à 12000 rpm puis évacuation du surnageant. La concentration des particules est donc estimée à $5,2 \cdot 10^{11}$ particules par mL. Les lames sont ensuite lavées puis séchées avant incubation entre lame et lamelle du réactif commercial contenant les ions Ag^+ dont la transformation en argent métallique est quantitativement catalysée par le nombre de particules d'or présentes sur la surface.

| | |
|----------------------------------|---|
| Echantillon | Lames de verre semicarbazide |
| Incubation des particules | <ul style="list-style-type: none"> . Dépôt de 9×10 μL de chaque type de particule . Incubation 60 minutes dans chambre d'hybridation PC à 37°C sous atmosphère humide . Rinçage à la pissette des lames PBS Tween 0,05% / eau mQ / EtOH . Séchage à l'azote puis stockage sous vide |
| Précipitation à l'argent | <ul style="list-style-type: none"> . Bain dans <i>block sol</i> 5 minutes puis jet de pissette . Incubation avec la <i>silver staining sol</i> . Interruption de l'incubation avec jet d'eau mQ après 10 minutes . Rinçage au MeOH . Séchage à l'azote |

Tableau 3. 8 : Dépôt des nanoparticules sur lames de verre semicarbazides.

Les surfaces sont ensuite scannées sur un scanner de bureau *HPScanJet 5300C* selon une résolution de 600 ppp sous un format .tif pour quantifier les données et .jpeg pour la présentation des scans. Les images de deux lames (Fig. 3.13) sont données à titre indicatif ainsi que les diagrammes présentant l'intensité médiane en fonction de chaque type de NP testée (Fig. 3.14). La quantification finale a été réalisée sur le logiciel *ImageJ*.

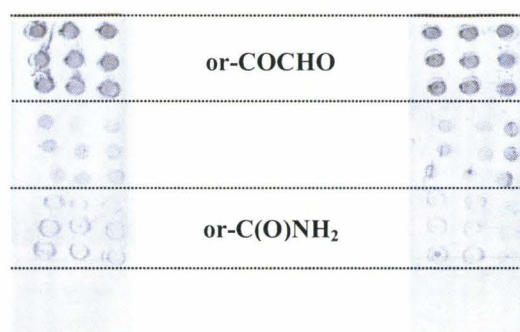


Figure 3. 13 : Lames de verre scannées après précipitation de l'argent métallique.

Les spots relatifs à l'or-COCHO et l'or nu sont uniformes : le précipité d'argent s'étale sur l'ensemble du cercle. Inversement, l'or-C(O)NH₂ donne lieu à des spots peu intenses. Ces données sont vérifiées par la quantification médiane du niveau de gris des spots.

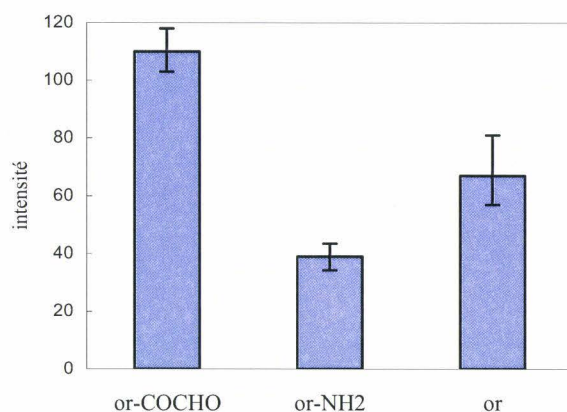


Figure 3. 14 : Quantification médiane du niveau de gris des cinq lames. Les diagrammes sont présentés après soustraction du bruit de fond.

Le signal est trois fois plus important pour les particules COCHO (110) que pour le témoin C(O)NH₂ (39) présentant un groupement aspécifique de la surface semicarbazide. Le signal intermédiaire (67) obtenu après dépôt des billes d'or nues permet de distinguer l'efficacité des particules fonctionnelles. La physisorption des particules commerciales sur la surface semicarbazide est moindre comparée avec l'or fonctionnel. Cette expérience nous permet de conclure à la chimiosélectivité des nanoparticules α -oxo aldéhyde. Il est maintenant possible de les déposer sur les nanogaps.

5.4 - Dépôt sur les nanoélectrodes

Chaque type de NP est concentré par centrifugation (Tableau 3.9) puis imprimé sur vingt paires de nanoélectrodes en or (gap variable 30→90 nm).

| | |
|----------------------|---|
| Echantillon | Wafer Si (100)/SiO ₂ 200 nm portant 30 paires de microélectrodes |
| Nettoyage | Dégraissage CHCl ₃ Plasma O ₂ 50 secondes 100W 0,1T Trempe eau mQ |
| Semicarbazide | Protocole tableau 3.2, paragraphe 3 |
| Spotting | Volume déposé : 6 nL Nanoparticules 1 , 2 et 3 Incubation 6 heures à 37°C sous atmosphère humide |
| Lavages | Lavages PBS Tween 0,05%, eau mQ, EtOH absolu Séchage sous vide à l'abri de la lumière Observations MEB |

Tableau 3. 9 : Protocole de dépôt des nanoparticules sur les nanoélectrodes.

Après incubation six heures à 37°C sous atmosphère humide, les surfaces sont lavées successivement avec du PBS Tween 0,05%, de l'eau mQ et enfin de l'éthanol. Les particules d'or-C(O)NH₂ ne se fixent quasiment pas sur la surface (figure 3.15) autour des électrodes. Leur présence dans le gap n'est pas constatée sur les dix paires d'électrodes testées.

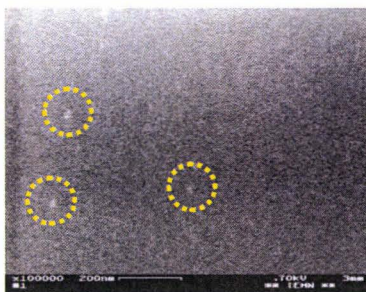


Figure 3. 15 : Image MEB des particules d'or-C(O)NH₂ spottées sur Si/SiO₂ semicarbazide. (1x1µm²).

Inversement, une densité de 150 particules / µm² environ a été estimée selon les clichés relatifs aux nanoparticules COCHO aussi bien à l'extérieur que dans le gap (Fig. 3.16).

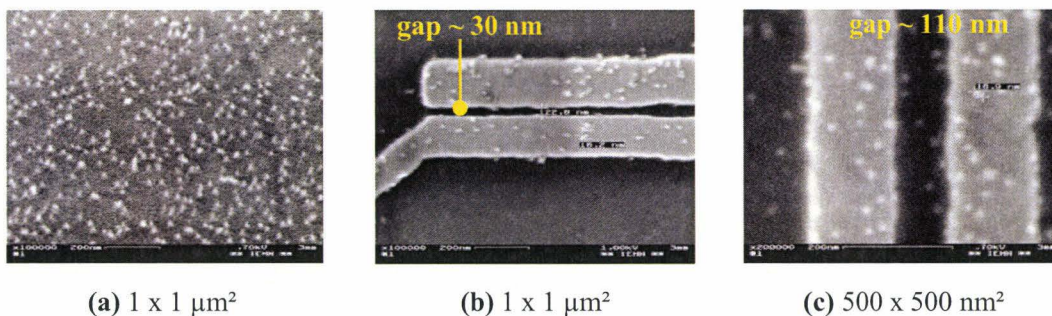


Figure 3. 16 : Images MEB de la surface après incubation des particules or-COCHO.

Cette valeur est très largement supérieure à celle obtenue sur les surfaces traitées avec les billes d'or nues (15 particules / µm², voir fig. 3.17).



Figure 3. 17 : Surface après incubation des particules d'or nues. (2 x 2 µm²).

Les comptages réalisés montrent une forte insertion des particules fonctionnelles COCHO dans le nanogap. Ceci confirme, en plus du test croisé avec les particules portant un groupement chimique orthogonal, la présence de la fonction semicarbazide dans le gap.

5.5 - Conclusions

Les études précédentes proposent la synthèse et la validation d'un outil de contrôle chimiosélectif. Nous pouvons donc déduire, en vue des études portant sur la détection électrique, que la première étape de la synthèse du semicarbazide, à savoir la silanisation amine de la surface, est effective. La chimie dans nos nanogaps ainsi que l'immobilisation de biomolécules est contrôlable.

Les particules d'or engagées n'en restent pas moins difficiles à caractériser après ajout d'un ligand thiolé et également propice à l'agrégation en fonction des multiples paramètres engagés (tampon, agent stabilisant...). Le rayon des colloïdes approchant les dix nanomètres, les techniques de DLS et d'observation au microscope à balayage atteignent quasiment leur limite de résolution.

Dès lors, des tests supplémentaires visent à approfondir cette problématique, notamment avec l'utilisation de ligands simplifiés. A titre d'exemple, une chaîne carbonée alcane comportant un groupement thiol sur une extrémité et une fonction aldéhyde ou COCHO sur l'autre extrémité poserait sans doute moins de problèmes qu'un peptide. D'autre part, en se référant aux travaux réalisés sur l'affinité électrostatique entre des particules d'or stabilisées par des groupements citrates et des substrats amines chargés positivement [Kooij, 2003], il apparaît que la double couche de contre-ions tapissant les NP joue un rôle important dans leur réactivité. Cette double couche est dépendante de la force ionique du milieu : pour une faible force ionique - et donc pour une fine double couche - le taux de couverture des billes d'or est bien en-dessous des prévisions théoriques [Adamczyk, 1990; Lyklema, 1995]. De plus, selon la théorie DLVO*, la distance moyenne inter-particule décroît avec l'augmentation de la force ionique provoquant ainsi une hausse du taux de couverture de la surface [Derjaguin, 1941].

Il ressort de ces considérations théoriques que la mobilité latérale des colloïdes est fortement restreinte, provoquant ainsi une distribution plus ou moins aléatoire sur la surface. Par conséquent, des expériences additionnelles pourraient porter sur l'influence des sels présents dans les suspensions ainsi que sur le ratio entre le nombre de groupement α -oxo aldéhyde effectif et le nombre de particules d'or. En effet, une sphère entièrement

* du nom des chercheurs Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek

recouverte de peptides n'est pas obligatoirement plus réactive qu'une sphère n'en comportant seulement qu'un.

6 – Etude par AFM de force du nanogap

Les forces mesurées usuellement en AFM entre une pointe et la surface viennent principalement des interactions de Van der Waals. Ces interactions ne sont pas spécifiques d'une surface déterminée mais permettent d'obtenir des informations topographiques. Il est apparu depuis quelques années une extension de l'AFM qui tend à modifier chimiquement les pointes afin de mettre en évidence des interactions chimiques particulières avec la surface. Il s'agit de la microscopie à force chimique (ou CFM pour *Chemical Force Microscopy*). Cette méthode permet d'observer la topographie d'une surface chimiquement hétérogène par l'intermédiaire d'une pointe fonctionnelle tout en mesurant des forces d'interaction (adhésion, décrochage).

L'objectif de cette étude consiste à observer, à l'aide de pointes AFM modifiées, la réactivité d'un nanogap (Fig. 3.18).

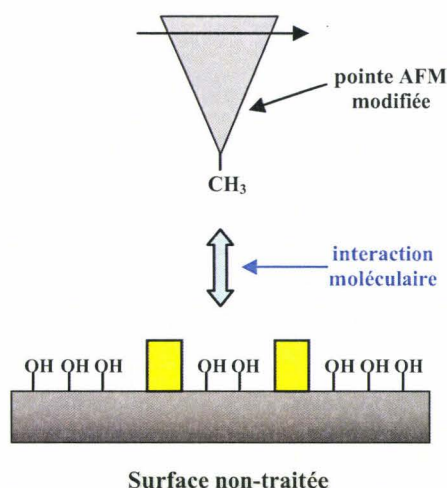


Figure 3. 18 : Principe de l'étude des nanogaps par CFM.

Dans notre cas, une pointe AFM portant des groupements hydrophobes CH_3 permet de déceler les éventuelles différences de comportement entre le gap et les électrodes en or. A une brève introduction de la technique succédera la description des manipulations réalisées en microscopie à l'Université Catholique de Louvain sous la supervision du professeur Yves Frédéric DUFRENE.

6.1 - La microscopie à force chimique

Il manque à l'AFM classique une sensibilité aux propriétés chimiques de la surface des échantillons. La modification chimique des pointes permet d'avoir une vue des forces intermoléculaires à une échelle nanométrique ainsi qu'un aperçu de l'hétérogénéité chimique correspondante [Fujihira, 1999] en les rendant sensibles à des interactions moléculaires spécifiques. Les interactions pointe-surface peuvent notamment être étudiées afin de mesurer des forces adhésives issues d'interactions hydrophobe/hydrophile [Han, 1995; Thomas, 1995] ou bien de couples ligand/récepteur comme la biotine/streptavidine [Ludwig, 1997].

Le principe de base consiste à travailler avec des pointes fonctionnalisées chimiquement suite au greffage de molécules spécifiques. Généralement, on préfère au greffage de chlorosilanes le dépôt d'alcane thiolés sur une couche d'or déposée préalablement sur la pointe AFM (Fig. 3.19). Ces molécules comportent un groupement alcane porteur sur une extrémité du thiol, qui permet l'assemblage sur la couche d'or, et sur l'autre extrémité le groupement fonctionnel ou la molécule que l'on désire greffer sur la pointe (-CH₃, -CO₂H, -NH₂...).

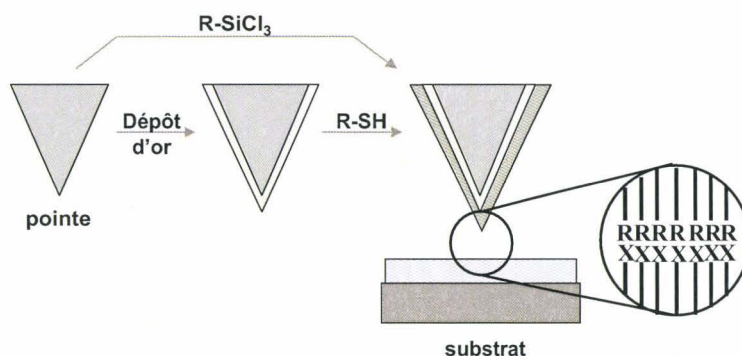


Figure 3. 19 : Schéma de la modification de pointes AFM.

Ce type de pointe permet de cartographier différents groupes moléculaires présents sur le substrat [Frisbie, 1994]. Elles sont également conçues afin de cartographier les effets de traitements de surface agressifs comme le plasma sur des surfaces polymères [Zhang, 1998].

Pratiquement, la pointe greffée est dirigée vers la zone à imager. La force d'interaction est mesurée en se basant sur la déflexion du cantilever (Fig. 3.20). Quand le contact se produit, la pointe est amenée vers une valeur de force pré-réglée puis retirée. Une fois que l'énergie élastique du cantilever est supérieure à la force d'adhésion se produit la

séparation : la pointe retourne à une position de déflexion zéro. La déflexion du cantilever observée est ensuite convertie en force à l'aide de la constante de raideur du cantilever.

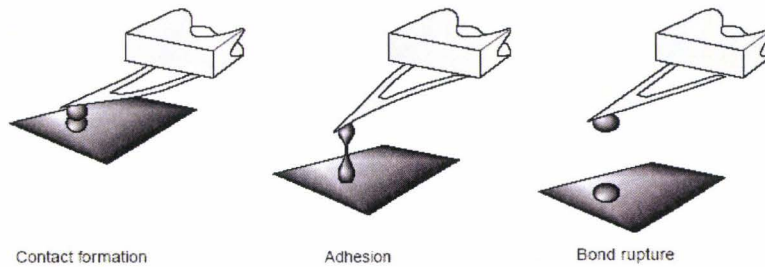


Figure 3. 20 : Principe de la microscopie à force chimique [Benoit, 2000].

L'amplitude des forces d'interactions moléculaires est reliée aux mesures de la force d'adhésion : celle-ci est déterminée à partir des courbes force/distance de déplacement. Le profil d'une courbe force-distance typique (obtenu par exemple à l'aide d'une pointe dérivée par l'acide 11-mercaptopundecanoïque sur une surface similaire [Han, 1995]) est représentée sur la figure 3.21.

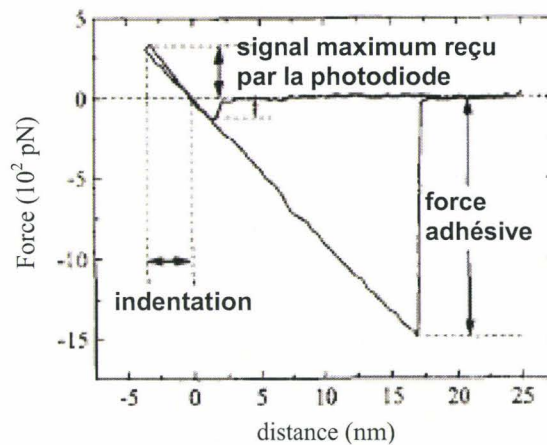


Figure 3. 21 : Courbe typique force/distance en CFM.

L'amplitude du décrochage correspond à la force d'adhésion entre la pointe et la surface. La profondeur d'indentation entre 0 et -3 nanomètres permet de prérégler une intensité maximale du signal perçu par les photodiodes.

6.2 - Observation du nanogap en AFM classique

Une surface Si/SiO₂ portant les nanoélectrodes est tout d'abord analysée en mode contact à l'air (Fig. 3.22).

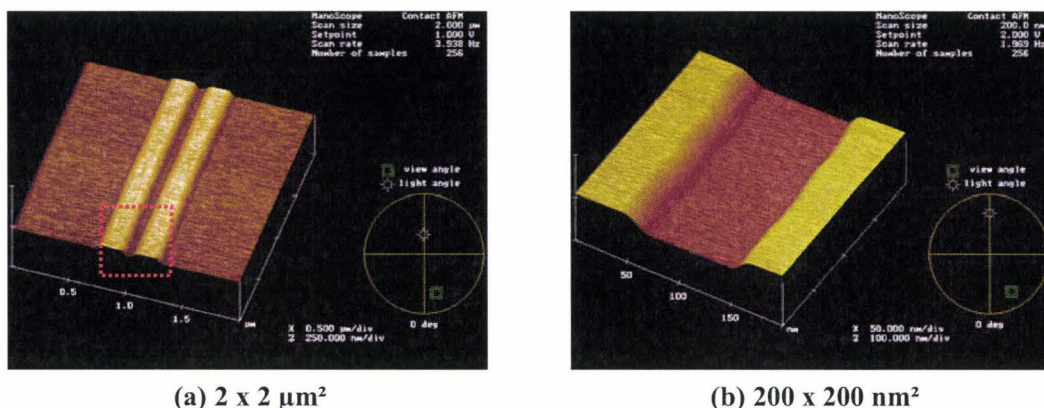


Figure 3. 22 : Clichés AFM d'un nanogap de 80 nanomètres en mode contact.

La pointe utilisée, en nitrure de silicium, permet une cartographie précise du gap. De plus, les électrodes en or sont très bien définies.

6.3 – Etude du nanogap non fonctionnalisé

Les substrats étudiés sont des surfaces en Si/SiO₂ de 200 nm portant des nanoélectrodes en or (hauteur ~ 40 nanomètres) séparées par un gap de 50 à 90 nanomètres et préalablement nettoyées par plasma à oxygène durant 50 secondes. Les pointes en nitrure de silicium Si₃N₄ sont fonctionnalisées par trempage 24 heures dans une solution d'acide mercaptoundecanoïque CH₃-(CH₂)₁₅-SH. Les mesures sont réalisées dans l'eau. Le cliché (a) de la figure 3.23 présente la topographie de la surface à la différence de (b) qui établit dans le même temps une carte d'adhésion.

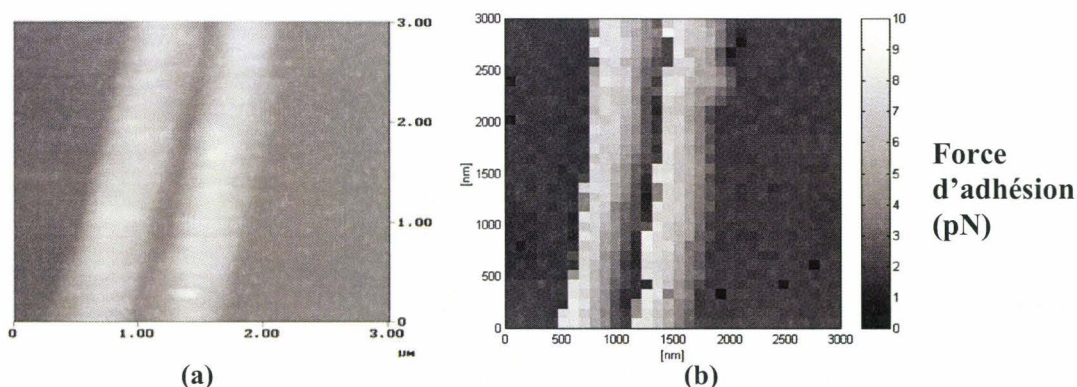


Figure 3. 23 : Observation en CFM d'un couple de nanoélectrodes traitées par plasma O₂.

Des problèmes de contamination sont apparus durant les manipulations malgré la multiplication de nettoyage dans divers solvants sous ultrasons. Il apparaît que cette technique est très sensible à la qualité de la fonctionnalisation de la pointe ainsi qu'aux contaminations de l'échantillon. Rappelons qu'une surface d'oxyde de silicium passée au plasma comporte une multitude de groupements silanols très réactifs.

Le nanogap est bien de nature similaire, c'est à dire hydrophile, à la zone entourant les structures en or. Les forces d'adhésion constatées (2 nN environ) montrent la faible interaction entre la pointe hydrophobe et les silanols. Inversement, les pistes en or sont clairement hydrophobes (force d'adhésion ~ 9 nN).

7 - Conclusions

Les mesures précédentes démontrent une forte distinction de comportement hydrophile/hydrophobe à l'intérieur d'un nanogap non traité. Ceci confirme les observations tirées des études de la surface par goniométrie et par les particules d'or fonctionnelles : la présence de nanoélectrodes en or ne bloque pas la réactivité du nanogap vis-à-vis d'une silanisation amine.

De plus, nous avons initié au moment de la rédaction de ce mémoire une nouvelle étude par CFM basée sur la très forte affinité entre la biotine et la streptavidine. Une pointe couverte de streptavidine balaye le substrat préalablement fonctionnalisé par des fonctions biotines. Si la biotine, déposée sur la surface *via* la ligation semicarbazone, est présente dans le nanogap, il devrait en résulter de fortes forces d'adhésion et des courbes de force similaires avec la zone extérieure aux électrodes (voir figure 3.24).

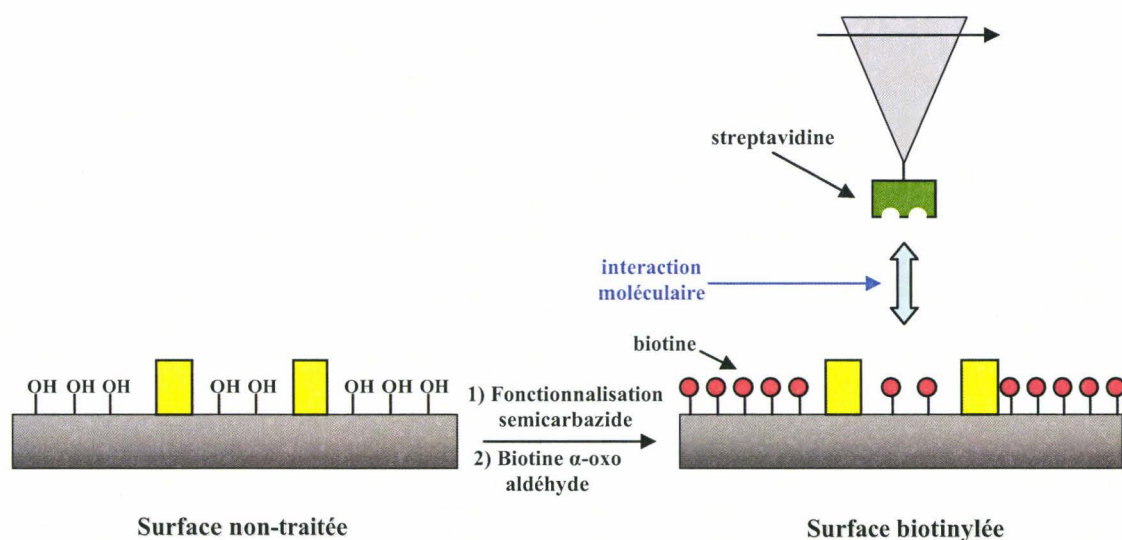


Figure 3. 24 : Adhésion entre une pointe streptavidine et une surface biotinylée.

Les travaux se poursuivent actuellement mais nous proposons à titre indicatif les premières images réalisées. La figure 3.25 présente un nanogap de 40 nanomètres en topographie simple et la carte d'adhésion correspondante (noir → aucune adhésion, blanc → forte adhésion).

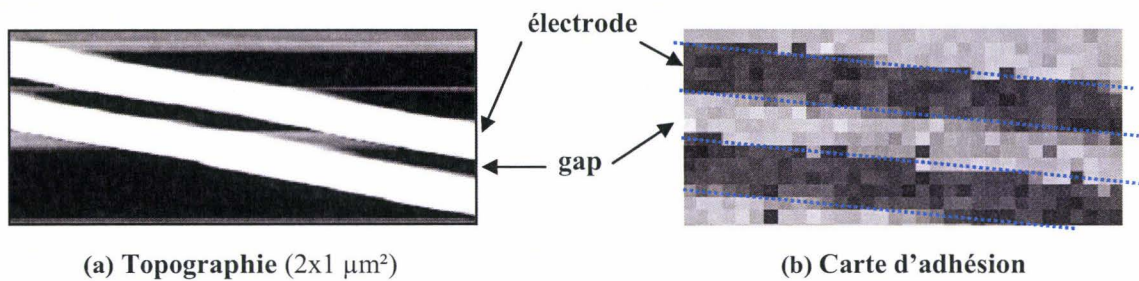


Figure 3. 25 : Clichés AFM préliminaires de la surface biotinylée à l'aide d'une pointe streptavidine.

Le nanogap affiche une carte d'adhésion semblable à la zone extérieure aux nanoélectrodes. Nous pouvons déduire que des modifications sont intervenues dans le gap après traitement. Il n'est cependant pas possible de tirer d'autres conclusions dans la mesure où l'expérience n'a pas encore été renouvelée.

Chapitre IV – Détection électrique d'une interaction par précipitation

| | |
|--|------------|
| 1 – L'INTERACTION SECONDAIRE SpA-IgG-Ac^{II} | 99 |
| 1.1 - LA PROTEINE A..... | 99 |
| 1.2 - LES IMMUNOGLOBULINES G HUMAINES | 100 |
| 1.3 – COMPLEXITE DU SERUM HUMAIN..... | 101 |
| 1.4 – NATURE DE L'INTERACTION SpA-IgG | 101 |
| 2 – VALIDATION DU PROTOCOLE DE DEPOT SUR VERRE PAR FLUORESCENCE | 102 |
| 2.1 – ETUDES ANTERIEURES DU DEPOT DE BIOMOLECULES SUR SURFACE SOLIDE | 102 |
| 2.2 – PARTIE EXPERIMENTALE | 102 |
| 2.3 – CHOIX DES SONDAS TEMOIN POUR LE SPOTTING..... | 103 |
| 2.4 - ANALYSE ET QUANTIFICATION | 104 |
| 2.5 - ETUDE DE LA CONCENTRATION EN SpA..... | 104 |
| 3 – PRINCIPE ET APPLICATIONS DE LA METHODE DE PRECIPITATION SELECTIVE | 105 |
| 4 - FABRICATION DES MICROELECTRODES | 107 |
| 4.1 - DIMENSIONS SPATIALES DE L'INTERACTION SpA-IgG | 107 |
| 4.2 – MODE OPERATOIRE..... | 108 |
| 5 – REALISATION DE L'INTERACTION SECONDAIRE | 110 |
| 5.1 – TESTS ENVISAGES | 110 |
| 5.2 – ETUDE DU DIAMETRE DES SPOTS EN FONCTION DU VOLUME SPOTTE..... | 111 |
| 5.3 – IMMOBILISATION DU COMPLEXE SpA-IgG-Ac ^{II} | 113 |
| 5.4 – OBSERVATIONS EN AFM | 114 |
| 5.5 - CARACTERISATION ELECTRIQUE DES ELECTRODES AVANT ET APRES TRAITEMENT | 115 |
| 6 - AMPLIFICATION PAR PRECIPITATION D'ARGENT METALLIQUE | 116 |
| 6.1 – MODE OPERATOIRE | 116 |
| 6.2 – DETERMINATION DU TEMPS OPTIMAL DE TRAITEMENT | 116 |
| 6.3 - DETECTION ELECTRIQUE | 118 |
| 6.3.a - <i>Test de spécificité</i> | 118 |
| 6.2.b - <i>Test de concentration</i> | 121 |
| 6.4 - DISCUSSION..... | 122 |

Après avoir caractérisé le comportement d'un nanogap fonctionnel piégé entre des nanoélectrodes métalliques, l'immobilisation de biomolécules dans notre dispositif est désormais envisageable. Le schéma de détection global repose sur la forte affinité entre la protéine A (SpA) du Staphylocoque et les immunoglobulines G (IgG) provenant du sérum humain. Dans cette étude, nous projetons d'amplifier les variations éventuelles de signal électrique en ajoutant un "étage" au complexe SpA-IgG *via* un anticorps secondaire (Ac^{II}) anti-humain marqué avec des particules d'or. L'interaction secondaire est documentée dans la **partie 1**.

Cependant, des travaux préliminaires impliquant des microélectrodes s'avèrent nécessaires afin de i) mettre en place le protocole de dépôt du complexe [protéine A - IgG sériques - Ac^{II}] sur silicium ii) tester une nouvelle méthode de détection électrique facile à mettre en œuvre avant de passer aux nanostructures. Dans cette optique, le protocole de dépôt de la SpA est tout d'abord validé par fluorescence sur lame de verre amine (**partie 2**) à l'aide d'un anticorps secondaire rhodaminé (Fig. 4.1).

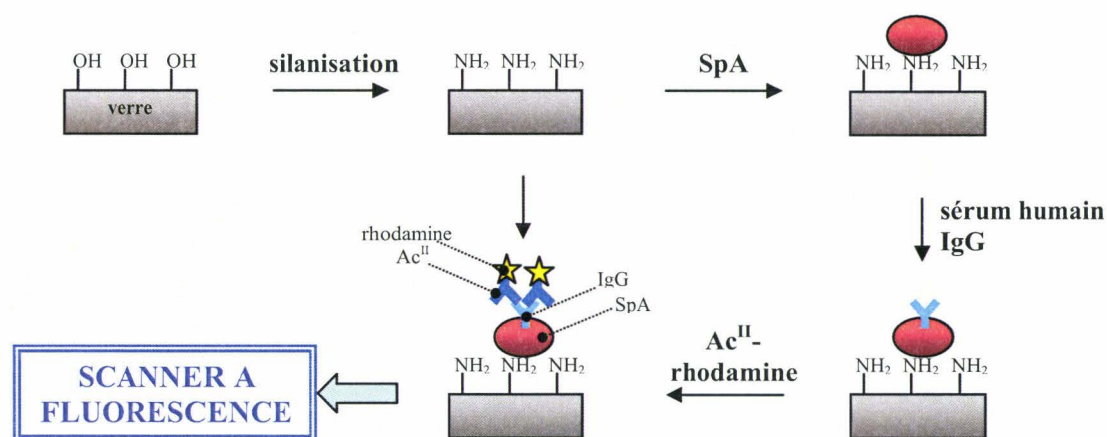


Figure 4. 1 : Principe de la détection des IgG sériques par fluorescence.

La méthode de détection choisie consiste à immobiliser dans un gap de plusieurs micromètres le complexe SpA-IgG -Ac^{II} marqué à l'or, puis à provoquer un court-circuit des microélectrodes facilement détectable par des mesures électriques. La technique choisie a déjà été évoquée dans le paragraphe 5 du chapitre III pour tester le dépôt de particules d'or fonctionnelles sur lames de verre semicarbazide. Il s'agit d'induire la précipitation d'argent métallique catalysée par les nanoparticules d'or (voir fig. 4.2). Une telle méthode n'a, à notre connaissance, jamais été réalisée dans un milieu biologique complexe à l'aide d'une interaction secondaire.

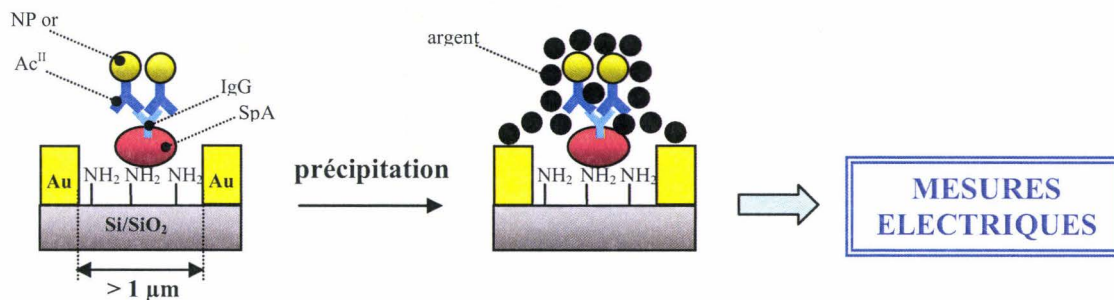


Figure 4. 2 : Principe de la détection électrique par précipitation à l’argent.

La technique de précipitation et ses applications (**partie 3**), ainsi que la conception des électrodes (**partie 4**), sont détaillées. Les **parties 5 et 6** décrivent les expériences menées afin i) de fixer le complexe [SpA-IgG-AcII or] et ii) d’optimiser la détection (changement de gap, temps de traitement, concentration en SpA) ainsi que les conclusions sur cette technique.

1 – L’interaction secondaire SpA-IgG-AcII

1.1 - La protéine A

La protéine A (ou SpA) du Staphylocoque est un constituant de la paroi cellulaire de la bactérie *Staphylococcus Aureus*. Cette protéine de 43 kDa possède la capacité de lier la région constante des immunoglobulines (Ig), spécialement les IgG, d’un grand nombre d’espèces [Graille, 2000]. Au niveau biologique, la SpA est un facteur de virulence du Staphylocoque dont l’interaction avec des lymphocytes T cause une variété de maladies inflammatoires. Le tableau 4.1 résume les affinités de la protéine A pour les Ig issues de différentes espèces.



| Espèces | Classe d'anticorps | Protéine A |
|---------|--|------------|
| Humain | IgG complet | + |
| | IgG ₁ , IgG ₂ | + |
| | IgG ₃ | - |
| | IgG ₄ | + |
| | IgM | - |
| | IgA | - |
| | IgA ₁ , IgA ₂ | - |
| | IgE | ~ |
| | Fab | - |
| ScFv | - | |
| Souris | IgG complet | + |
| | IgG ₁ | - |
| | IgG _{2a} , IgG _{2b} , IgG ₃ | + |
| Vache | IgG complet | - |
| | IgG ₁ | - |
| | IgG ₂ | + |

Tableau 4. 1 : Principales caractéristiques des liaisons de la protéine A avec des immunoglobulines [Richman, 1982].

1.2 - Les immunoglobulines G humaines

Les immunoglobulines G humaines constituent un groupe de glycoprotéines similaires impliquées dans l'immunité humorale et sont majoritaires dans le sérum humain (70-75% des Ig). Elles sont composées de deux chaînes lourdes (2 x 50 kDa) et de deux chaînes légères (2 x 25 kDa) liées entre-elles par des liens disulfures interchaînes. Les ponts disulfures sont responsables de la formation de boucles menant à une structure compacte composée en plusieurs domaines (Fig. 4.3).

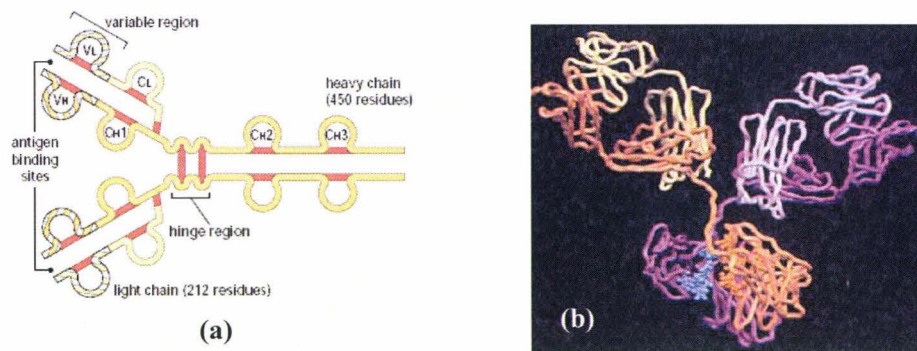


Figure 4.3 : Structure générale d'une IgG₁.

(a) **Schéma des différentes régions.** La région variable côté N-ter, site de liaison aux antigènes, est présente dans les chaînes lourdes et légères (V_H et V_L). La partie constante (C_H et C_L) se divise en trois régions globulaires dans la partie lourde ($C_{H1 \rightarrow H3}$) stabilisées par des liens intrachaînes disulfures. La région charnière est un segment entre C_{H1} et C_{H2} . Les groupes carbohydrates sont attachés au domaine C_{H2} [Davies, 1983].

(b) **Structure spatiale d'une IgG_{1k} spécifique du phénobarbital.** Chaînes légères 1 (rose) et 2 (jaune), chaînes lourdes 1 (magenta) et 2 (orange) [Hostetler, 1998].

Les régions N-terminales des chaînes lourdes et légères exposent des compositions aminoacides très variables (V_H et V_L) et sont impliquées dans la liaison aux antigènes. Les différences en composition aminoacide des chaînes lourdes et le ratio $\lambda:\kappa$ des chaînes légères sont caractéristiques des quatre différentes sous-classes des IgG notées IgG₁₋₄, présentes dans l'organisme avec des proportions respectives de 66, 23, 7 et 4% (Tab. 4.2).

| | IgG ₁ | IgG ₂ | IgG ₃ | IgG ₄ |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Chaîne lourde | γ_1 | γ_2 | γ_3 | γ_4 |
| PM (x1000 Da) | 146 | 146 | 170 | 146 |
| Chaîne légère : ratio $\kappa : \lambda$ | 2,4 | 1,1 | 1,4 | 8,0 |
| Nb. AA dans région charnière | 15 | 12 | 62 | 12 |
| Nb. liens disulfures interchaînes | 2 | 4 | 11 | 2 |
| pI | 8,6 | 7,4 | 8,3 | 7,2 |

Tableau 4.2 : Propriétés structurales des différentes IgG [Steward, 1984].

1.3 – Complexité du sérum humain

Le sérum humain, dérivé du plasma après l'élimination des facteurs coagulants, contient 60-80 mg de protéines par mL en plus d'autres constituants tels les sels, lipides, acides aminés et sucres. Les protéines majoritaires sont l'albumine (35-50 mg/mL), les immunoglobulines, transferrines, haptoglobines, et lipoprotéines. On estime à plus de 10 000 le nombre de protéines présentes dans le sérum. Chez les adultes, la concentration dans le sérum en IgG₁ est de 5-12 mg/mL, suivie par les IgG₂ (2-6 mg/mL), les IgG₃ (0,5-1,0 mg/mL) et les IgG₄ (0,2-1,0 mg/mL). De nombreuses méthodes préparatives (électrophorèse, HPLC) de séparation du sérum se basent sur l'affinité des IgG envers la protéine A liée à des billes acrylamide [Bottomley, 1995; Hjelm, 1972].

1.4 – Nature de l'interaction SpA-IgG

La SpA possède une forte affinité pour les régions Fc des IgG_{1,2,4} ainsi qu'une faible affinité secondaire pour la région Fab de certaines IgG. Une molécule de protéine A peut lier jusqu'à cinq molécules d'Ig simultanément par l'intermédiaire de cinq domaines homologues notés E, D, A, B et C du N vers le C-terminal [Kikuchi, 1999]. Cette réaction est réversible et peut être caractérisée selon l'équation suivante :



La constante d'équilibre de la réaction K correspond à (k_a/k_d) et a été évaluée [Saha, 2003] entre $4,6 \cdot 10^7$ et $2,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ pour des valeurs de k_a et k_d proches de $8,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Il s'agit d'une réaction rapide (<30 minutes) en considérant une concentration en SpA de $1,2 \text{ } \mu\text{M}$ ($50 \text{ } \mu\text{g/mL}$) et une gamme de concentrations en IgG variant de $0,7$ à 667 nM [Lindmark, 1983]. Les forces attractives non-covalentes mises en jeu (liaisons hydrogènes et électrostatique, forces de Van der Waals et hydrophobe) sont individuellement plus faibles que des liaisons covalentes. Cependant, leur nombre important d'interactions produit une grande énergie de liaison (Fig. 4.4).

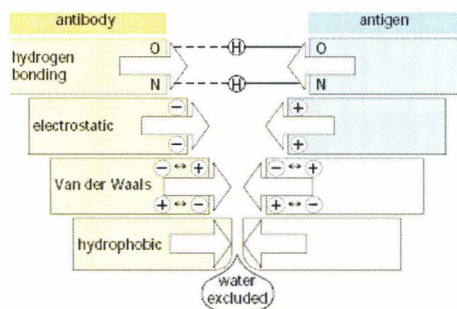


Figure 4. 4 : Schéma de la nature des forces engagées entre la SpA, les IgG et l'Ac^{II}.

Les liens hydrogènes proviennent de la formation de ponts hydrogènes entre atomes appropriés. Les forces électrostatiques dérivent des attractions de groupes de charges opposées situés sur les chaînes latérales des deux protéines. Les liaisons de Van der Waals sont générées par les interactions entre nuages électroniques (représentés sur la figure comme des dipôles induits oscillants). Enfin, les liens hydrophobes contribuent à la moitié de la force totale d'interaction anticorps/antigène et reposent sur l'association de groupes apolaires, minimisant ainsi les contacts avec les molécules d'eau.

2 – Validation du protocole de dépôt sur verre par fluorescence

2.1 – Etudes antérieures du dépôt de biomolécules sur surface solide

L'adsorption spécifique des IgG dépend directement de la physisorption de la protéine A sur une surface en oxyde de silicium. Le silicium est le matériau le plus adapté à la conception de microélectrodes métalliques. La protéine A ne conserve sa capacité de fixation aux IgG que lorsqu'elle reste structurée. Dans cette optique, des silanes organiques [Glad, 1985] portant diverses fonctions (amino-, aldéhyde, alkyl-) ont été introduits afin de former des réseaux polysiloxanes connectés par des liens siloxanes.

Si la plupart des protéines s'adsorbent avec une haute affinité sur des surfaces hydrophobes, l'adhésion s'accompagne souvent d'une perte de la structure native de la protéine, au contraire des surfaces hydrophiles [Kondo, 1992]. Il a été montré que l'albumine et les immunoglobulines issues d'un sérum humain s'adsorbent préférentiellement sur support hydrophile [Collier, 1997]. Ainsi, des monocouches auto-assemblées amine ont donné de très bons résultats sur la vibronectine [Fauchoux, 2004]. De plus, la protéine A (1 mg/mL) spottée par *pin & ring* sur lames de verre semicarbazide (groupement proche de l'amine) constitue le contrôle positif au sein d'une biopuce de sérodiagnostic [Duburcq, 2004].

2.2 – Partie expérimentale

La protéine A (*Sigma*) est imprimée à une concentration de $2,4 \cdot 10^{-2}$ mM (1 mg/mL) à l'aide d'un *spotter non-contact* sur lame de verre *Esco 75x25mm (Erie Scientific)* préalablement silanisée par l'aminopropyltriméthoxysilane (APTMS). Cette chimie, courante sur lame de verre, a été réalisée à l'UMR8525 de l'Institut de Biologie de Lille. Une surface hydrophile amine est générée avant immobilisation de la protéine A puis incubation avec du sérum humain dilué au 1/20^{ème}.

La détection des anticorps capturés par la protéine A est ensuite effectuée après incubation de l'échantillon avec un anticorps de chèvre anti Ig(A+G+M) humain 10^{-3} mM (*Jackson Immunoresearch*) marqué à la tétraméthylrhodamine (Tab. 4.3).

| | |
|------------------------------|--|
| Echantillon | Lame de verre |
| Nettoyage | . Dégraissage CHCl_3 . Décapage $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 1:1 (v:v) 1 heure . Trempage eau mQ |
| Silanisation | . Rinçage MeOH . Bain APTMS 3% / MeOH/eau mQ 95% 30 minutes sous ultrasons . Rinçages MeOH, eau mQ, MeOH . Etuve 110°C 15 minutes . Séchage sous vide |
| Spotting | Volume déposé : 1 nL Protéine A (Sigma) 1 mg/mL / PBS Incubation 6 heures à 37°C sous atmosphère humide |
| Révélation secondaire | . Lavages PBS Tween 0,05%, eau mQ, EtOH absolu . Incubation sérum humain dilué au $5/100^{\text{ème}}$ / PBS Tween 0,05% BSA 2% 1 heure . Lavages PBS Tween 0,05%, eau mQ, EtOH absolu . Incubation anticorps anti Ig(A+G+M) humain rhodamine au $1/10^{\text{ème}}$ / PBS . Tween 0,05% BSA 2% 1 heure . Lavages PBS Tween 0,05%, eau mQ, EtOH absolu . Séchage sous vide à l'abri de la lumière . Lecture au scanner à fluorescence canal Cy3 |

Tableau 4. 3 : Protocole expérimental de la détection des IgG par fluorescence.

Le sérum humain est fourni par le laboratoire clinique du Centre Hospitalier Régional (Lille, France).

2.3 – Choix des sondes témoin pour le spotting

La protéine A doit être comparée à un témoin ne réagissant pas (ou peu) avec une des nombreuses protéines sériques. Un témoin strictement négatif n'existe pas ; les réactions croisées, dans le cas de biomolécules, restent probables. Afin de minimiser ce phénomène, le choix d'une sonde contrôle s'est porté sur un anticorps de chèvre anti Ig(H+L) murins $1,7 \cdot 10^{-4}$ mM (2,5 mg/mL, *Southern Biotechnology Associates*) immunopurifié par absorption sur des séra et paraprotéines humains. La réactivité croisée envers les immunoglobulines humaines est donc réduite. Cette sonde sera notée **sonde 2** dans les paragraphes suivants.

De plus, un second témoin non protéique est proposé. Il s'agit du tampon PBS, composé de NaCl (0,138 M), de KCl (0,0027M) et un mélange d'ions phosphates $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,01M), utilisé pendant les lavages. Il permet tout d'abord de valider la fluorescence observée avec la protéine A résulte bien d'une interaction spécifique et non de la physisorption d'une quelconque protéine issue du sérum. L'autre rôle du PBS, quand il est spotted entre la SpA et l'Ac murin sur un même piézo, consiste à vérifier l'absence de contamination entre les spots. Un phénomène de *carry over*, causé par la présence

éventuelle de résidus (protéine A ou contaminants extérieurs) physisorbés sur l'aiguille de dépôt, induirait dans ce cas une fluorescence parasite. La protéine A et l'anticorps murin sont déposés sur lame de verre selon trois lignes de cinq spots chacune, et le PBS sur une ligne, pour un volume dispensé égal à un nanolitre.

2.4 - Analyse et quantification

Dans un premier temps, la lame de verre a été observée sur le canal Cy3 du scanner à fluorescence immédiatement après le *spotting*. Les spots de SpA / PBS / sonde 2 ne sont pas distincts du bruit de fond. Ceci démontre que les valeurs mesurées après incubation de l'anticorps secondaire fluorescent sont dues à la capture d'anticorps humains. Le différentiel entre l'intensité de fluorescence médiane de la protéine A et du témoin (sonde 2) est de 3,2 (Fig. 4.5). Inversement, le PBS ne donne lieu à aucune interaction avec les IgG (intensité proche de 0).

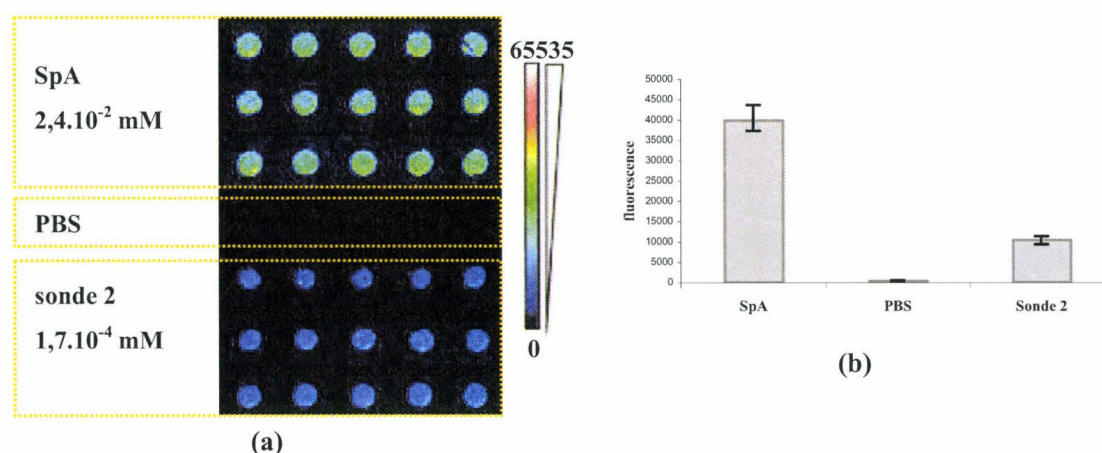


Figure 4. 5 : Validation de l'interaction protéine A – IgG sériques par fluorescence sur lame de verre.

(a) Image de la surface scannée en fausses couleurs après interaction secondaire. Laser 30 – gain 45.

(b) Diagramme des intensités de fluorescence médianes pour chaque type de sonde.

Ainsi, la protéine A conserve son activité après immobilisation sur le support amine sans être dénaturée. L'adsorption simple semble donc une solution adaptée à l'étude de l'interaction modèle.

2.5 - Etude de la concentration en SpA

La faisabilité de l'interaction modèle étant démontrée, une étude de la concentration idéale en SpA s'avère nécessaire avant de procéder aux tests de détection sur les électrodes. En effet, une concentration trop faible induirait probablement une densité de NP d'or insuffisante pour court-circuiter les microélectrodes. A l'inverse, une concentration trop

forte serait susceptible de former une double couche de protéine A défavorable à la liaison avec les IgG. La SpA a été spottée sur trois lames de verre (voir fig. 4.6) selon une gamme de concentration variant de 50 µg/mL ($1,2 \cdot 10^{-3}$ mM) à 5 mg/mL (0,12 mM).

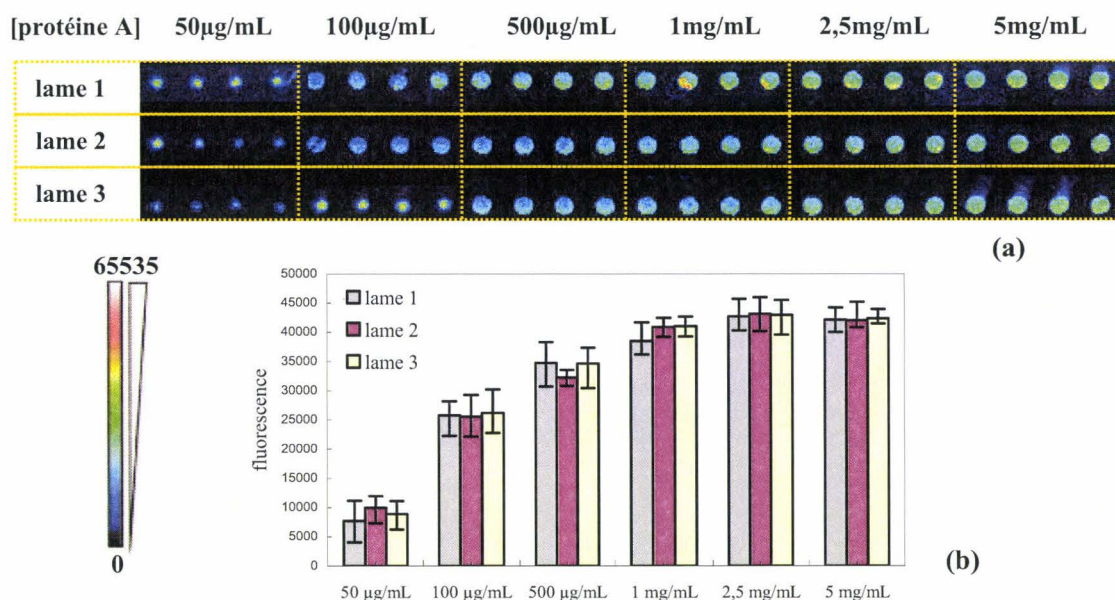


Figure 4.6 : Etude de l'influence de la concentration de la protéine A sur la détection.

(a) Image scannée des trois substrats (lame 1→3) spottés selon cinq concentrations différentes de la sonde. Laser 30 – gain 45. (b) Diagramme des intensités de fluorescence mesurées sur chaque échantillon.

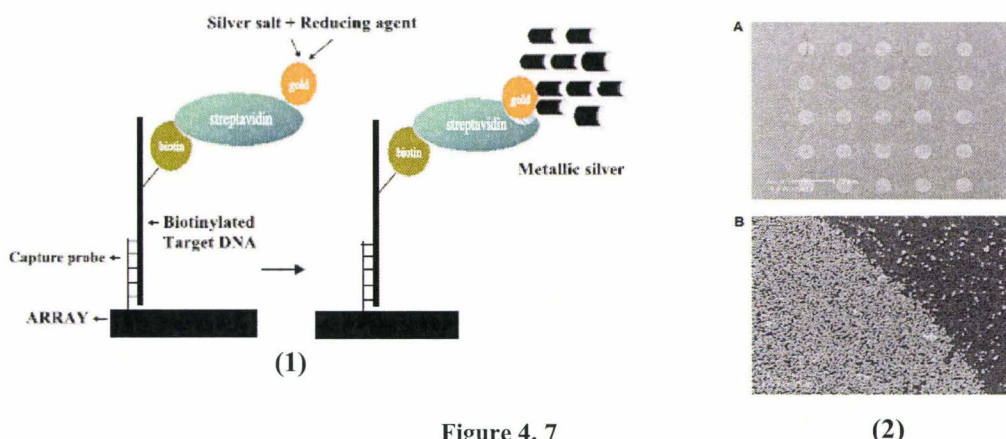
Il se produit une saturation du signal fluorescent pour les concentrations maximales (5 et 2,5 mg/mL) : la protéine A est en excès. *A contrario*, l'intensité diminue par quatre avec la concentration de 1 mg/mL à 50 µg/mL. Par conséquent, la formation du complexe SpA-IgG n'évolue plus pour une concentration en sonde supérieure à 1 mg/mL. Cette concentration sera utilisée dans les expériences à venir.

3 – Principe et applications de la méthode de précipitation sélective

La détection d'interactions nucléiques et protéiques est réalisée par des marqueurs, généralement des fluorophores (cyanine 3 ou 5) ou des dérivés biotinylés. Cependant, ces techniques nécessitent de coûteux instruments (ex : un scanner à laser confocal) qui limitent les applications des biopuces, particulièrement dans le domaine du diagnostic clinique. Une première alternative est donnée par les nanoparticules grâce à leur faible prix, leur stabilité sous forme de suspension colloïdale [Horisberger, 1981] et leurs propriétés physico-chimiques. Les nanoparticules d'or conjuguées à des anticorps sont notamment utilisées en microscopie électronique, pour visualiser des protéines dans les échantillons biologiques [Elghanian, 1997], et également en spectroscopie Raman [Chumanov, 1995; Freeman, 1995] et en détection optique d'interactions moléculaires

spécifiques [Reichert, 2000]. Cependant, la sensibilité de la détection est améliorée par une amplification à l'argent.

Cette technique consiste à déposer sur une surface des sels d'argent Ag^+ en présence d'un agent réducteur (voir principe fig. 4.7). La précipitation des sels en argent métallique est une réaction catalysée par la présence de nanoparticules d'or. A titre indicatif, la taille des particules d'or de diamètre 20 nm est multipliée par un facteur 50 [Ji, 2004]. Le traitement a dans un premier temps été appliqué à la détection de simples brins d'ADN cibles biotinylés sur biopuces par hybridation avec une streptavidine marquée à l'or suivie d'une précipitation à l'argent. Une simple quantification des niveaux de gris des lames scannées a permis de mesurer une sensibilité équivalente par rapport aux marqueurs fluorescents [Alexandre, 2001].



(1) Principe de la détection colorimétrique d'un brin d'ADN biotinylé par précipitation à l'argent [Ji, 2004].

(2) Images MEB d'un dépôt d'or après 15 mn d'incubation avec un kit commercial d'amplification [Alexandre, 2001]. A : Vue des 25 spots sur lame de verre. B : Limite entre le spot et le fond.

Cette méthode trouve naturellement des applications pour la détection électrique d'interactions. Des séquences sondes d'ADN, fixées sur une surface Si/SiO₂ entre deux électrodes en or, permettent de lier des ADN cibles marqués à l'or. Un précipité d'argent permet de court-circuiter le gap, diminuant ainsi la résistance entre les électrodes (Fig. 4.8). Une sensibilité de 10 pM a été atteinte après 10-15 minutes de traitement à l'argent pour une surface inter-électrodes de 16x50 μm^2 [Xue, 2002]. Une étude similaire sur un gap de 20 μm a permis de détecter des sondes à 0,5 pM après 35 minutes [Park, 2002]. Le diamètre initial des particules d'or passe de 30 nm à 300 nm pour faire diminuer la résistivité jusqu'à 5-10 Ω .

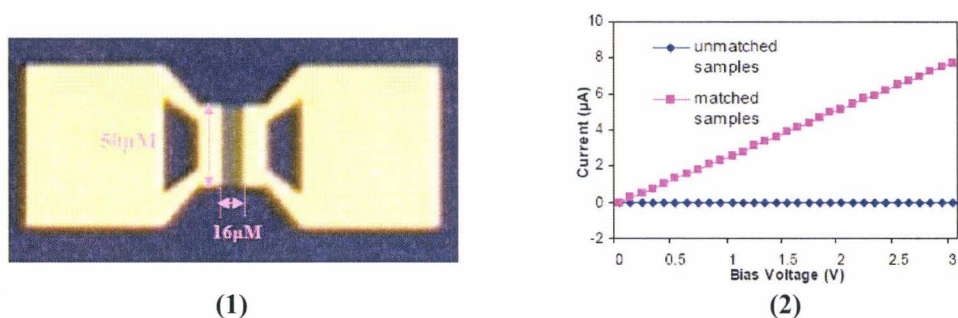


Figure 4. 8

(1) Microélectrodes en Ti/Au fabriquée sur SiO₂[Xue, 2002].

(2) Courbe I(V) des échantillons traités (rose) ou pas (bleu) par le sel d'argent[Xue, 2002].

4 - Fabrication des microélectrodes

Du fait des dimensions micrométriques du gap et de la simplicité de la détection prévue (court-circuit), les électrodes envisagées intègrent des étapes technologiques très simples à mettre en oeuvre. Une étude des dimensions du complexe SpA - IgG est malgré tout nécessaire afin de modéliser l'interaction par rapport aux électrodes.

4.1 - Dimensions spatiales de l'interaction SpA-IgG

D'après la *BPDB*^a, le diamètre de la SpA, assimilée à une sphère en solution, est de trois nanomètres. Une fois la protéine A déposée sur un support tel que le silicium, il se produit un effet d'adhésion qui tend à compacter la protéine [Coen, 2001]. Les études AFM après incubation avec des IgG de lapin donnent au complexe les dimensions mentionnées sur la figure 4.9.

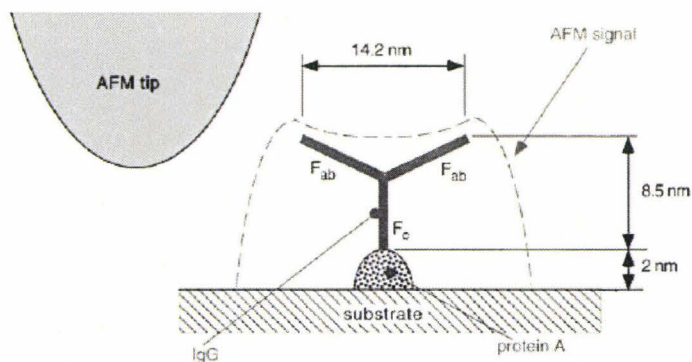


Figure 4. 9 : Dimensions du complexe SpA-IgG à partir d'une étude AFM [Coen, 2001].

^a Brookhaven Protein Data Bank <http://www.nyu.edu/pages/mathmol/modules/proteins/pdb.html>

Ces données sont confirmées par la *PDB*^b, qui évalue les dimensions du complexe formé par le domaine A de la SpA et le fragment Fab d'un anticorps IgM humain à 69x79x163 Å (code structure 1DEE). Enfin, les dimensions d'un anticorps de chèvre anti-IgG humain immobilisé sur du mica silanisé amine sont estimées à 14 x 10 x 4,5 nm [You, 1996].

La rugosité de nos surfaces, inférieure à 1 nm selon nos études AFM, ainsi que la hauteur du film aminopropylsilane, sont négligées. Les dimensions théoriques de l'ensemble <protéine A - IgG - anticorps antihumain>, assimilées grossièrement à un rectangle, devraient donc en théorie atteindre une largeur de 14 nm pour une profondeur de 7 nm et une hauteur comprise entre 20 et 30 nm. Le diamètre des billes d'or liées aux Ac^{II} est de 25 nanomètres, ce qui nous conduit à une hauteur des électrodes au moins égale à 45 nanomètres pour piéger correctement les biomolécules.

4.2 – Mode opératoire

Le substrat est un wafer en silicium (100) couvert d'une couche d'oxyde de 200 nanomètres obtenue par oxydation thermique. Les microélectrodes ainsi que les plots de contact seront définis par photolithographie UV et par un processus *lift-off* basé sur une double couche de titane (5 nm) et d'or (60 nm) déposée par évaporation sous vide. Il est inutile de définir les motifs par *e-beam*, ceux-ci étant de dimension largement supérieure au micromètre. Le choix de la résine optique positive s'est porté sur la S1818 fournie par la société *Shipley*, dont l'épaisseur en fonction des paramètres du *spin-coating* est maîtrisée dans les salles blanches de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN, Villeneuve d'Ascq, France).

Le dessin des électrodes a été réalisé à l'aide du logiciel *WaveMaker*. L'échantillon-type mesure 96 x 188 mm² et comprend 300 paires d'électrodes réparties par gap croissant de 5, 10, 15 et 20 µm (Fig. 4.10). Chaque gamme d'espace inter-électrodes totalise donc 75 électrodes afin de s'assurer de la bonne reproductibilité des mesures électriques. Les caractéristiques de chaque piste sont identiques : 200 µm de longueur pour une épaisseur de 30 µm. Les aires d'intérêt sont donc, par gap croissant, de 150, 300, 450 et 600 µm².

^b <http://www.rcsb.org/pdb/>

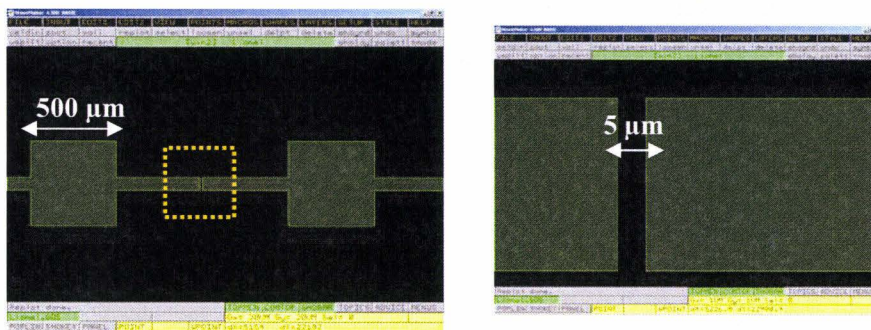


Figure 4. 10 : Vue d'un microgap de 5 µm sur le logiciel WaveMaker.

Enfin, les plots, permettant de relier les pistes à l'impédancemètre, sont prévus pour supporter des pointes de mesures électriques dont l'embout atteint une aire de 20 µm². Dans un premier temps, les motifs finalisés ainsi que les numéros de repère dessinés par informatique sont transmis au service lithographie afin de concevoir un masque positif en chrome. Le protocole complet utilisé par la suite est résumé dans le tableau 4.4.

| | |
|----------------------|--|
| Echantillon | Wafer Si (100)/SiO ₂ 200 nm |
| Nettoyage | . Dégraissage CHCl ₃ . Décapage H ₂ SO ₄ :H ₂ O ₂ 1:1 (v:v) 1 heure . Plasma O ₂ 50 secondes 100W 0,1T . Rinçage eau mQ puis IPA, séchage à l'azote |
| Résinage | . Spin-coating résine S1818 . Recuit 1 mn à 120°C Epaisseur moyenne : 1,43µm |
| Insolation UV | 8 secondes / puissance lampe 7-7,2 mW/cm ² Distance masque chromé-surface : 40 µm |
| Révélation | . Bain MF319 40 sec sous agitation mécanique . Rinçage eau mQ 15 secondes puis séchage à l'azote |
| Métallisation | Evaporation sous vide d'une couche d'accroche de Ti 5nm puis Au 60nm |
| Lift-off | . Bain acétone sous ultrasons 40 minutes . Rinçage eau mQ puis IPA |

Tableau 4. 4 : Protocole expérimental de fabrication des microélectrodes.

Lors des premières expériences, un problème est survenu pendant l'étape du *lift-off*. Après quelques minutes d'immersion dans l'acétone, la couche métallique Ti/Au a eu tendance à se décoller du support, voire à se décrocher entièrement, formant ainsi une sorte de voile en surface (Fig. 4.11). Il est apparu que cette mauvaise adhérence était causée par un temps d'insolation UV trop court (2 secondes). Par conséquent, la résine insolée ne subissait que des modifications structurales partielles et restait probablement sous forme d'un film résiduel avant d'être recouverte par le titane et l'or. L'immersion dans l'acétone avait tendance à dissoudre aussi bien les zones non exposées que les zones exposées, provoquant ainsi le soulèvement de la couche d'or.

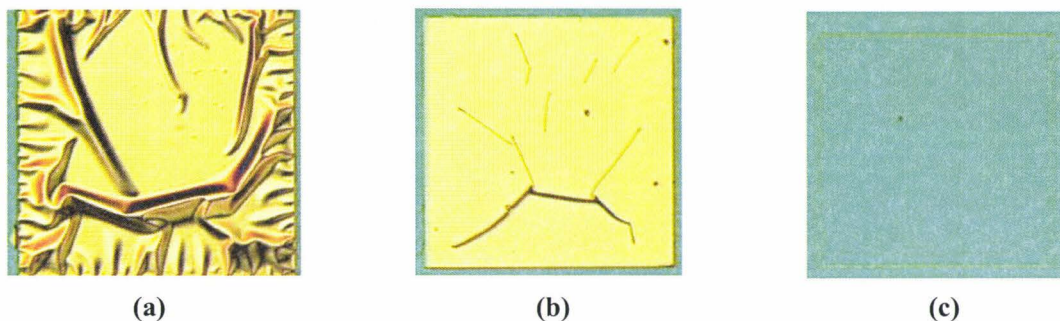


Figure 4.11 : Image en microscopie optique des défauts apparus pendant le *lift-off*.

(a) Aspect voilé de la couche d'or sur un plot de contact (échelle 200x200 μm^2). (b) Aperçu de la disparition de zones d'or. (c) Disparition totale du plot excepté l'or situé sur les contours.

Après allongement du temps d'insolation (huit secondes), les électrodes ne présentent aucuns défauts (Fig. 4.12). Les motifs sont parfaitement définis selon les dimensions prévues.

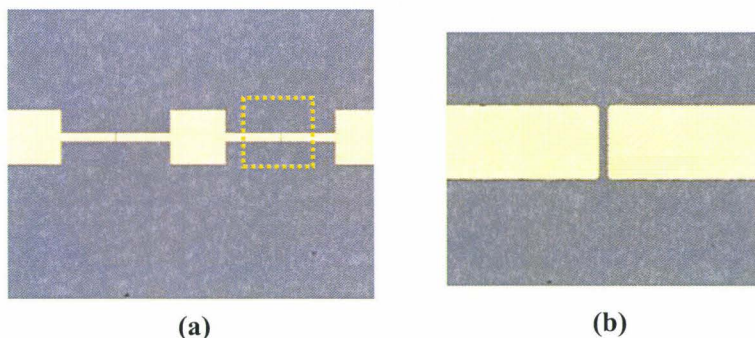


Figure 4.12 : Observation en microscopie optique (a) d'un couple de microélectrodes (zoom x 20) (b) du gap de 5 μm (zoom x 100).

5 – Réalisation de l'interaction secondaire

5.1 – Tests envisagés

Nous souhaitons dans un premier temps détecter sélectivement l'interaction modèle [SpA-IgG] par rapport à une interaction bien plus faible [sonde 2-IgG]. Pratiquement, chaque sonde est spottée sur les différents microgaps (voir grille sur la Fig. 4.13) avant d'appliquer le protocole de dépôt du sérum puis des Ac^{II} marqués à l'or. Un balayage de tension sera imposé à chaque couple d'électrodes après fabrication, avant et après précipitation, afin de mesurer d'éventuelles variations d'intensité (et donc de conductivité).

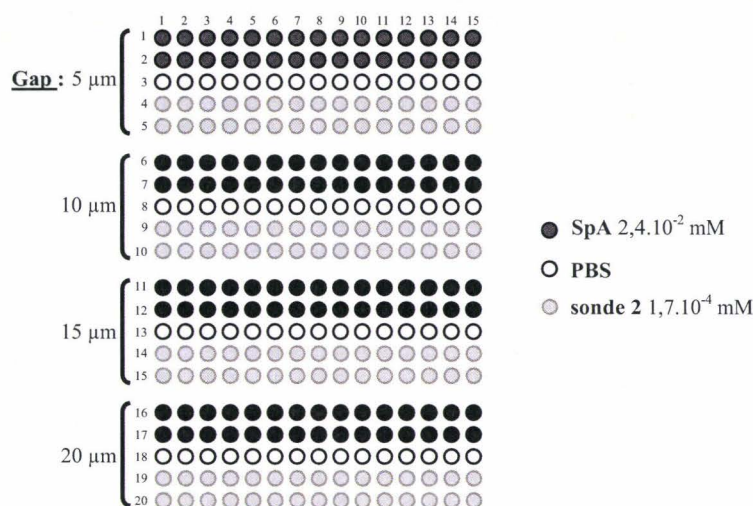


Figure 4. 13 : Plan de *spotting* du test de spécificité.

La grille représente les 300 paires d'électrodes (20 lignes x 15 colonnes) classées par gap (5, 10, 15, 20 µm). Ne sont déposées que les solutions de SpA et sonde 2 avec des spots intermédiaires de PBS.

La seconde approche (Fig. 4.14) vise à déterminer la concentration minimale de protéine A nécessaire pour observer une détection électrique.

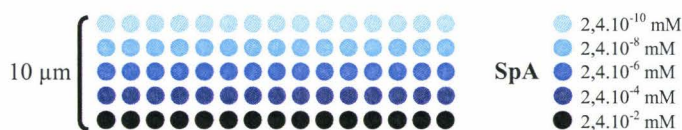


Figure 4. 14 : Plan de *spotting* du test de la concentration en protéine A.

Ce test portera sur une gamme de concentration variant de $2,4 \cdot 10^{-2}$ à $2,4 \cdot 10^{-10}$ mM.

5.2 – Etude du diamètre des spots en fonction du volume spotted

La première étape du protocole, c'est à dire l'immobilisation de la SpA et des témoins, nécessite un ajustement du volume dispensé par le *spotter* sur chaque couple d'électrodes. Le dépôt doit se faire au niveau local afin de minimiser le bruit de fond parasite pendant les mesures et sera l'objet d'une expérience préliminaire. Dans un deuxième temps, l'interaction dont la fiabilité a été étudiée précédemment par fluorescence sera menée à terme avec l'incubation finale d'un anticorps secondaire marqué à l'or. Des observations en AFM permettront de vérifier la validité du protocole utilisé puis de déterminer les densités de NP immobilisées dans chaque gap. Enfin, la méthode impliquant

la précipitation au sel d'argent sera décrite et discutée avant d'aborder les mesures électriques finales.

Afin de localiser précisément les sondes entre les microélectrodes, l'utilisation du *spotter* s'avère cruciale. La caméra CCD équipée d'un microscope optique permet de déposer les différentes sondes en solution directement dans le gap sur un même échantillon. Un ajustement du volume dispensé par le capteur piézo est donc nécessaire afin que le diamètre du spot ne recouvre que la zone d'intérêt.

Différents volumes de Cy3 en solution (10 mM dans le PBS) sont spottés 30 fois (5 lignes x 6 colonnes) sur une lame de verre silanisée amine. La surface est ensuite observée au scanner à fluorescence avant de déterminer les diamètres de chaque spot en fonction du volume (Fig. 4.15).

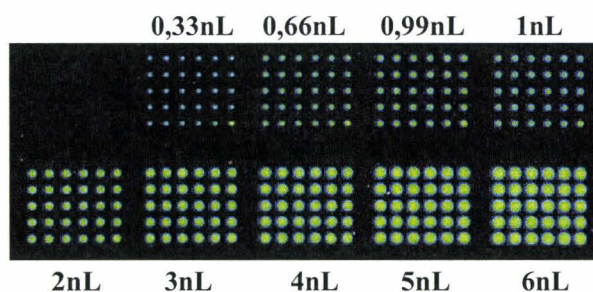


Figure 4. 15 : Intensité de fluorescence sur verre des spots de Cy3 dilué dans le PBS.

Chaque volume est déposé trente fois.

Le diamètre médian d des spots pour chaque gamme de volume est mesuré à l'aide du logiciel *ScanAlyze* (Tab. 4.5). En tenant compte des incertitudes liées à l'imprécision de la caméra (des décalages de 20 μm sont parfois apparus), nous avons choisi pour la suite des expériences un volume V de dépôt égal à six nanolitres de manière à couvrir entièrement le microgap (Fig. 4.16).

| V (nL) | d (μm) |
|----------|-----------------------|
| 0,33 | 150 |
| 0,66 | 180 |
| 0,99 | 200 |
| 1 | 210 |
| 2 | 255 |
| 3 | 290 |
| 4 | 320 |
| 5 | 350 |
| 6 | 370 |

Tableau 4. 5 : Diamètre des spots en fonction du volume spotté.

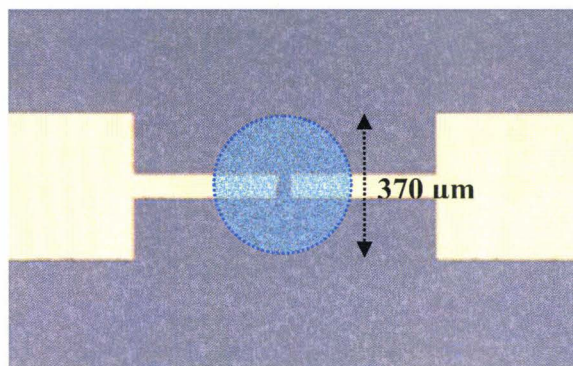


Figure 4. 16 : Simulation d'un dépôt de six nL sur les microélectrodes.

5.3 – Immobilisation du complexe SpA-IgG-Ac^{II}

Le protocole utilisé est similaire à celui reporté dans la partie 2.5 (Tab. 4.6). Nous avons utilisé des anticorps de chèvre anti IgG (H&L) humain lié à des nanoparticules d'or de diamètre 25 nm diluées dans un tampon PBS (pH 7,6) BSA 1% NaN₃ 15 mM. Selon les indications du fabricant EMS (*Electron Microscopy Science*), la concentration en nanoparticules est de $3,3 \cdot 10^{11}$ billes d'or par millilitre. Chaque particule supporte entre 115 et 180 anticorps et compte 467 000 atomes d'or. La masse volumique de la solution commerciale est environ 0,05 mg/mL, soit une concentration égale à 0,25 mM. Nous avons cependant concentré cette solution dix fois (0,025 mM) par centrifugation 15 minutes à 12000 rpm dans un eppendorf. Les particules forment ainsi un culot non-agrégé dans la zone inférieure. Une partie du solvant surnageant est évacuée avant resuspension par agitation.

| | |
|------------------------------|---|
| Echantillon | Wafer Si (100)/SiO ₂ 200 nm portant 300 paires de microélectrodes |
| Nettoyage | <ul style="list-style-type: none"> . Dégraissage CHCl₃ . Plasma O₂ 50 secondes 100W 0,1T . Trempage eau mQ |
| Silanisation | <ul style="list-style-type: none"> . Rinçage MeOH . Bain APTMS 3% / MeOH/eau mQ 95% 30 minutes sous ultrasons . Rinçages MeOH, eau mQ, MeOH . Etuve 110°C 15 minutes . Séchage sous vide |
| Spotting | Volume déposé : 6 nL Protéine A (Sigma) 1 mg/mL / PBS Incubation 6 heures à 37°C sous atmosphère humide |
| Révélation secondaire | <ul style="list-style-type: none"> . Lavages PBS Tween 0,05%, eau mQ . Incubation sérum humain dilué au 5/100^{ème} / PBS Tween 0,05% BSA 2% 1 heure . Lavages PBS Tween 0,05%, eau mQ . Incubation anticorps anti Ig(H&L) humain or 25nm concentré 10x 1 heure . Lavages PBS Tween 0,05%, eau mQ, EtOH absolu . Séchage sous vide à l'abri de la lumière . Observations AFM |

Tableau 4. 6 : Capture des IgG sériques par immobilisation de la protéine A dans un microgap avec incubation d'un anticorps secondaire marqué à l'or.

5.4 – Observations en AFM

L'observation a été effectuée en mode tapping directement dans le gap. La forte densité (120 part/ μm^2 , Fig. 4.17) de particules d'or observée quand la protéine A est spottée à $2,4 \cdot 10^{-2}$ mM montre que l'interaction entre la protéine A et les IgG sériques est correctement réalisée. De plus, le témoin impliquant les anticorps de chèvre ne permet d'observer qu'un très faible nombre de NP (20 part/ μm^2).

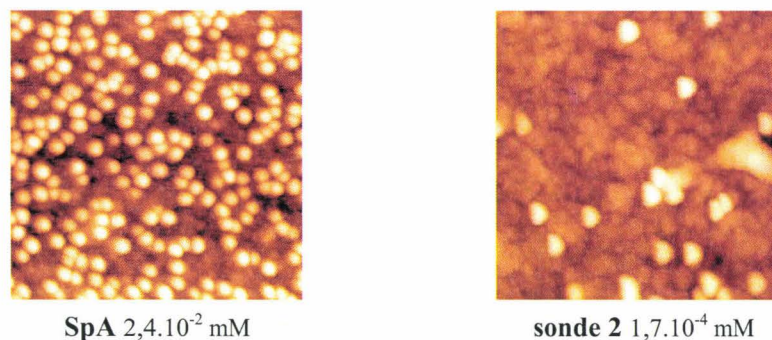


Figure 4. 17 : Images AFM du gap après incubation sur la SpA (à gauche) et la sonde 2 (à droite) d'un sérum humain puis d'Ac^{II} anti-humain marqués à l'or (échelle : 1 x 1 μm^2).

Ce constat recoupe les images obtenues par fluorescence (paragraphe 2.4) : la sonde 2 réagit peu avec les immunoglobulines humaines. Pour chaque sonde, seules quelques particules isolées se sont fixées sur les pistes en or. On considère donc l'aire de la surface d'intérêt comme étant l'aire du spot moins l'aire de chaque piste incluse dans ce spot, soit 90 000 μm^2 .

En tenant compte de la densité moyenne des particules observées précédemment pour chaque sonde (120 et 20 part/ μm^2), le nombre total de particules déposées sur chaque spot, après lavages, peut être estimé respectivement à 10^7 et $2 \cdot 10^6$ particules. De plus, la concentration initiale de la solution d'Ac^{II}-or spottée ($3,3 \cdot 10^{12}$ part/mL) et le volume dispensé (6 nL) permettent le calcul du nombre de nanoparticules total déposées sur la surface et susceptibles en théorie de lier les IgG. Nous supposons que les colloïdes se déposent sur la surface selon un remplissage maximal. Les espaces libres entre les sphères ne sont pas pris en compte dans nos calculs. Le taux de couverture, présentant le rapport entre le nombre de billes réellement fixées sur la surface et le nombre de billes total, est donc estimé à 50% pour la sonde protéine A et 10% pour le contrôle anticorps de chèvre.

Le test parallèle, faisant varier la concentration en SpA, permet le comptage de NP jusqu'à $2,4 \cdot 10^{-4}$ mM (14 part/ μm^2 , Fig. 4.18). Les billes d'or deviennent ensuite trop isolées

dans les concentrations inférieures ($2,4 \cdot 10^{-8}$ et $2,4 \cdot 10^{-10}$ mM) pour estimer une densité par unité de surface.

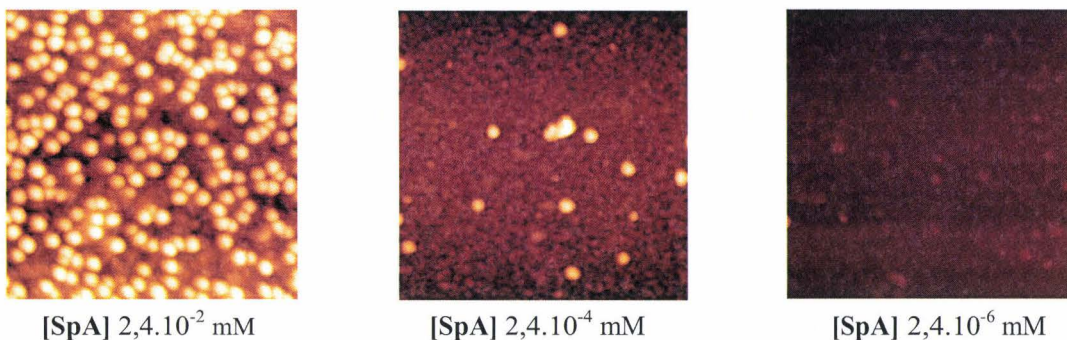


Figure 4. 18 : Clichés AFM du gap en fonction de la concentration en protéine A ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$).

5.5 - Caractérisation électrique des électrodes avant et après traitement

Chaque électrode est testée électriquement avant tout traitement chimique afin de vérifier i) les propriétés isolantes de la couche d'oxyde de silicium ii) la présence éventuelle de défauts de fabrication. En effet, durant le bain d'acétone, de l'or peut se détacher par film de la surface, puis se redéposer dans le gap en provoquant un pontage métallique entre les électrodes. Dans ce cas précis, le courant suit un régime ohmique (Fig. 4,19 a) dans lequel l'intensité est directement proportionnelle à la tension appliquée (b).

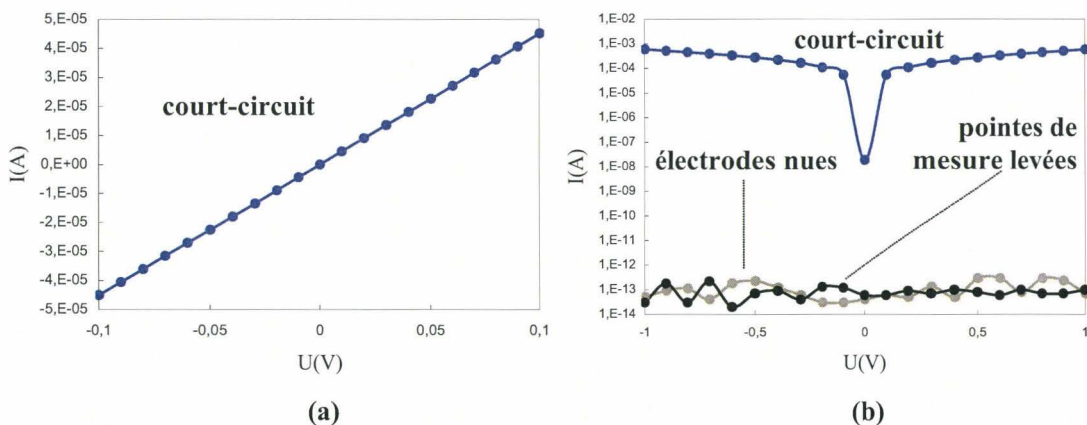


Figure 4. 19 : Courbe intensité-tension des électrodes à vide.

(a) Profil ohmique typique d'une paire d'électrodes court-circuitées. (b) Valeur absolue du courant en fonction de la tension appliquée. L'échelle logarithmique en ordonnée permet de comparer le profil précédent avec les microélectrodes non-traitées.

Les intensités sont mesurées pour des tensions variant en continu avec un pas de 100 mV entre -1 et + 1 V. Nous n'avons observé aucun court-circuit sur les 300 couples

testés. Le courant observé est de l'ordre de 10^{-13} - 10^{-14} A et correspond clairement au bruit de fond résiduel du signal. Celui-ci est en effet similaire au courant obtenu quand les pointes de mesures sont relevées dans l'air. Des mesures électriques identiques sont ensuite réalisées après le dépôt des biomolécules jusqu'au stade de l'anticorps secondaire marqué à l'or. Aucune hausse de courant n'a été constatée quelque soit le gap et la sonde testés.

6 - Amplification par précipitation d'argent métallique

6.1 – Mode opératoire

La précipitation d'argent métallique catalysée par l'or a été réalisée à l'aide d'un kit commercial *Silver Blue* (société *Advanced Array Technology*). Ce kit comprend une solution nettoyante (*block sol*) chargée d'éliminer toute poussière sur les surfaces et de limiter le bruit de fond pendant la révélation, ainsi qu'un réactif qui doit être déposé en solution (*silver staining sol*) sur l'échantillon en moins d'une minute à l'abri de la lumière et à une température inférieure à 20°C. Les incubations ont été menées dans des chambres d'hybridation étanches en polycarbonate selon le protocole décrit dans le tableau 4.7.

| | |
|-------------------|--|
| Rinçage | Bain dans <i>block sol</i> 5 minutes |
| Révélation | Incubation avec la <i>silver staining sol</i> |
| Rinçage | . Interruption de l'incubation avec jet d'eau mQ . Rinçage au MeOH . Séchage à l'azote |

Tableau 4. 7 : Protocole de la révélation à l'argent à l'aide du kit commercial *Silver Blue*.

La révélation est accompagnée d'un suivi par microscopie optique afin de vérifier l'absence d'un bruit de fond important et la croissance du précipité.

6.2 – Détermination du temps optimal de traitement

Les ions Ag^+ présents dans la solution commerciale sont réduits en argent métallique en surface des nanoparticules d'or localisées dans le gap inter-électrodes. Cependant, des NP sont susceptibles de s'adsorber sur des groupements silanols en dehors de la zone où a été spottée la sonde. Ainsi, une précipitation non-spécifique peut apparaître à cause de ces particules physisorbées ou bien à cause d'espèces chimiques parasites. De plus, des court-circuits faux positifs peuvent survenir à partir de la sonde 2 si le temps de révélation est trop long malgré une faible concentration de billes d'or. La maîtrise du temps d'incubation de la solution commerciale est donc un paramètre crucial pour affiner la détection de la protéine A $2,4.10^{-2}$ mM. Nous avons donc mené une expérience indépendante sur un couple d'électrodes (gap de 5 μ m) traité afin de réduire au maximum

le temps de révélation. Des mesures de courant à tension constante (1 volt) sont réalisées en fonction du temps d'incubation t_{inc} jusqu'à la stabilisation du courant (Tab. 4.8, fig. 4.20).

| t_{inc} (mn) | I(A) |
|----------------|---------------|
| 0 | 2.10^{-14} |
| 1 | 7.10^{-14} |
| 3 | 3.10^{-14} |
| 5 | 6.10^{-14} |
| 7 | 7.10^{-14} |
| 9 | $1,2.10^{-8}$ |
| 11 | $7,0.10^{-5}$ |
| 13 | $5,7.10^{-4}$ |
| 15 | $7,3.10^{-4}$ |
| 17 | $7,3.10^{-4}$ |
| 19 | $7,3.10^{-4}$ |
| 20 | $7,3.10^{-4}$ |

Tableau 4. 8 : Intensité mesurée en fonction du temps de révélation pour une tension 1V.

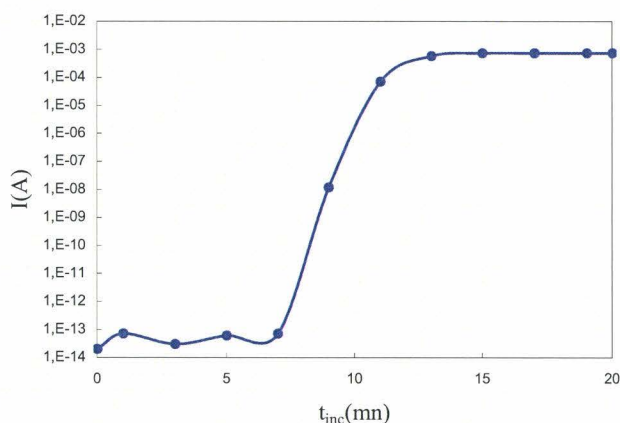


Figure 4. 20 : Diagramme de l'intensité (échelle logarithmique) en fonction du temps.

Pour une durée inférieure à 5 minutes, l'intensité mesurée se situe dans les limites de détection de l'appareil. Le gap contient très peu d'argent métallique (Fig. 4.21 a). Il se produit ensuite un saut d'intensité qui se stabilise vers 10^{-4} A après 14 minutes. Entre 14 et 20 minutes, l'intensité n'évolue plus et le précipité recouvre la totalité du spot en un réseau très dense (c).

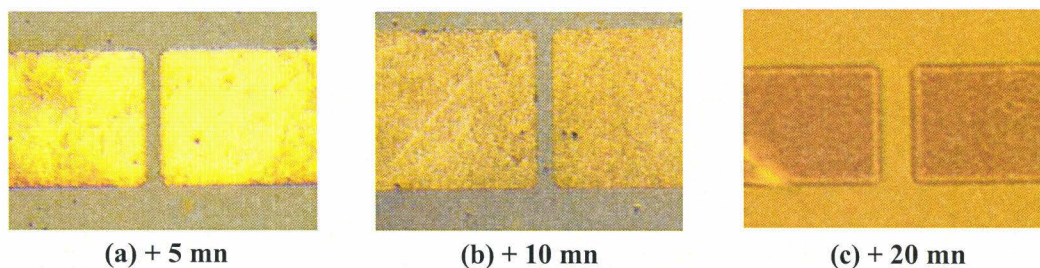


Figure 4. 21 : Vue en microscopie optique du gap 5 µm après 5, 10 et 20 mn de révélation. Le précipité est visible après 5 mn (a) avant de remplir en partie (b) puis entièrement (c) le microgap.

La croissance du précipité n'est pas homogène. Néanmoins, ce phénomène est général compte tenu de la méthode et ne devrait pas perturber la spécificité de la détection pour des gaps plus importants. Par conséquent, le temps de 14 minutes de révélation est retenu pour les expériences finales.

6.3 - Détection électrique

Le protocole de révélation décrit dans le paragraphe précédent est réalisé sur les deux échantillons-tests selon un temps d'incubation de 14 minutes. Chaque test est conforme aux grilles de *spotting* (voir partie 5.1) indiquant les sondes déposées et les concentrations correspondantes.

6.3.a - Test de spécificité

Une observation en microscopie optique montre un précipité plus dense pour la SpA que pour la sonde 2, aussi bien dans le gap qu' autour des pistes (Fig. 4.22 & 4.23).

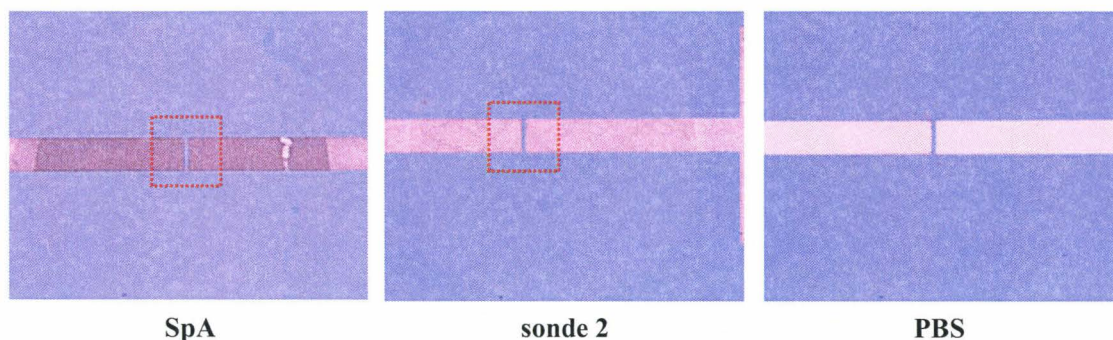


Figure 4. 22 : Vue des électrodes après précipitation à l'argent.

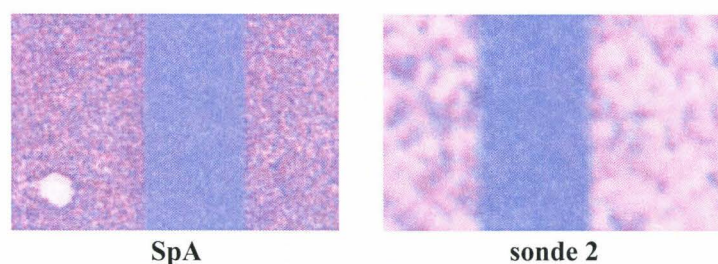
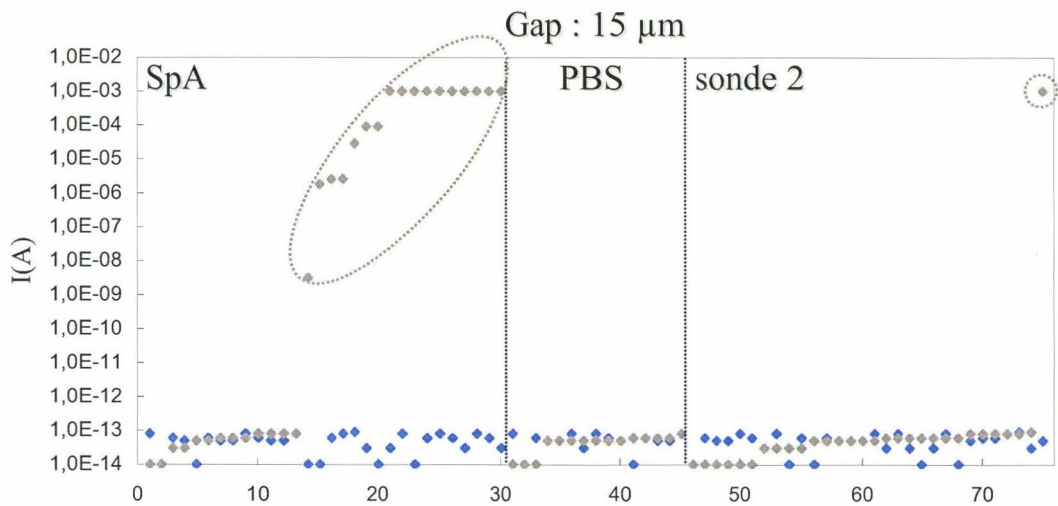
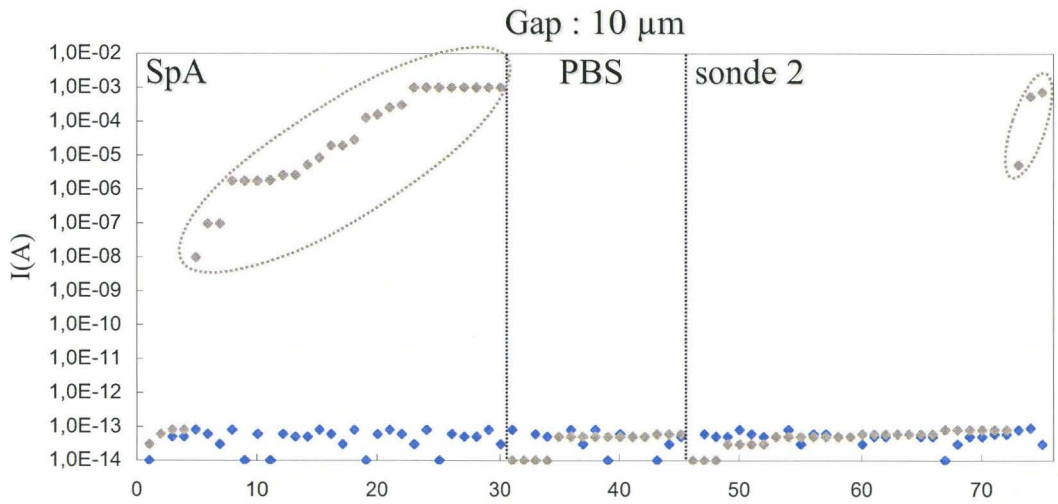
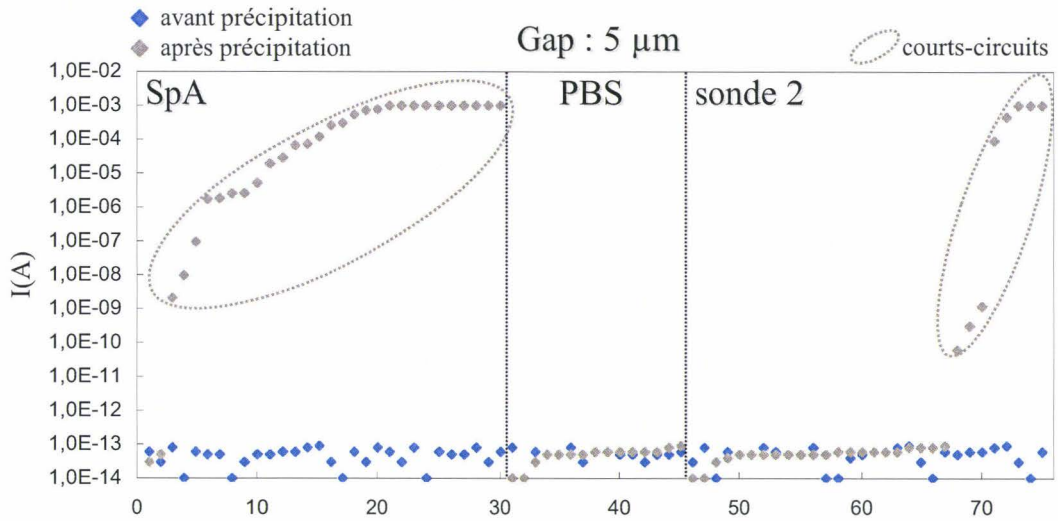


Figure 4. 23 : Zoom sur le microgap.

La figure 4.24 rassemble les intensités mesurées pour chaque paire d'électrodes pendant le balayage $-0,1 \rightarrow 0,1V$ quand la tension est de 1 volt. Chaque graphique correspond à un gap précis et au sein de chaque gap sont délimitées les mesures relatives aux trois sondes distinctes (SpA, PBS et sonde 2). Enfin, chaque couple d'électrodes est

caractérisé selon deux valeurs : l'intensité mesurée avant (carré bleu) et après précipitation (carré gris).



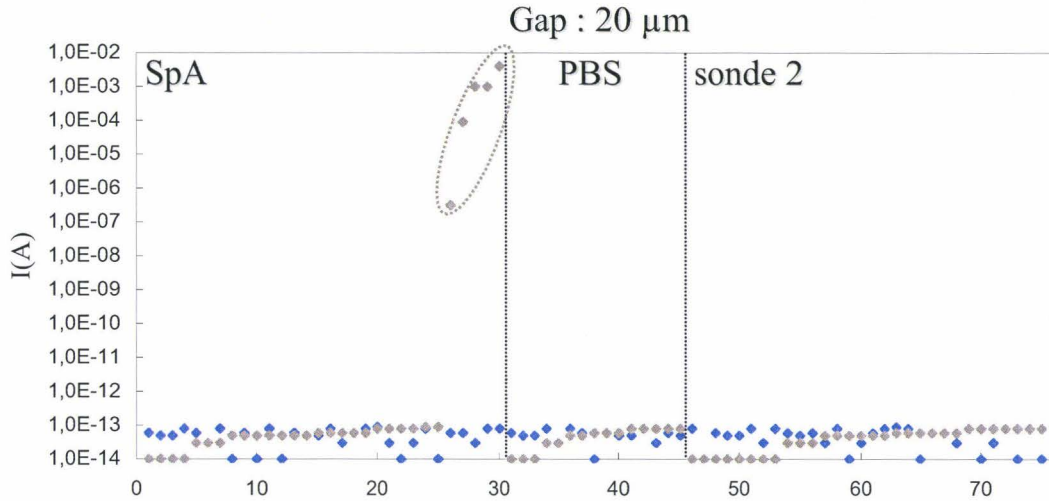


Figure 4.24 : Diagrammes des intensités selon chaque gap pour $U=1V$.

Avant la précipitation, l'intensité varie pour la totalité des électrodes entre 10^{-13} et 10^{-14} ampères. Par contre, après traitement à l'argent, certaines électrodes se dégagent du bruit de fond. Les hausses constatées s'étendent de 10^{-9} à 10^{-3} ampères (entourées en gris sur les graphes) et sont très disparates. Une analyse qualitative des courbes $I(V)$ correspondantes montre un comportement ohmique dans lequel l'intensité est directement proportionnelle à la tension. Ceci est caractéristique d'un court-circuit. A titre d'exemple, quatre courbes typiques sont représentées (Fig. 4.25).

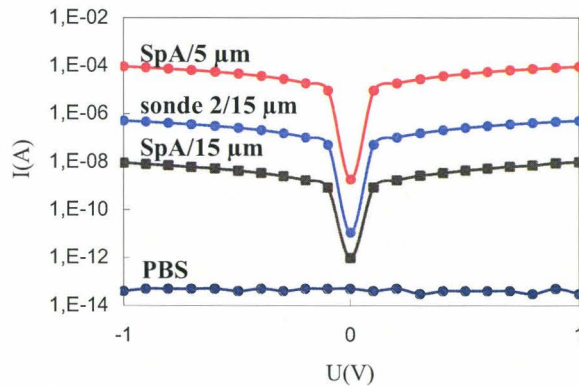


Figure 4.25 : Profils $I(V)$ du PBS et de trois courts-circuits en fonction du gap et de la sonde. Intensité en échelle logarithmique.

Le PBS n'a donné lieu à aucune hausse d'intensité. Le nombre de courts-circuits constaté pour chaque sonde (N_{SpA} et N_{S2}) est reporté dans le tableau 4.9.

| | | Sonde Protéine A $2,4 \cdot 10^{-2}$ mM | | Sonde 2 Ac de chèvre $1,7 \cdot 10^{-4}$ mM | |
|-------------------|----|--|-------------|--|-------------|
| | | Nb. de court-circuits / nb. total d'électrodes | Rapport (%) | Nb. de court-circuits / nb. total d'électrodes | Rapport (%) |
| Gap (μ m) | 5 | 29 / 30 | 97 | 8 / 30 | 27 |
| | 10 | 25 / 30 | 83 | 3 / 30 | 10 |
| | 15 | 17 / 30 | 57 | 1 / 30 | 7 |
| | 20 | 5 / 30 | 17 | 0 / 30 | 0 |

Tableau 4. 9 : Proportion de courts-circuits observés après précipitation pour chaque sonde déposée.

Quelque soit le gap, la SpA provoque après traitement plus de courts-circuits que le témoin. De plus, le nombre de détections positives est logiquement fonction de la distance séparant les électrodes. Plus celles-ci sont proches et plus facilement l'argent métallique provoque un court-circuit. Nous posons arbitrairement la condition suivante afin de considérer un gap comme approprié pour détecter l'interaction secondaire : la proportion de courts-circuits sur les trente électrodes mesurées doit dépasser 80% des mesures. Les gaps 5 et 10 μ m peuvent donc être considérés comme fiables afin de détecter les IgG. Cependant, un second critère de sélectivité est calculé afin de choisir le gap optimal. Il s'agit du nombre de courts-circuits relatifs à la SpA (N_{SpA}) divisé par celui de la sonde 2 (N_{S2}). Celui-ci est deux fois supérieur pour 10 μ m ($8 > 4$). Ce gap est donc choisi pour le test de concentration en protéine A (Fig. 4.14).

6.2.b - Test de concentration

Les 75 couples d'électrodes de gap 10 μ m sont imprimées selon des concentrations croissantes ($2,4 \cdot 10^{-10}$ \rightarrow $2,4 \cdot 10^{-2}$ mM) en protéine A. L'interaction secondaire est ensuite réalisée avant précipitation à l'argent. Les intensités mesurées pour $U=1V$ sont représentées sur la figure 4.26.

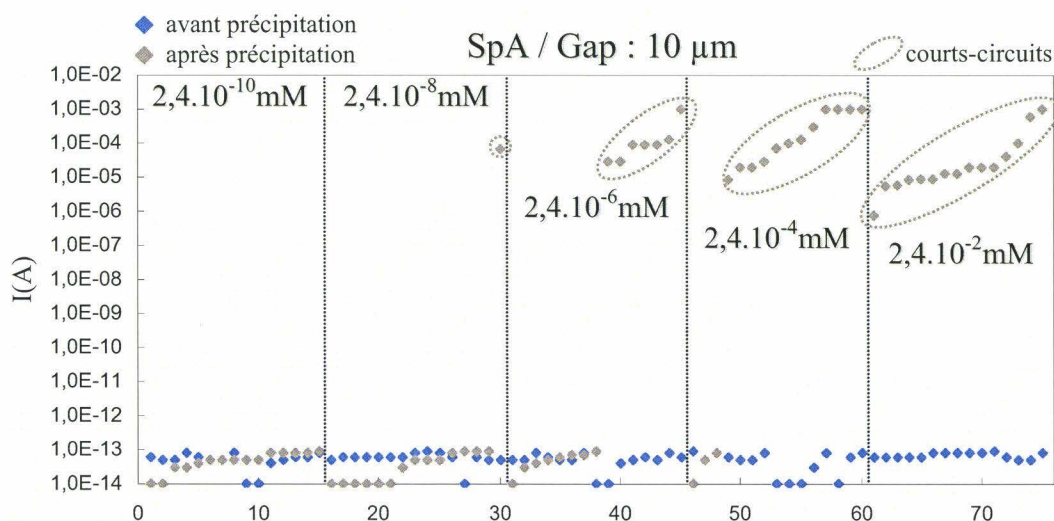


Figure 4. 26 : Diagramme des intensités pour $U=1V$ en fonction de la concentration en SpA.

Le nombre de courts-circuits est consigné dans le tableau 4.10.

| | | Gap 10 μm | |
|--------------------------|----------------------|--|-------------|
| | | Nb. de court-circuits / nb. total d'électrodes | Rapport (%) |
| [Protéine A] (mM) | $2,4 \cdot 10^{-10}$ | 0 / 15 | 0 |
| | $2,4 \cdot 10^{-8}$ | 1 / 15 | 7 |
| | $2,4 \cdot 10^{-6}$ | 7 / 15 | 47 |
| | $2,4 \cdot 10^{-4}$ | 12 / 15 | 80 |
| | $2,4 \cdot 10^{-2}$ | 15 / 15 | 100 |

Tableau 4. 10 : Bilan des mesures électriques.

Le pourcentage de microélectrodes court-circuitées est maximum pour une concentration de $2,4 \cdot 10^{-2}$ mM et tend logiquement à diminuer avec la concentration. Inversement, aucune hausse n'est constatée à $2,4 \cdot 10^{-10}$ mM.

6.4 - Discussion

La méthode de détection s'est révélée effective dans le cas d'une interaction polypeptidique simple. La SpA, sous certains paramètres précis (temps de révélation, largeur de gap), est décelable jusqu'à une concentration de $2,4 \cdot 10^{-8}$ mM environ. Des tentatives pour quantifier les images scannées de nos microélectrodes en fonction du temps de révélation ne permettent pas d'observer un lien direct entre la croissance du précipité et la concentration de la sonde déposée. Afin d'évaluer la variation de résistance observée avant et après un court-circuit, nous avons choisi d'après nos mesures les deux courbes I(V) toutes sondes confondues présentant les intensités maximales et minimales pour un gap de 10 μm . Les courbes de tendance présentent une pente qui, d'après la loi d'ohm, correspond à la résistance (Fig. 4.27).

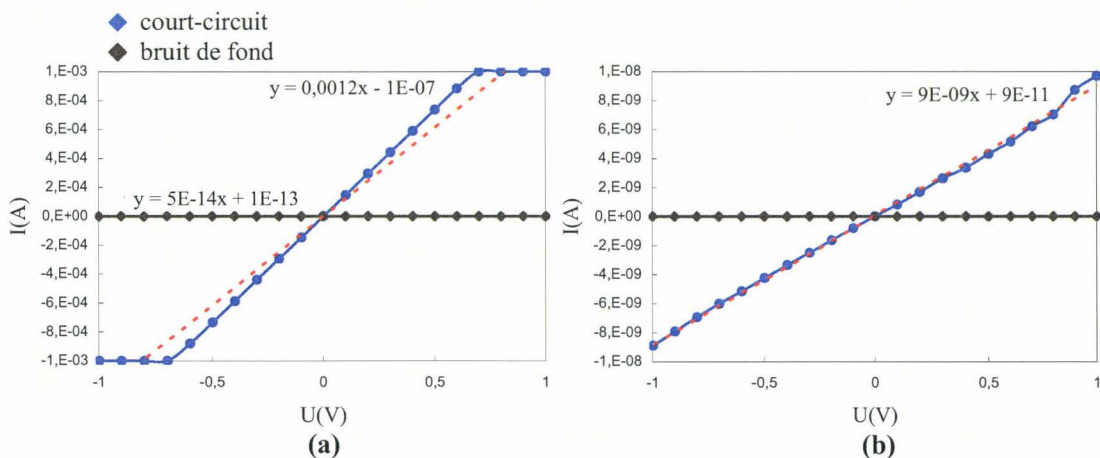


Figure 4. 27 : Calcul de la résistance à partir des profils I(V) extrêmes.

La résistance initiale (pente de la courbe rouge) d'une valeur de plusieurs centaines de méga-ohms chute respectivement au milli- et nano-ohm. Cette valeur diminue donc de onze et cinq décades. Cette distribution *a priori* large des valeurs ne sera pas étudiée plus en détail ici dans la mesure où l'objectif de notre travail porte principalement sur les nanoélectrodes présentées dans le chapitre suivant. De plus, les expériences n'ont pas été réalisées sur plusieurs échantillons afin de tester la reproductibilité de la méthode.

L'extension immédiate de ces travaux vise à affiner ces paramètres de la révélation afin de détecter différentes concentrations de sonde (voire différentes sondes telles que des séquences antigéniques) en fonction de l'intensité mesurée. La méthode deviendrait alors quantitative et non plus seulement qualitative (court-circuit/pas de court-circuit). Une telle approche est envisageable au vu de nos travaux et d'études antérieures [Ji, 2004; Liang, 2004].

Par conséquent, la méthode décrite dans ce chapitre constitue un point de départ à la détection *via* des nanoélectrodes. Le complexe protéine A- IgG a été fixé sur lame de verre et sur silicium après détection par fluorescence, validant ainsi le protocole expérimental qui sera utilisé dans le chapitre V. De plus, une technique de détection innovante a été initiée. En effet, à notre connaissance, la méthode visant à court-circuiter des microélectrodes par une précipitation à l'argent n'a jamais été utilisée pour détecter des récepteurs issus d'un milieu biologique complexe.

La dernière étape de notre projet consiste à s'affranchir de l'amplification par sel d'argent en utilisant cette fois un nanogap. Nous nous basons cette fois-ci directement sur les propriétés électriques des molécules biologiques et des nanoparticules afin de conduire le courant entre des électrodes métalliques. Nous souhaitons, en divisant le gap d'un facteur mille, observer des niveaux de courant plus importants tout en améliorant la spécificité.

Chapitre V : Détection de l'interaction secondaire dans un nanogap

| | |
|---|------------|
| 1 – DETECTION DANS UN GAP VARIABLE 30→280 NANOMETRES..... | 126 |
| 1.1 – CARACTERISATION DES ELECTRODES A VIDE | 127 |
| 1.2 – PROTOCOLE DE DEPOT DU COMPLEXE SPA-IgG PUIS DE L'Ac ^{II} -OR | 128 |
| 1.3 – OBSERVATION DES PARTICULES D'OR EN AFM | 129 |
| 1.4 – MESURES ELECTRIQUES | 131 |
| 1.4.a – <i>Expérience contrôle sans sérum</i> | 131 |
| 1.4.b – <i>Expérience complète</i> | 132 |
| 1.5 – ANALYSE DES COURBES I(V) APRES DEPOT DE L'Ac ^{II} -OR | 133 |
| 1.5.a – <i>Profils observés</i> | 133 |
| 1.5.b – <i>Bilan</i> | 135 |
| 1.6 – ETUDE DE L'INFLUENCE D'UN Ac ^{II} MARQUE A LA RHODAMINE | 136 |
| 1.6.a – <i>Observation en fluorescence</i> | 137 |
| 1.6.b – <i>Mesures électriques</i> | 137 |
| 1.7 – INTERPRETATION | 139 |
| 2 – DETECTION DANS UN GAP VARIABLE 30→90 NANOMETRES..... | 141 |
| 2.1 – SOURCES DE COURTS-CIRCUITS PREMATURES | 142 |
| 2.2 – OBSERVATION MEB DES PARTICULES D'OR DANS LE GAP | 144 |
| 2.3 – MESURES ELECTRIQUES | 144 |
| 2.4 – ANALYSE DU PROFIL DES COURBES I(V) | 148 |
| 2.4 – IMPACT DES PARTICULES D'OR α -OXO ALDEHYDE SUR LE COURANT..... | 150 |
| 2.5 – INFLUENCE DE L'HUMIDITE SUR LA DETECTION | 152 |
| 2.5.a - <i>Approche théorique</i> | 153 |
| 2.5.b - <i>Approche expérimentale</i> | 154 |
| 2.5.c – <i>Mode opératoire</i> | 154 |
| 2.5.d - <i>Conclusions</i> | 155 |
| 3 – BILAN | 155 |

La détection électrique d'une interaction biologique secondaire immobilisée dans un microgap a été validée dans le chapitre précédent. Ce nouveau chapitre se place dans un cas intermédiaire entre la mesure intrinsèque de la conductivité d'une molécule unique [Porath, 2000] et la détection nécessitant un marquage colloïdal ainsi qu'une métallisation localisée [Park, 2002]. Nous souhaitons détecter au sein d'un nanogap l'interaction SpA-IgG sériques à l'aide d'anticorps secondaires Ac^{II} marqués à l'or. Rien n'empêche cependant de penser qu'une hausse de conductivité peut se produire après le dépôt de la SpA puis après formation du complexe SpA-IgG. Des mesures électriques intermédiaires sont donc prévues.

Pour cela, nous utiliserons les électrodes (notées **B**) à nanogap variable (30→90 nanomètres, voir fig. 5.1) dont le processus de fabrication a été décrit dans la partie 2 du chapitre III. Un protocole identique est répété afin de produire une forme **A** plus large (30→280 nanomètres).

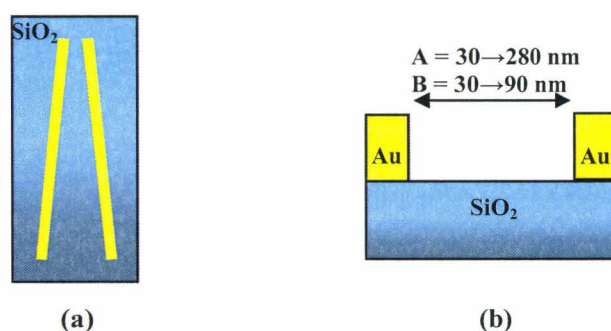


Figure 5.1 : Géométries utilisées. (a) Vue de l'échantillon par le haut. (b) Coupe transversale.

Nous étudions dans un premier temps l'effet de la géométrie **A** sur la détection électrique (**partie 1**). La structure proposée est *a priori* peu contraignante vis-à-vis du diamètre des particules d'or utilisées (25 nanomètres) et permet, en plus des hausses de courant constatées, une étude en microscopie électronique de l'insertion des nanoparticules en fonction du gap. Des expériences complémentaires visent à observer l'influence d'un Ac^{II} marqué à la rhodamine sur les profils I(V) (Fig. 5.2).

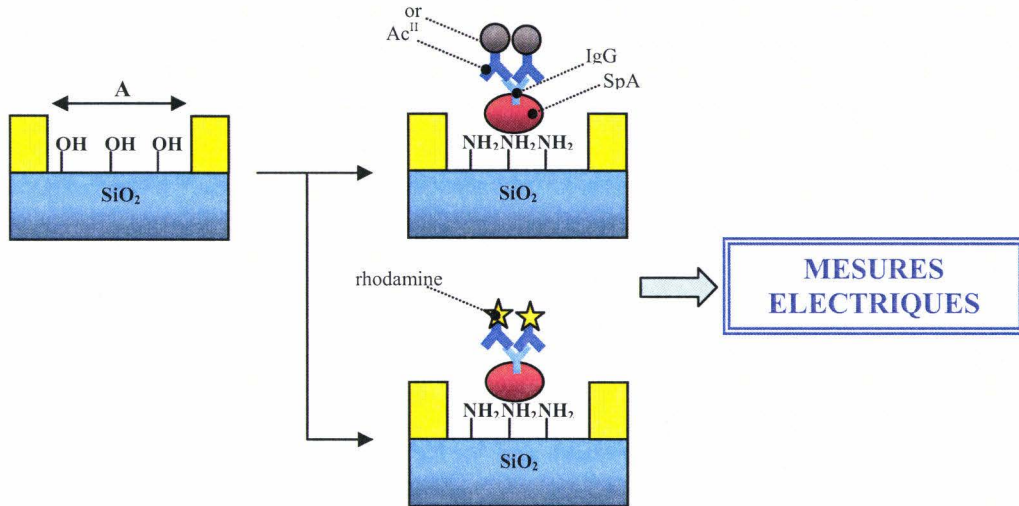


Figure 5. 2 : Expériences envisagées avec la géométrie A.

La **partie 2** propose une amélioration du procédé initial en utilisant une structure resserrée **B**. Celle-ci s'avère plus efficace que la géométrie initiale et met en exergue l'importance des particules d'or dans la conduction du courant à travers le gap. Un transfert électronique par *tunneling* est évoqué afin d'expliquer la forme des courbes $I(V)$. Afin de compléter cette étude, les colloïdes d'or α -oxo aldéhyde synthétisés dans le chapitre III sont directement déposés dans le nanogap semicarbazide avant de nouvelles mesures électriques. Enfin, l'impact de l'humidité sur la conductivité est quantifié à l'aide d'un dispositif permettant une variation graduelle de la teneur en eau dans l'atmosphère entourant les électrodes.

Une conclusion ainsi que des améliorations possibles de l'étude seront apportées dans la **partie 3**.

1 – Détection dans un gap variable 30→280 nanomètres

Les nanoélectrodes sont fabriquées par lithographie électronique selon le procédé décrit dans le paragraphe 2.1 du chapitre III. L'organisation des gaps selon dix lignes et dix colonnes est également similaire. Seule la géométrie change. L'espace inter-électrodes varie de 30 à 280 nanomètres après *lift-off* pour une longueur de 35 micromètres (Fig. 5.3).

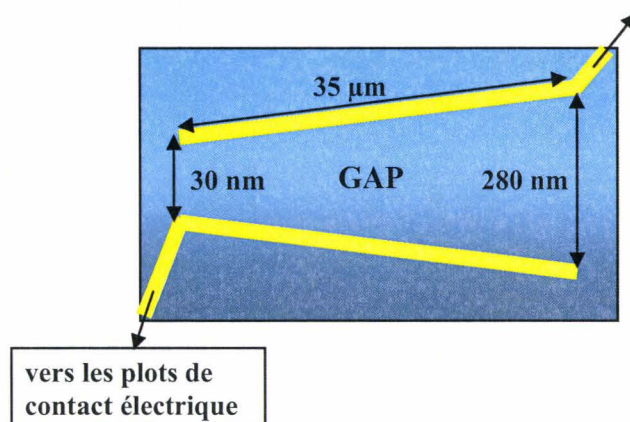


Figure 5. 3 : Géométrie des nanoélectrodes A.

Avant tout traitement chimique et dépôt de biomolécules, des mesures électriques à vide sont nécessaires afin d'éviter tout défaut survenu pendant la fabrication.

1.1 – Caractérisation des électrodes à vide

Sur l'ensemble des échantillons testés électriquement entre -0,1 et +0,1V, seule une électrode sur cent en moyenne a révélé un court-circuit. Il s'est avéré après observation en MEB qu'un léger film métallique pontait les électrodes entre elles, provoquant ainsi l'apparition d'un fort courant ohmique approchant les 10^{-5} - 10^{-3} ampères (Fig. 5.4). Ce phénomène classique en microfabrication est issu des bains d'acétone pendant le *lift-off*. Généralement, la résine dissoute dans le gap entraîne avec elle une couche d'or qui peut éventuellement se redéposer au même endroit puis sécher en fin d'expérience. De fréquents changements de bain d'acétone ainsi qu'une agitation mécanique permettent de limiter ce dépôt.

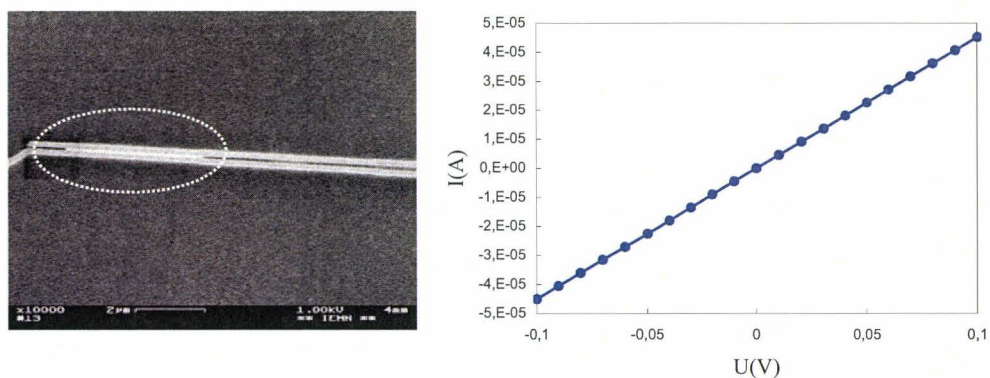


Figure 5. 4 : Image MEB d'une paire d'électrodes court-circuitée et courbe I(V) correspondante.

Les électrodes concernées sont écartées pour la suite des expériences. Par contre, les 99 paires d'électrodes restantes présentent des courbes I(V) assimilables au bruit de fond généré par l'appareil de mesure (Fig. 5.5).

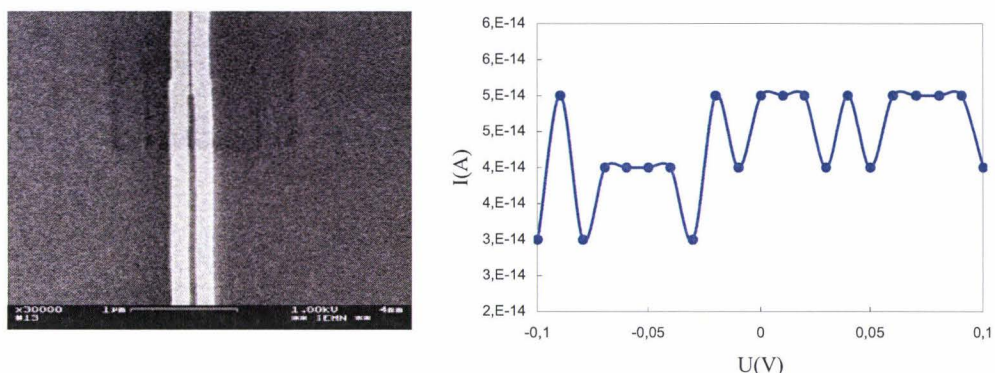


Figure 5. 5 : Image MEB d'une électrode validée (gauche) et profil I(V) correspondant.

Les intensités mesurées sont comprises entre 2.10^{-14} et 7.10^{-13} ampères.

1.2 – Protocole de dépôt du complexe SpA-IgG puis de l'Ac^{II}-or

Le protocole est identique à celui proposé dans le paragraphe 5.3 du chapitre IV. Il est de nouveau reproduit ici afin de visualiser les étapes de mesure électrique (Tab. 5.1).

| | |
|------------------------------|---|
| Echantillon | Wafer Si (100)/SiO ₂ 200 nm portant 100 paires de nanoélectrodes 30→280 nm |
| Nettoyage | . Dégraissage CHCl ₃ . Plasma O ₂ 50 secondes 100W 0,1T . Trempage eau mQ |
| Silanisation | . Rinçage MeOH . Bain APTMS 3% / MeOH/eau mQ 95% 30 minutes sous ultrasons . Rinçages MeOH, eau mQ, MeOH . Etuve 110°C 15 minutes . Séchage sous vide |
| Spotting | . Volume déposé : 2 nL → Protéine A (Sigma) $2,4.10^{-2}$ mM → PBS → Sonde 2 = Ac chèvre $1,7.10^{-4}$ mM . Incubation 6 heures à 37°C sous atmosphère humide . Lavages PBS Tween 0,05%, eau mQ Mesures électriques |
| Révélation secondaire | . Incubation sérum humain dilué au 5/100 ^{ème} / PBS Tween 0,05% BSA 2% 1 heure . Lavages PBS Tween 0,05%, eau mQ Mesures électriques . Incubation anticorps anti Ig(H&L) humain or 25nm concentré 10x 1 heure . Lavages PBS Tween 0,05%, eau mQ, EtOH absolu . Séchage sous vide à l'abri de la lumière Mesures électriques & observation AFM |

Tableau 5. 1 : Protocole expérimental complet d'immobilisation des biomolécules sur Si/SiO₂.

Les différentes sondes sont imprimées selon la figure 5.6.

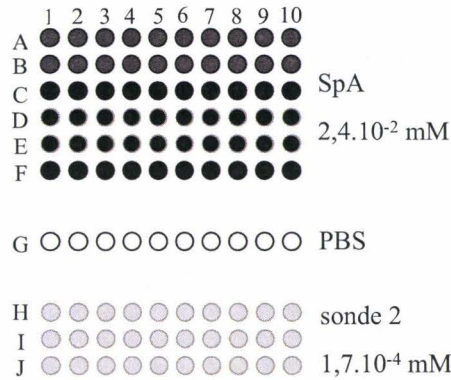


Figure 5. 6 : Schéma de l'impression des sondes sur les cent nanogaps.

Volume déposé : 2 nL. La ligne de PBS est utilisée afin de vérifier une contamination éventuelle de la pointe du *spotter* par la protéine A. Les distances réelles (800 μm en horizontal, 600 μm en vertical) entre chaque paire d'électrodes ne sont pas respectées pour simplifier le schéma.

Un échantillon contrôle est réalisé en parallèle afin de prouver l'implication des IgG dans la détection électrique. Celui-ci est spotté puis incubé directement par les Ac^{II}-or sans dépôt intermédiaire de sérum humain (voir résultats dans la partie 1.4).

1.3 – Observation des particules d'or en AFM

L'interaction protéine A - IgG - anticorps or a bien fonctionné. Les gaps concernés sont remplis de billes d'or (Fig. 5.7). Les NP ont un diamètre apparent supérieur (25-30 nm environ) à celui annoncé par le fabricant. De plus, certains amas de billes d'or ou de sels donnent lieu à des traînées dirigées dans le sens de passage de la pointe. La forte densité de particules et par conséquent les fréquents changements de topographie limitent la résolution de la pointe AFM en mode *tapping*.

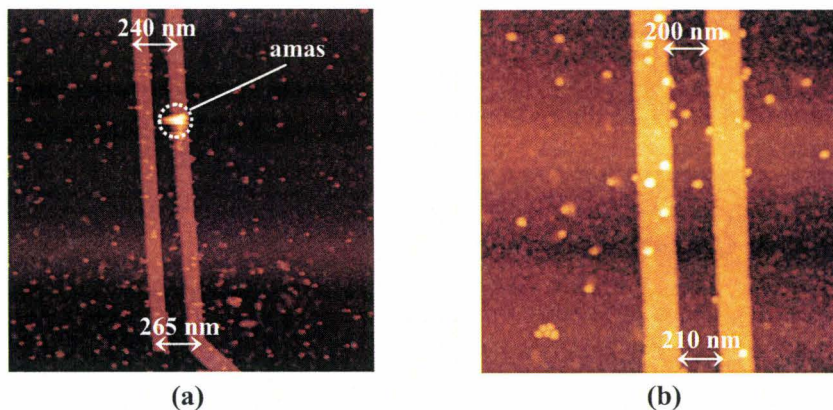


Figure 5. 7 : Clichés du gap maximum (~ 250 nm) après incubation des anticorps marqués à l'or.

Echelles : (a) 4,3 x 4,3 μm^2 . (b) 2 x 2 μm^2 .

A priori, le diamètre réel des billes est trop faible pour être imagé correctement. La pointe semble s'imaginer partiellement elle-même, provoquant ainsi une hausse du diamètre visible sur les images. Les clichés réalisés sur une même zone sont absolument identiques, preuve que la pointe n'entraîne pas durant le balayage des particules d'or. Si la densité de billes autour des électrodes est importante (environ 50 particules / μm^2), elle diminue légèrement dans l'espace inter-électrodes pour de larges gaps et très fortement quand le gap approche les dimensions d'une particule individuelle ($< 10 \text{ part} / \mu\text{m}^2$, voir fig. 5.8).

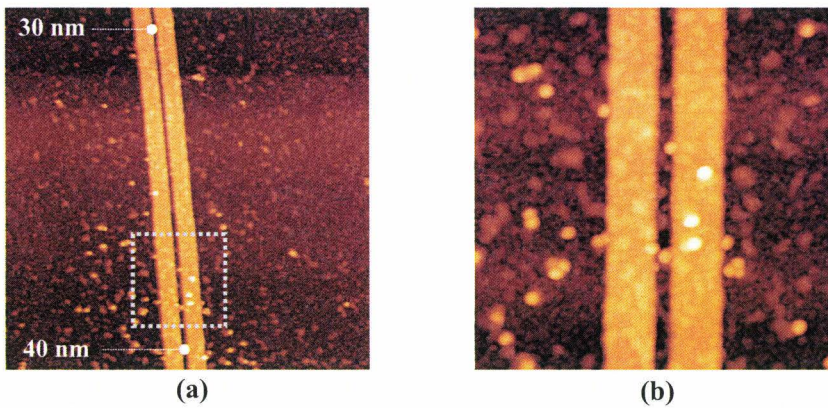


Figure 5.8 : Images AFM du gap minimum. Echelle : (a) 3,75 x 3,75 μm^2 . (b) 1,3 x 1,3 μm^2 .

Une vue en trois dimensions du gap minimum (voir fig. 5.9) montre que les particules sont clairement à l'intérieur du gap et pas seulement physisorbées sur les parois intérieures des électrodes.

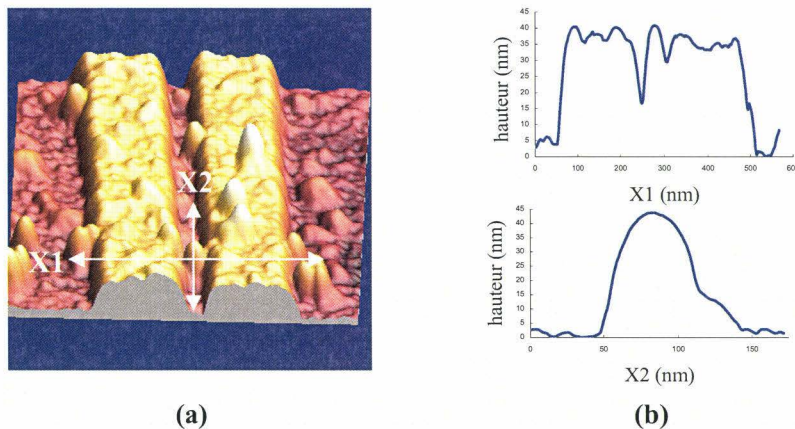


Figure 5.9 : Observation d'une bille d'or capturée dans un gap de 30 nm. (a) Image en 3 dimensions des électrodes. (b) Sections horizontale (X1) et verticale (X2) de la particule d'or : Hauteur en fonction de la distance.

Une estimation des densités en fonction du gap est réalisée sur une dizaine d'électrodes (Tableau 5.2 et fig. 5.10).

| Gap (nm) | Densité (part / μm^2) |
|----------|-----------------------------------|
| 30→70 | < 10 |
| 70→110 | 20 |
| 110→150 | 24 |
| 150→190 | 42 |
| 190→230 | 44 |
| 230→270 | 41 |

Tableau 5. 2 : Densité de particules par μm^2 en fonction de la largeur du gap.

Le nombre de NP tend à diminuer progressivement à partir d'un gap de 150 nanomètres environ. La pénétration des billes est donc partiellement bloquée par les électrodes métalliques.

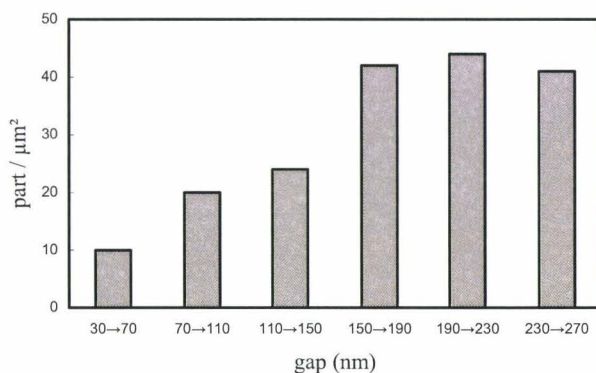


Figure 5. 10 : Diagramme de la densité de particules en fonction du gap.

1.4 – Mesures électriques

Les données obtenues sont présentées dans la gamme de tension $[-0,1 \rightarrow 0,1\text{V}]$ d'une manière similaire au chapitre IV. Chaque étape, pour un même couple d'électrodes, est comparée à l'étape antérieure afin d'évaluer les variations de l'intensité.

1.4.a – Expérience contrôle sans sérum

L'expérience suivante sert de référence avant l'expérience principale (partie 1.4.b). Pour cela, l'étape d'incubation du sérum est supprimée du protocole décrit dans le tableau 5.1. Les mesures de courant (en ordonnée sur la fig. 5.11) sont indiquées pour chaque couple d'électrodes (en abscisse) quand la tension est maximum (0,1V) en fonction de la sonde imprimée (SpA-PBS-sonde 2) et de l'étape expérimentale.

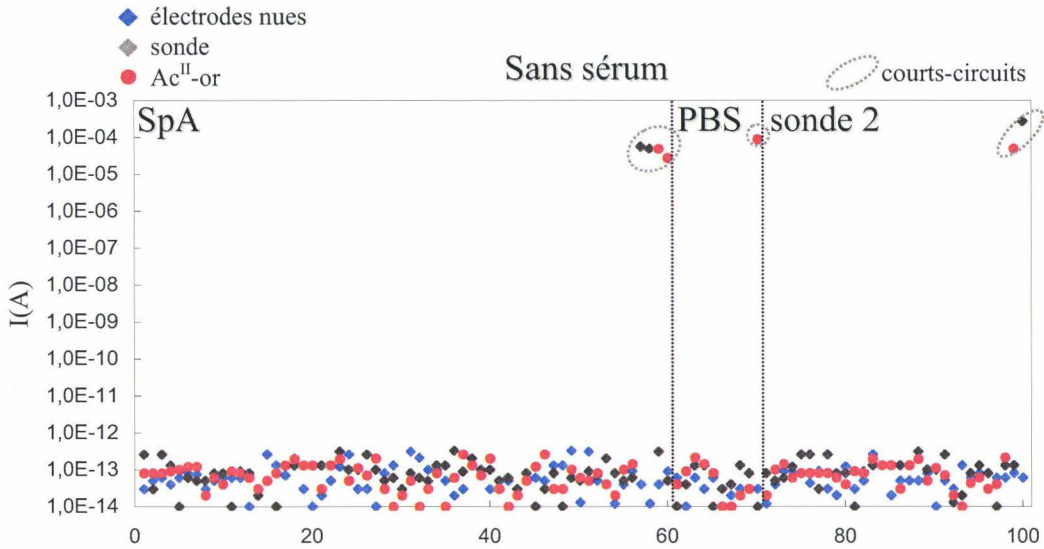


Figure 5. 11 : Diagramme des intensités ($U=0,1V$) sans sérum.

Sur les 100 paires d'électrodes analysés, sept affichent une intensité proche de 10^{-3} ampères en fin de traitement. Après observation en AFM, il s'avère que ces électrodes sont court-circuitées, probablement du frottement avec les chambres d'hybridation. Elles seront donc écartées d'office par la suite. En définitive, aucune hausse de courant n'est constatée quelque soit l'étape du traitement en l'absence de sérum. L'intensité est confinée entre 10^{-14} et $5.10^{-13}A$.

1.4.b – Expérience complète

Le test suivant implique l'étape d'incubation du sérum. L'immobilisation de la sonde puis des IgG ne provoque pas de variation de la conductivité (Fig. 5.12).

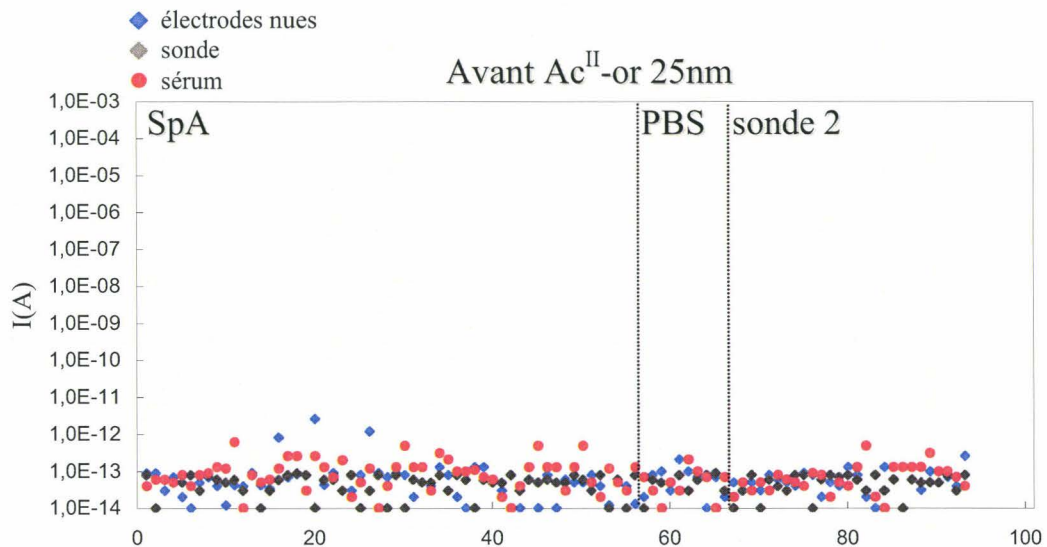


Figure 5. 12 : Diagramme des intensités ($U=0,1V$) avec sérum avant dépôt de l' Ac^{II} -or.

Nous pouvons donc considérer que la SpA et les immunoglobulines i) ne sont pas conductrices ou ii) que la hausse de courant générée par ces molécules est trop faible pour être détectée par notre dispositif. Inversement, le dépôt des Ac^{II} marqués à l'or permet l'observation de vingt hausses d'intensité pour la SpA, quatre pour la sonde 2 (Fig. 5.13).

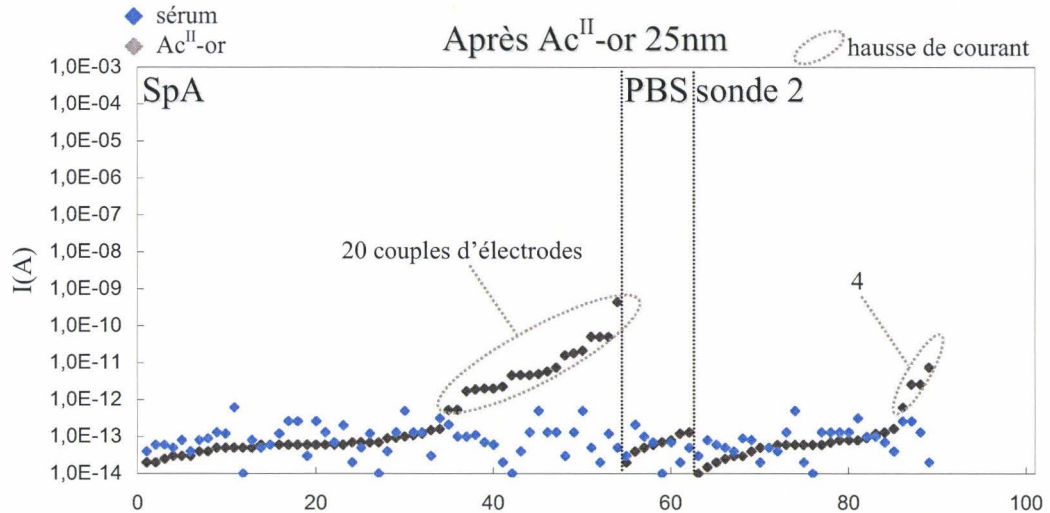


Figure 5. 13 : Diagramme des intensités ($U=0,1V$) avec sérum après dépôt de l' Ac^{II} -or.

Une étude des profils intensité-tension obtenus est nécessaire afin de confirmer la simple analyse quantitative des données.

1.5 – Analyse des courbes $I(V)$ après dépôt de l' Ac^{II} -or

1.5.a – Profils observés

Un phénomène inattendu s'est produit sur huit courbes $I(V)$ relatives à la SpA. Celles-ci (en rouge sur la figure 5.14) présentent dans les tensions négatives une intensité positive ce qui signifie théoriquement que les électrons traversent entre -0,1 et 0,1 volts les électrodes dans le sens inverse à la normale !

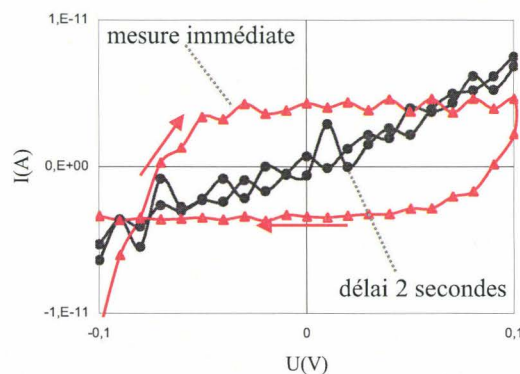


Figure 5. 14 : Profils $I(V)$ caractéristique d'un effet de charge.

Afin d'éliminer cette tendance, il s'avère nécessaire d'induire un temps d'attente (ou *delay time*) sur chaque pas de mesure dès que la tension est imposée par l'impédancemètre. Un délai de deux secondes est suffisant pour obtenir un courant "cohérent" passant par l'origine (courbe noire). De multiples allers-retours de la tension selon ce nouveau paramètre montrent une courbe identique entre chaque balayage.

Dès lors, les profils $I(V)$ résultants sont différents de ceux observés après les étapes d'impression de la sonde et d'incubation du sérum. Afin de distinguer cette tendance d'un simple bruit de fond, nous décidons d'utiliser les bases d'une analyse statistique de régression. Cette analyse a pour objet de prévoir les mouvements d'une variable (l'intensité) en fonction d'une variable indépendante (la tension). On parle alors de régression simple qui présuppose une interprétation arbitraire du comportement de la variable. D'après la courbe noire (voir fig. 5.14), nous choisissons un modèle rectilinéaire de type $I = U.a + b$ (a étant la pente et b l'ordonnée à l'origine), suffisamment différent du bruit de fond *a priori* aléatoire (Fig. 5.15) pour être différencié.

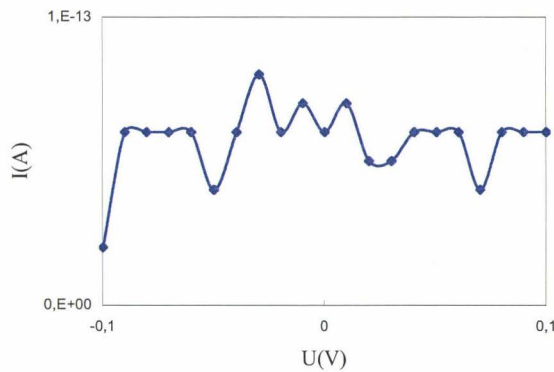


Figure 5. 15 : Profil $I(V)$ caractéristique du bruit de fond entre 0 et 1.10^{-13} A.

La méthode des moindres carrés permet de connaître les paramètres a et b qui réduisent au minimum la somme des carrés des déviations entre les valeurs I expérimentales et les valeurs I correspondantes générées par le modèle. Le coefficient de détermination, noté r^2 , permet d'évaluer la justesse de la relation linéaire entre les deux variables. Compris entre zéro et un, il est donné par la formule

$$r^2 = \frac{[\sum U.I - (\sum U)(\sum I)/n]^2}{[\sum x^2 - (\sum x)^2/n][\sum y^2 - (\sum y)^2/n]} \quad (5-1)$$

et sera calculé directement sous *Excel*. Un coefficient égal à 0,93 signifie que 93% de la variation des points peuvent être attribués à la relation linéaire entre U et I . Les 7% restants sont reliés à d'autres facteurs, dont le hasard.

Par conséquent, nous considérons que toutes les courbes I(V) expérimentales peuvent être modélisées selon une droite de régression. La figure 5.16 reprend les données brutes de la figure 5.13 en affichant en ordonnée le coefficient de détermination issu de chaque profil I(V).

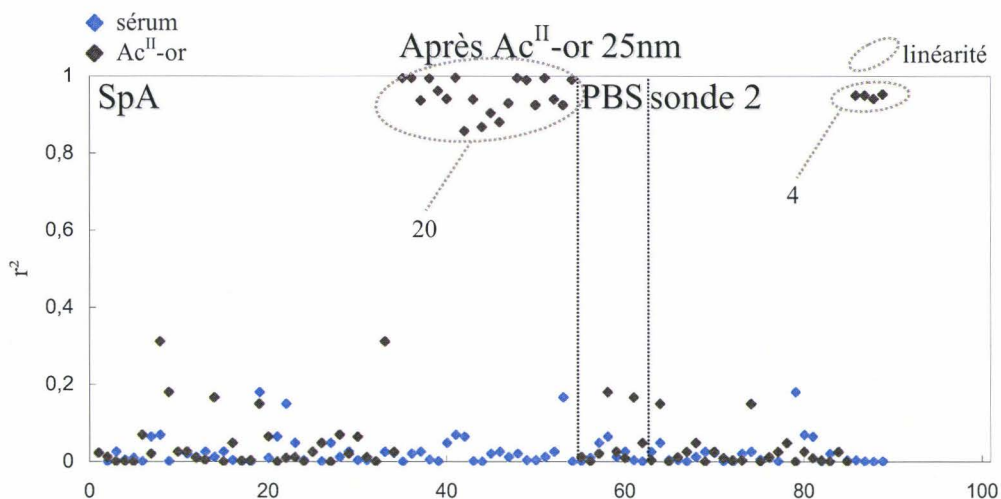


Figure 5. 16 : Calcul du r^2 pour chaque courbe I(V) avec sérum après dépôt de l'Ac^{II}-or.

Les courbes présentant un r^2 compris entre 0,85 et 1 correspondent exactement à celles affichant une intensité supérieure à l'étape d'incubation du sérum quand $U=0,1V$. Les autres mesures, de coefficient inférieur à 0,35, sont représentatives de courants voisins de 10^{-13} - 10^{-14} ampères. Il y a donc une relation entre la linéarité de la courbe et la hausse d'intensité constatée.

1.5.b – Bilan

Tout d'abord, l'expérience contrôle réalisée sans sérum prouve que la détection porte effectivement sur le complexe SpA-IgG. Le gain est défini comme le rapport des intensités mesurées sur un même couple d'électrodes entre deux étapes consécutives du traitement biochimique. Celui-ci est mesuré sur chaque échantillon ayant affiché après les analyses quantitatives (intensité à $U=0,1V$) et qualitatives (r^2) une détection positive. L'analyse médiane des intensités ainsi que des intervalles interquartiles correspondants (Fig. 5.17) montre une forte dispersion des valeurs, particulièrement pour la SpA où les intensités ont atteint le nanovolt.

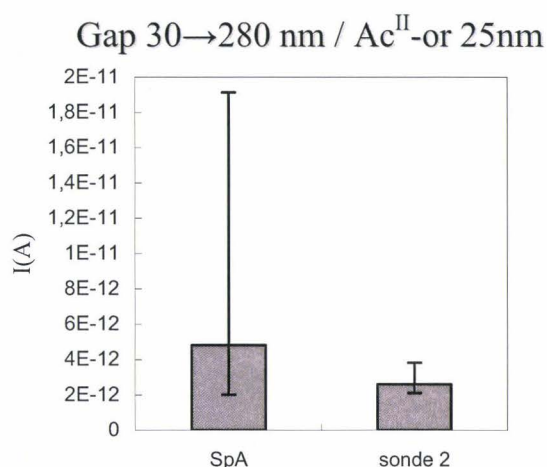


Figure 5. 17 : Médiane du courant pour chaque détection positive.

Les hausses de courant sont donc plus fréquentes et plus étendues (Tableau 5.3) pour la SpA que pour la sonde 2. Le facteur qualité, que nous utiliserons par la suite après chaque série de mesures positives, est le produit du pourcentage d'électrodes positives par le gain médian. Il permet de tenir compte de la hausse quantitative de l'intensité et de la proportion d'électrodes concernées afin de comparer nos résultats entre eux

| Sonde | Nb. total d'électrodes | Nb. hausse de courant | % | Gain à 0,1V | Nb. court-circuit | % | Facteur qualité |
|---------|------------------------|-----------------------|----|-------------|-------------------|----|-----------------|
| SpA | 59 | 20/55 | 36 | 51 | 4/59 | 8 | 18 |
| Sonde 2 | 30 | 4/27 | 15 | 15 | 3/30 | 10 | 2 |
| PBS | 10 | 0/8 | 0 | 0 | 2/10 | 20 | 0 |

Tableau 5. 3 : Bilan général des mesures électriques.

Le facteur qualité est dix fois plus élevé pour la protéine A que pour l'anticorps de chèvre.

1.6 – Etude de l'influence d'un Ac^{II} marqué à la rhodamine

Selon les mesures électriques précédentes, ni la sonde, ni les IgG sériques capturées ne sont à l'origine du courant observé en fin d'expérience. La jonction entre les électrodes est réalisée après incubation avec l'anticorps secondaire-or. La présente étude consiste à varier le marquage de l'Ac^{II} pour déterminer son importance relative dans la conduction du courant. Nous traitons donc un wafer dans des conditions identiques (silanisation, *spotting*, sérum, voir paragraphe 1.2) à l'aide d'un anticorps secondaire rhodaminé. Celui-ci est un anticorps de chèvre anti-humain IgA+IgG+IgM(H+L) rhodamine fourni par *Jackson Immunoresearch* dilué au 5/100^{ème} dans un tampon PBS Tween 20 0,05% BSA 1%.

1.6.a – Observation en fluorescence

Le wafer est tout d'abord scanné en fluorescence puis chaque spot est quantifié sur le logiciel *ScanArray Express* (Fig. 5.18).

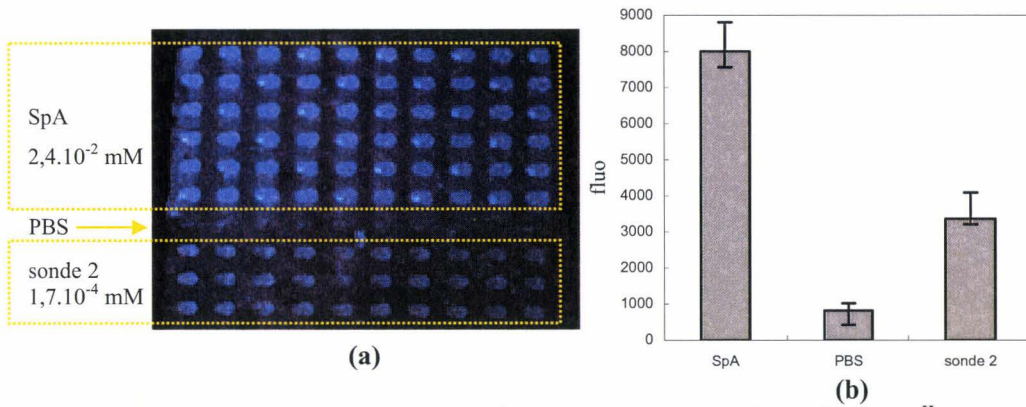


Figure 5. 18 : Diagramme des intensités ($U=0,1V$) avec sérum après dépôt de l' Ac^{II} -rhod.

L'intensité de fluorescence quantifiée pour la protéine A est 2,4 fois supérieure à celle de la sonde 2. Ce rapport est similaire à celle constatée sur lame de verre ($\sim 3,2$) dans la partie 2.4 du chapitre IV.

1.6.b – Mesures électriques

Les intensités mesurées n'évoluent pas jusqu'à l'étape impliquant l'anticorps secondaire (Fig. 5.19).

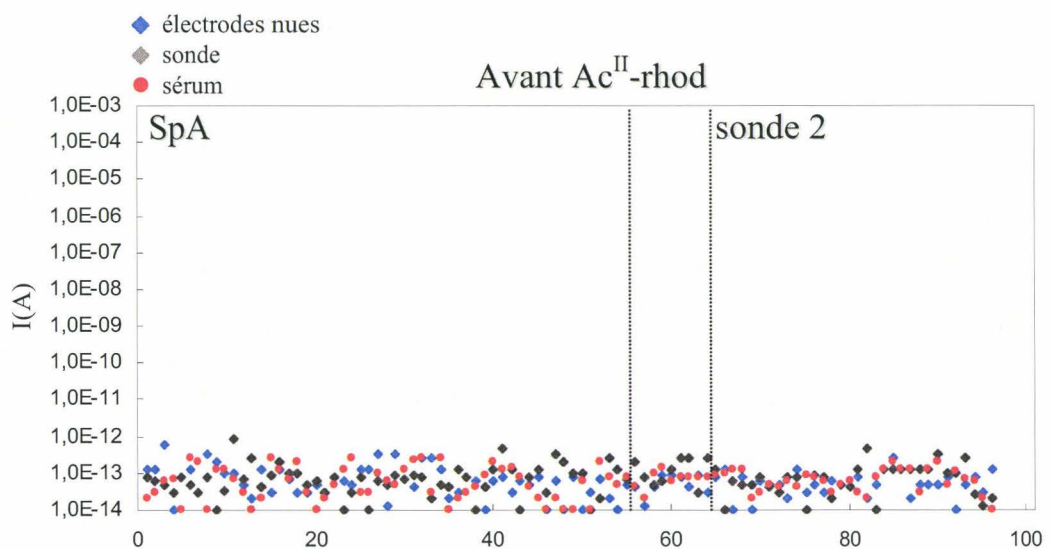


Figure 5. 19 : Diagramme des intensités ($U=0,1V$) avec sérum avant dépôt de l' Ac^{II} -rhod.

Après dépôt de l'Ac^{II}-rhod, dix augmentations de l'intensité sont détectées (Fig. 5.20). Ces variations sont une nouvelle fois confirmées par le calcul du coefficient de détermination (Fig. 5.21)

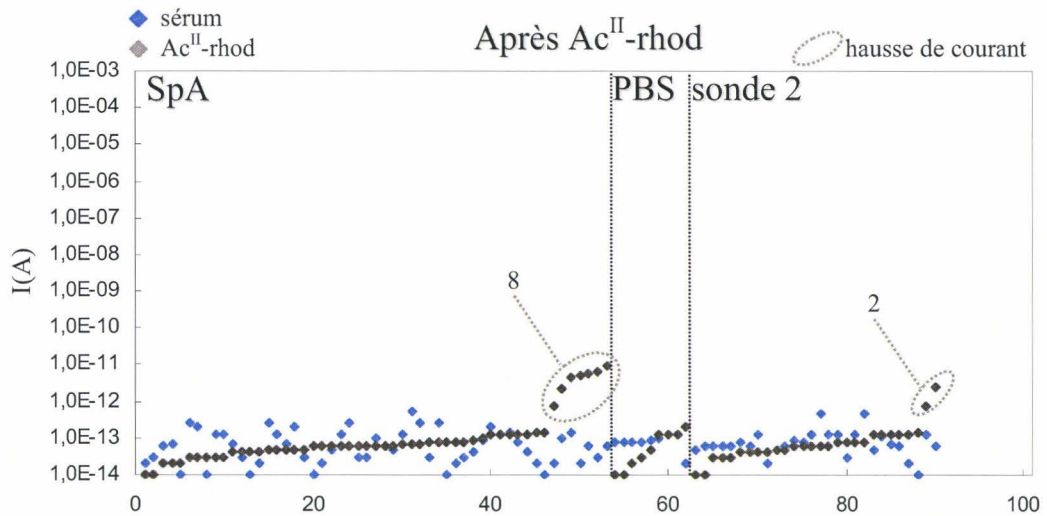


Figure 5. 20 : Diagramme des intensités ($U=0,1V$) avec sérum avant dépôt de l'Ac^{II}-rhod.

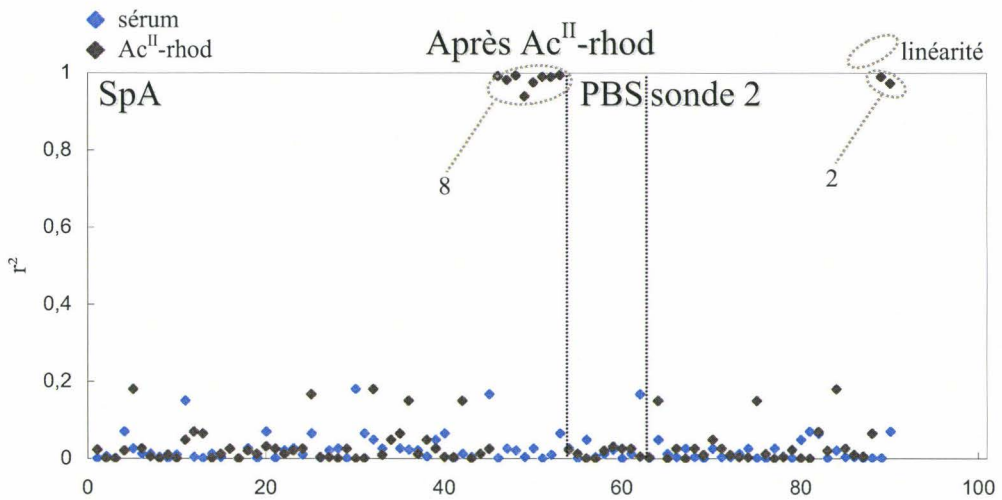


Figure 5. 21 : Calcul du r^2 pour chaque courbe $I(V)$ avec sérum après dépôt de l'Ac^{II}-rhod.

Le courant est multiplié, respectivement pour la SpA et la sonde 2, par 67 et 24 (Fig. 5.22). Ces valeurs sont équivalentes à celles constatées avec un anticorps secondaire marqué à l'or (51 et 15) mais se produisent sur un pourcentage plus faible d'électrodes.

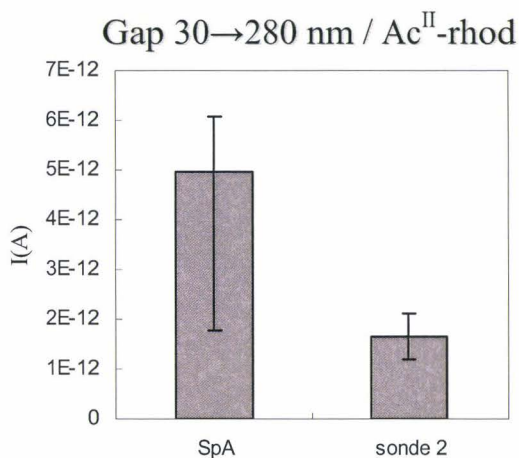


Figure 5. 22 : Médiane du courant pour chaque détection positive.

Par conséquent, le facteur qualité défini précédemment est divisé par deux (Tableau 5.4).

| Sonde | Nb. total d'électrodes | Nb. hausse de courant | % | Gain de courant à 0,1V | Nb. court-circuit | % | Facteur qualité |
|---------|------------------------|-----------------------|----|------------------------|-------------------|----|-----------------|
| SpA | 60 | 8/53 | 15 | 67 | 7/60 | 12 | 10 |
| Sonde 2 | 30 | 2/28 | 4 | 24 | 2/30 | 7 | 1 |
| PBS | 10 | 0/9 | 0 | 0 | 1/10 | 10 | 0 |

Tableau 5. 4 : Bilan.

1.7 – Interprétation

Les résultats expérimentaux précédents montrent que la protéine A ainsi que les immunoglobulines G humaines n'ont aucune incidence (ou une incidence non détectable avec notre dispositif) sur le transfert électronique. Il apparaît également qu'une variation de la conductivité se produit entre les nanoélectrodes après dépôt de l'anticorps secondaire. Dans ce dernier cas, les hausses d'intensité selon un modèle ohmique sont plus fréquentes quand l'Ac^{II} est marqué par une bille d'or plutôt qu'à la rhodamine (Fig. 5.23).

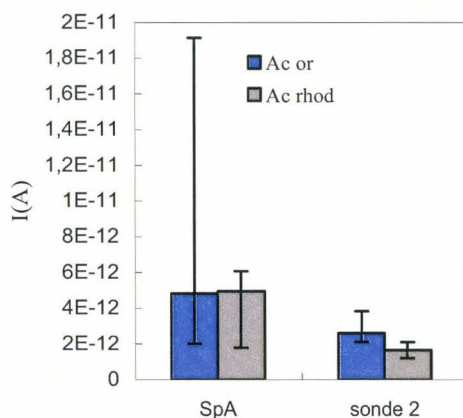


Figure 5. 23 : Diagramme de comparaison du courant selon l'Ac^{II}.

Les profils $I(V)$ sont également modifiés dans la mesure où une partie des courbes observées nécessitent l'application d'un délai avant la mesure électrique afin d'éliminer un effet de charge. Cet effet, déjà observé dans la littérature, est clairement associé à un transfert électronique *via* les nanoparticules d'or [Wang, 2000]. Seule une distance de un à deux nanomètres sépare une nanoparticule des nanoélectrodes (voir clichés AFM, partie 1.3). Expérimentalement, le simple dépôt de NP d'or de 100 nm sur des électrodes interdigitées de gap inférieur (60 nm) provoque l'apparition d'un courant de l'ordre du picoampère [Malaquin, 2004] dont les courbes $I(V)$ sont similaires à nos propres observations.

Il serait maintenant intéressant de tester une expérience contrôle avec un anticorps secondaire simple non marqué afin de trancher sur le rôle précis des billes d'or. Néanmoins, nous pouvons globalement distinguer, suite aux analyses précédentes, les hausses réelles de conductivité par rapport aux courts-circuits et au bruit de fond (Fig. 5.24).

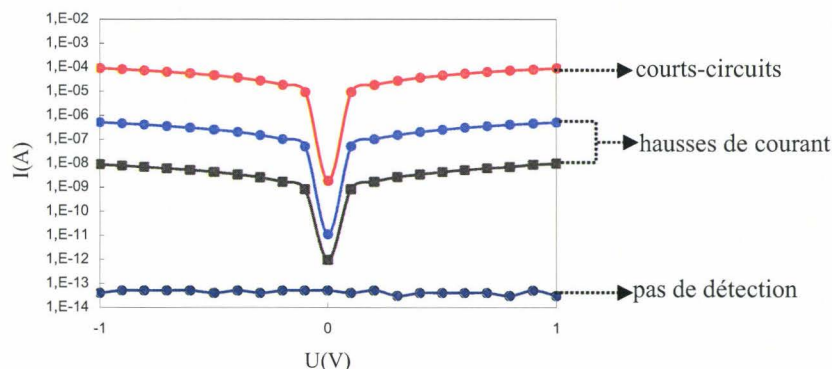


Figure 5. 24 : Profils $I(V)$ types rencontrés. Echelle logarithmique.

Il n'existe que peu d'informations à ce jour visant à décrire les transferts électroniques dans les protéines. L'explication réside dans le simple fait que les protéines ont une faible conductivité intrinsèque (à l'inverse de l'ADN). Par conséquent, certaines études commencent, sur la base de peptides synthétiques simples, à montrer la dépendance du couplage électronique par rapport aux structures secondaires et aux angles diédraux entre résidus voisins [Shin, 2003]. Sur cette base, l'amplification du signal électrique requiert la présence d'une particule métallique [Heath, 2003].

Qualitativement, les courbes $I(V)$ sont compliquées à analyser sans comparaison avec la littérature et sans notions théoriques afin d'expliquer les comportements électroniques. Une étude récente [Tsai, 2005] consiste à détecter sur Si/SiO₂ une séquence d'ADN après reconnaissance avec le brin complémentaire thiolé puis liaison du duplex

avec des particules d'or (12 nm de diamètre). En fonction de la concentration d'ADN cible, les courbes I(V) obtenues avec un gap de 300 nm sont reliées au nombre de particules immobilisées (Fig. 5.25).

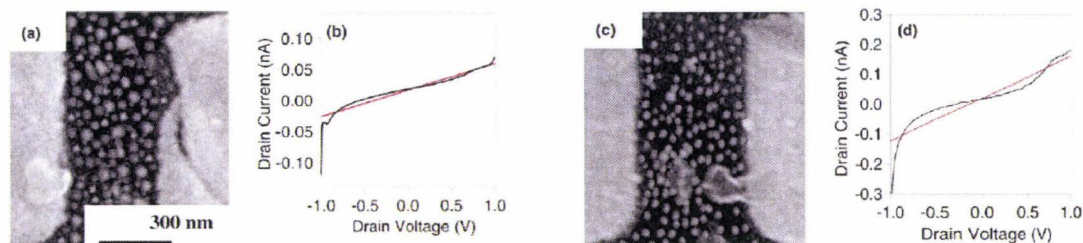


Figure 5. 25 : Images MEB des couches de nanoparticules d'or immobilisées entre des électrodes et courbes I(V) correspondantes [Tsai, 2005]. Concentration de la sonde : (a) 1 fM (c) 10 fM.

Cependant, les densités de particules / μm^2 sont très supérieures aux nôtres (1200-1400 contre 20-40) et leur étude a été réalisée sur un gap fixe. Plus généralement, les études portant sur les transferts électroniques entre des nanoélectrodes impliquent des dispositifs dits à “molécule unique” dans lesquels seuls quelques assemblages moléculaires sont à l’origine des variations de signal électrique.

Nous nous rapprochons de ce type de structure dans la partie suivante en réduisant le gap maximum ainsi que la longueur des électrodes. L’objectif principal consiste à augmenter la sensibilité de notre capteur en jouant sur l’insertion d’un faible nombre de NPAu dans le gap tout en augmentant la probabilité d’un transfert par *tunneling*. Alternativement, les particules d’or fonctionnelles α -oxo aldéhyde seront déposées directement dans l’espace inter-électrodes afin d’évaluer leur rôle exact.

2 – Détection dans un gap variable 30→90 nanomètres

Le processus de fabrication des nanoélectrodes utilisées dans ce paragraphe est décrit dans la partie 2.1 du chapitre III. Pour rappel, le gap varie de 30 à 90 nanomètres pour une longueur de cinq micromètres. Le protocole d’immobilisation des biomolécules est détaillé dans la partie 1.2.

Pour des raisons de sensibilité qui seront clarifiées par la suite, chaque couple d’électrodes est caractérisé électriquement entre $\pm 5\text{V}$ au lieu de $\pm 0,1\text{V}$. Le pas utilisé est de 500 mV pour un total de 21 mesures d’intensité par échantillon. Cependant, ce changement des paramètres a permis de mettre en évidence un phénomène parasite d’électromigration susceptible de court-circuiter les électrodes.

Celui-ci est décrit dans la **partie 2.1** avant de présenter l'observation en microscopie électronique des billes d'or dans les nanogaps (**2.2**), puis les données intensité-tension et leur analyse (**2.3** et **2.4**). La **partie 2.5** présente l'impact des particules d'or fonctionnelles COCHO sur le courant. Une étude alternative de l'influence de l'humidité atmosphérique sur nos mesures (**2.6**) complète ce chapitre avant un bilan de la détection sur nanogap variable.

2.1 – Sources de courts-circuits prématurés

Nous avons remarqué *a posteriori* que les hausses de courant reportées dans le paragraphe suivant nécessitaient l'application d'une tension cinquante fois plus importante ($\pm 5V$) que dans la première partie ($\pm 0,1V$). Certaines électrodes ont donc été observées parallèlement à l'expérience principale afin de vérifier si un phénomène de dégradation était visible. En effet, le courant peut provoquer l'électromigration d'atomes d'or et la rupture éventuelle de la structure pourvu que la tension impliquée soit suffisante [Park, 1999]. Plusieurs observations MEB et mesures électriques ont donc été réalisées séparément après application des différentes tensions (a $\pm 5V$, b $\pm 10V$, c $\pm 15V$) sur dix couples d'électrodes par tension (Fig. 5.26).

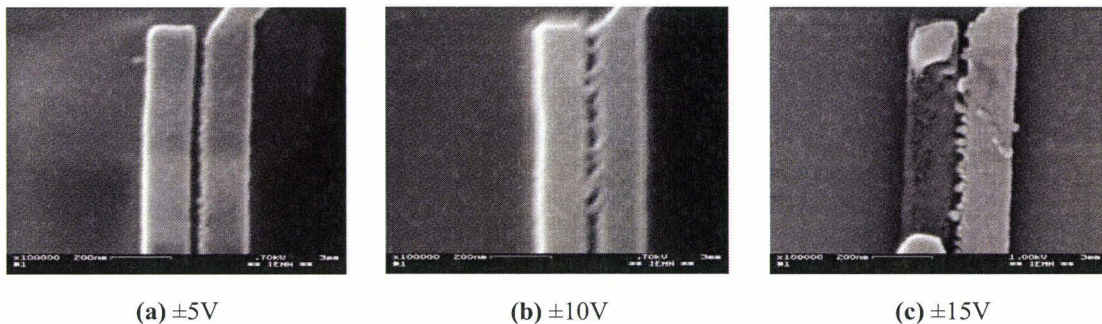


Figure 5. 26 : Phénomène d'électromigration selon la tension appliquée. Clichés MEB : Après application d'une tension variant de -5 à +5V (a), de légères déformations apparaissent. A $\pm 10V$ (b), des fils métalliques en or se détachent des bords et court-circuitent les électrodes. Dans les tensions supérieures (c), des îlots de plusieurs centaines de nm² se détachent.

Une paire d'électrodes sur dix est court-circuitée (courant ohmique de l'ordre 10^{-4} ampères, voir figure 5.27) et s'avère dégradée après l'étape a), cinq sur dix après b) ($\sim 10^{-3}$ ampères) et enfin la totalité après c). Le phénomène d'électromigration est visible sous la forme de fils d'or pontant les électrodes.

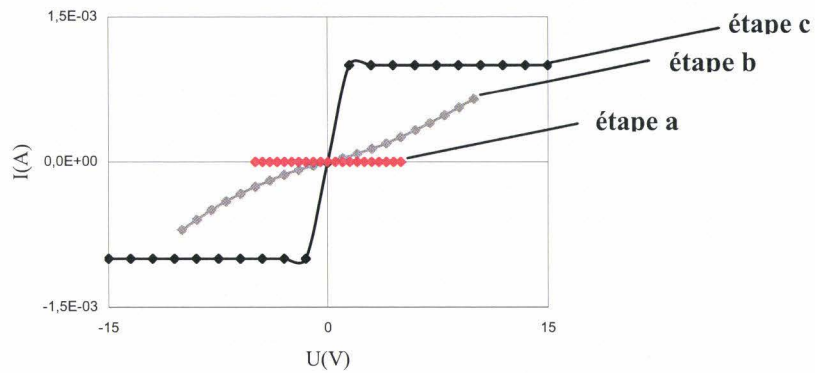


Figure 5.27 : Courbes I(V) en fonction de la tension appliquée.

Les clichés MEB confirment la dégradation des microstructures. Par conséquent, pendant l'expérience à venir, les hausses éventuelles de conductivité seront confirmées ou infirmées par des observations en microscopie afin de valider les résultats.

Une seconde source parasite de courts-circuits des électrodes concerne la technique MEB en elle-même. Le faisceau électronique dirigé selon une fenêtre rectangulaire par le microscope à balayage a la propriété de dégrader la surface des échantillons. Durant l'observation localisée des nanogaps, cette dégradation entraîne un pontage des électrodes et une augmentation du courant mesuré caractéristique d'un court-circuit (Fig. 5.28). Ce constat provient du fait que certains électrodes, ne présentant aucun courant après l'immobilisation des anticorps-or, deviennent subitement conductrices si une étude MEB est réalisée intermédiairement.

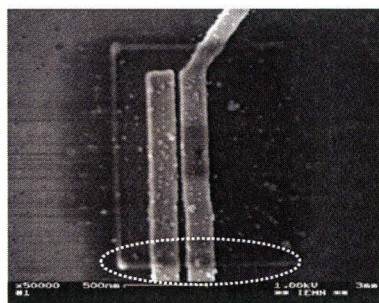


Figure 5.28 : Cliché MEB d'un nanogap observé antérieurement. Le film fondu lors de l'observation précédente est visible dans l'ellipse pointillée : le gap est court-circuité.

Par conséquent, aucune observation en microscopie à balayage durant les tests de détection ne sera réalisée avant les mesures électriques finales.

2.2 – Observation MEB des particules d'or dans le gap

Les nanogaps sont analysés à l'aide d'un filtre atomique fixé dans la chambre sous vide afin de repérer sélectivement l'or sur la surface (Fig. 5.29). Ce dispositif permet de ne pas confondre les particules d'or avec des amas salins. La densité de NP_{Au} est de 200 part/ μm^2 autour des électrodes quand la sonde spottée est la SpA.

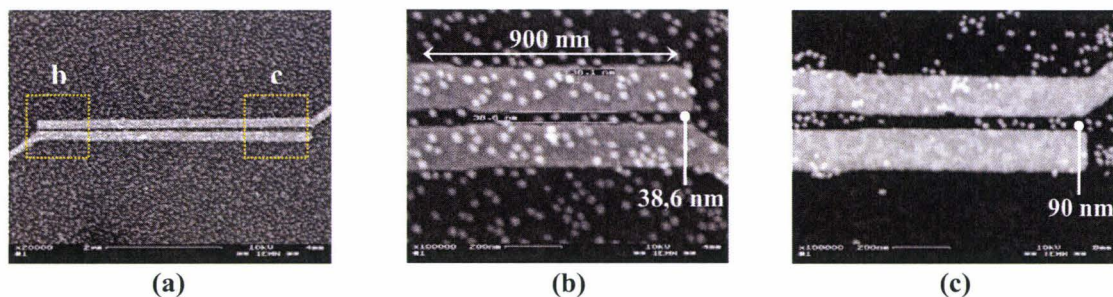


Figure 5. 29 : Clichés MEB des colloïdes d'or dans le gap pour la SpA. (a) Vue globale d'un couple d'électrodes ($6\mu\text{m}^2$). (b)&(c) Zoom sur les gaps extrêmes.

Cette densité diminue légèrement à l'intérieur du gap en raison des contraintes exercées par les parois en or des électrodes. A titre indicatif, un gap unique de surface égale à $0,3\ \mu\text{m}^2$ contient généralement une soixantaine de particules.

Dans le cas de la sonde 2, le nombre de NP_{Au} est dix fois plus faible ($20\ \text{part}/\mu\text{m}^2$) à l'extérieur du gap (Fig. 5.30) que pour la SpA. Très peu de billes d'or parviennent à l'intérieur du nanogap. Une moyenne de quinze particules par échantillon est observée.

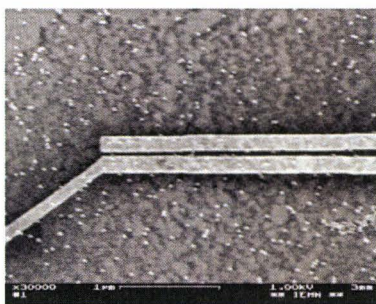


Figure 5. 30 : Observation MEB de la sonde 2 après dépôt de l' Ac^{III} -or.

2.3 – Mesures électriques

De manière similaire au nanogap $30\rightarrow 280\ \text{nm}$, une expérience contrôle sans sérum est réalisée (Fig. 5.31).

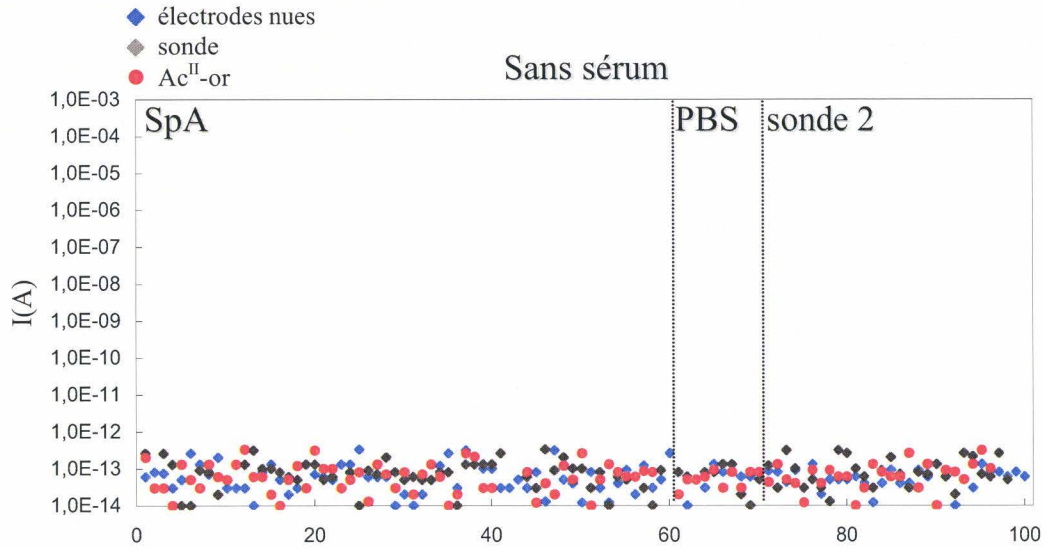


Figure 5.31 : Diagramme des intensités ($U=5V$) sans sérum.

Une fois encore, aucun saut de courant n'est *a priori* détecté. L'expérience principale avec sérum est donc initiée (Fig. 5.32). A l'instar du paragraphe 1, les étapes de dépôt de la SpA et d'incubation du sérum ne provoquent aucune variation du courant.

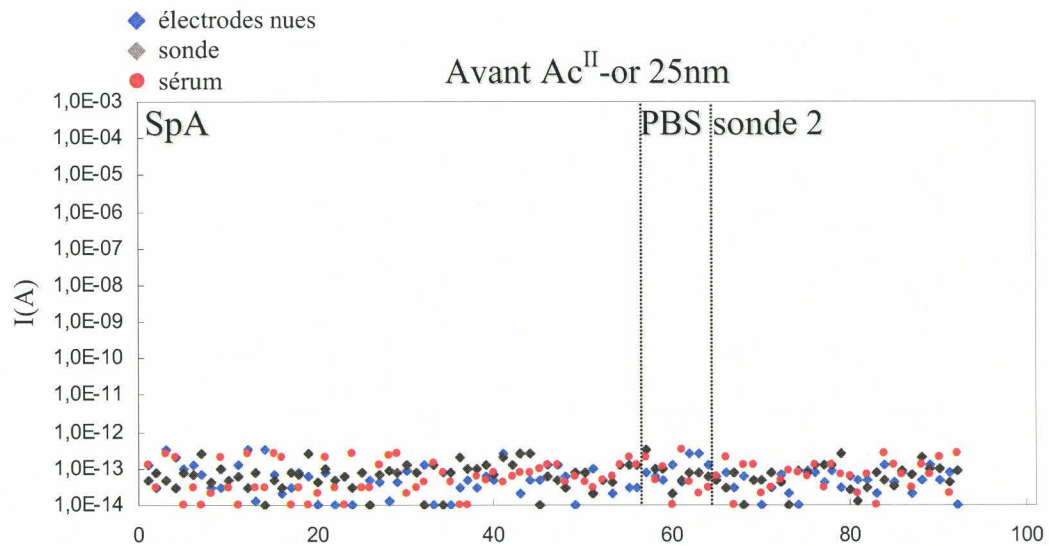


Figure 5.32 : Diagramme des intensités ($U=5V$) avec sérum avant dépôt de l' $Ac^{II}-or$.

Par contre, les données brutes obtenues après incubation de l' $Ac^{II}-or$ révèlent des hausses d'intensité quand la tension est maximum (Fig. 5.33).

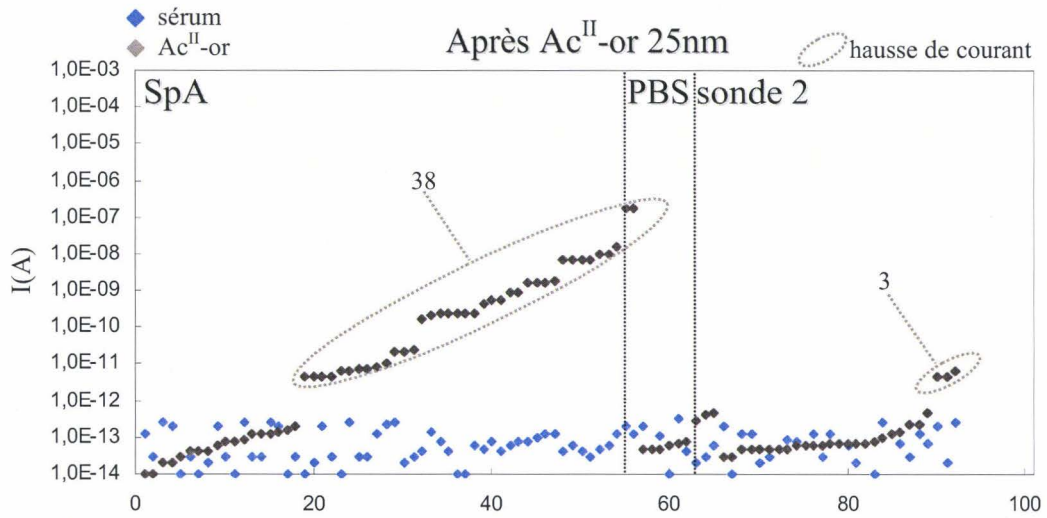


Figure 5. 33 : Diagramme des intensités (U=5V) avec sérum après dépôt de l'Ac^{II}-or.

Par contre, il n'est plus possible de traiter les courbes I(V) selon un modèle linéaire. En effet, les formes observées parmi les 41 mesures positives ne sont plus de la forme $I = U.a + b$ (courbe bleue, fig. 5.34) mais bien $I = U.a_1 + U^2.a_2 + U^3.a_3 + \dots + U^k.a_k + b$ (courbe grise). Il s'agit d'une régression multiple, dite polynomiale, d'ordre k pour laquelle il existe également un coefficient de détermination r^2 . En nous basant sur ce modèle, il est nécessaire de choisir un ordre adéquat. On considère généralement que l'ajout d'un ordre permet d'ajouter un pli à la courbe [Legendre, 1998]. La forme en S observée correspond dans notre cas à un ordre 3 suffisant pour distinguer le bruit de fond des variations de courant.

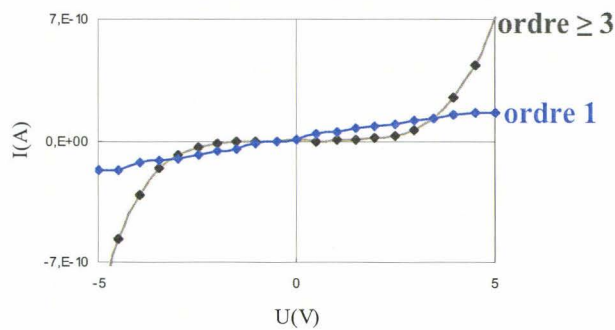


Figure 5. 34 : Profil I(V) caractéristique des hausses de courant.

Les coefficients de détermination sont donc calculés pour chaque couple d'électrodes (Fig. 5.35).

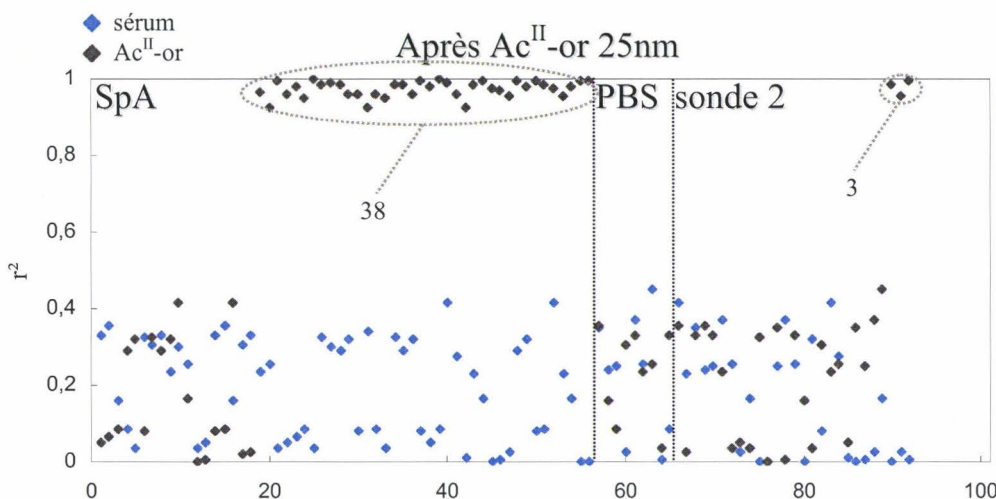


Figure 5. 35 : Calcul du r^2 pour chaque courbe $I(V)$ avec sérum après incubation de l'Ac^{II}-or.

Le modèle choisi permet de distinguer clairement les électrodes affichant une hausse de courant (38 pour la SpA, 3 pour la sonde 2) du bruit de fond. Le courant est multiplié respectivement par 7500 et 25 (Fig. 5.36).

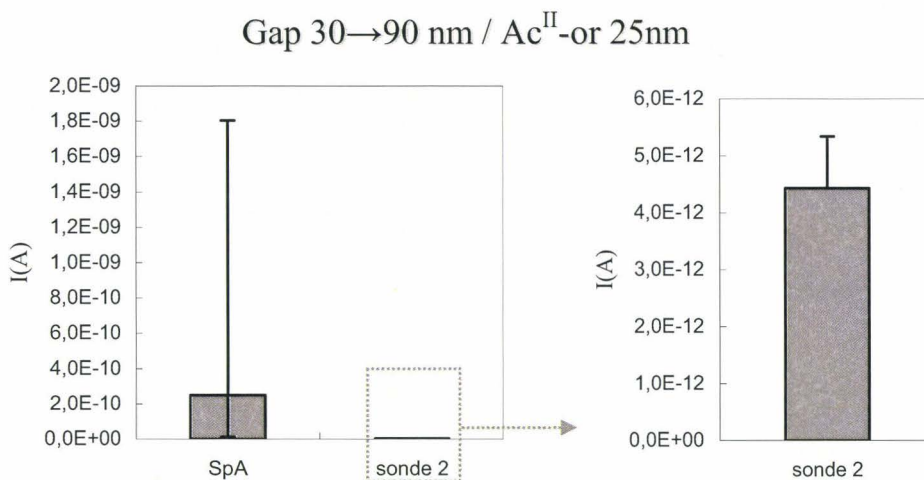


Figure 5. 36 : Médiane du courant pour chaque détection positive.

Le facteur qualité est donc 1700 fois plus important quand la protéine A est imprimée dans le gap (Tableau 5.5). En effet, la proportion des détections positives est de 68% (contre 12% pour la sonde 2).

| Sonde | Nb. total d'électrodes | Nb. hausse de courant | % | Gain à 5V | Nb. court -circuit | % | Facteur qualité |
|---------|------------------------|-----------------------|----|-----------|--------------------|----|-----------------|
| SpA | 60 | 38/56 | 68 | 7518 | 4/60 | 7 | 5112 |
| Sonde 2 | 30 | 3/25 | 12 | 24 | 5/30 | 17 | 3 |
| PBS | 10 | 0/9 | 0 | 0 | 1/10 | 10 | 0 |

Tableau 5. 5 : Bilan des mesures électriques.

2.4 – Analyse du profil des courbes I(V)

La moitié des électrodes spottées par la SpA présentant une hausse de courant affichent un effet capacitif identique à celui observé avec la géométrie A. Ce phénomène semble plus intense dans la mesure où un *delay time* de dix secondes est cette fois nécessaire (contre deux secondes auparavant) entre chaque pas de tension pour observer un courant cohérent.

Les profils I(V) correspondants changent également. La forme linéaire caractéristique d'un régime ohmique a disparu au profit d'une zone quasiment "déconnectée" (intensité proche de 0) dans les faibles tensions (Fig. 5.37). Un tel comportement, fréquemment décrit dans la littérature, est caractéristique d'un blocage coulombien [Lindsay, 2005; Thai Do, 2003]. Il s'agit d'un processus causé par les NPAu dans lequel le courant est bloqué jusqu'à ce que les électrons possèdent l'énergie suffisante pour charger les particules.

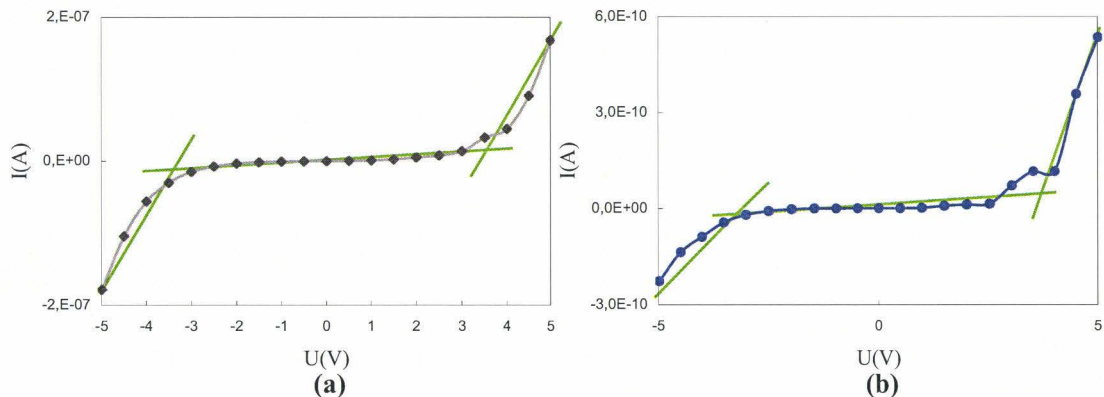


Figure 5.37 : Profils I(V) observés caractéristiques d'une jonction électrode-NpAu-électrode.

D'après nos mesures, 11 électrodes sur 38 présentent une forme symétrique (courbe a, fig. 5.37). Les autres profils sont dissymétriques (b). Ces formes particulières sont à relier avec la disposition des billes dans le gap. Si elles forment une jonction symétrique avec les électrodes, un transfert électronique est réalisé de manière équilibrée. Inversement, plusieurs particules accolées dans le gap tendent plutôt à former une jonction asymétrique.

A une échelle de travail inférieure à 50 nm, le concept de résistivité ne s'applique plus. La résistance d'un assemblage moléculaire conducteur connectant deux électrodes est déterminé par des effets quantiques. De fait, les théoriciens ont contribué à définir de nombreuses prédictions sur l'influence du couplage électronique entre une molécule et des électrodes métalliques [Di Ventra, 2002; Yaliraki, 1998]. Le phénomène de *tunneling* (ou effet tunnel) électronique à travers un pont moléculaire, déjà impliqué dans une large

variété de systèmes tels les centres de réaction photosynthétique et les protéines [Fleming, 1988; Gray, 1996], est généralement évoqué et semble adéquat afin d'expliquer nos résultats.

On considère deux électrodes conductrices séparées par une barrière isolante (le vide, un oxyde...). Si cette barrière est d'épaisseur nanométrique, les électrons ont une probabilité non nulle de passer d'une électrode à l'autre. L'effet tunnel attribue aux particules, et aux électrons en particulier, la probabilité de traverser une barrière de potentiel, même si cette particule ne possède pas une énergie supérieure à cette barrière (Fig. 5.38). Cette barrière est caractérisée par le coefficient de transmission T , fonction de la hauteur V_0 et largeur a de la barrière.

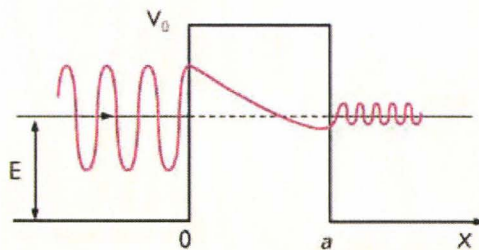


Figure 5. 38 : Principe de l'effet tunnel.

Dans notre cas précis, une île, c'est-à-dire une zone conductrice isolée du reste du dispositif par une barrière énergétique, est définie comme deux jonctions tunnel en série. Le courant électrique initié sur l'électrode source provient du déplacement d'électrons libres. Quand une jonction tunnel interrompt le conducteur, les électrons s'accumulent contre la barrière jusqu'à ce que le transfert d'un électron soit énergétiquement favorisé. Une structure électrode-nanoparticule-électrode est donc analogue à deux condensateurs placés en série.

La littérature fait précisément mention d'un tel phénomène à partir de réseaux nanocristallins en or [Parthasarathy, 2001]. Le courant ne traverse pas la jonction tant qu'une tension seuil V_S n'est pas atteinte (Fig. 5.40). La tension de seuil est fonction de la charge électronique e ($1,6 \cdot 10^{-19}$ C/V), du nombre de particules métalliques immobilisées N et de la capacité intrinsèque C_0 d'une bille d'or unique selon l'équation :

$$V_S = N \cdot \frac{e}{C_0} \quad (5-2)$$

Un transfert électronique par *tunneling* est envisageable seulement quand la tension appliquée V_a est supérieure à V_S (voir fig. 5.39). Le courant observé possède alors une caractéristique $I(V)$ purement ohmique.

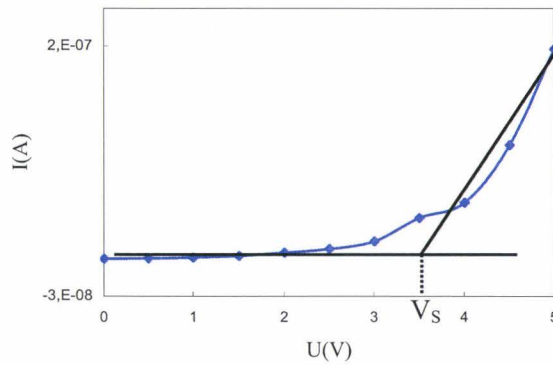


Figure 5. 39 : Courbe I(V) entre 0 et 5V.

La capacité C_0 d'une nanoparticule d'or est fonction de son diamètre d (25 nm) ainsi que des constantes diélectriques du vide ϵ_0 (8,86 pF/m) et du matériau séparant la NP des électrodes ϵ :

$$C_0 = 2\pi\epsilon\epsilon_0 d \quad (5-3)$$

ϵ est estimée à environ 10 pF/m [Olson, 1998]. A titre indicatif, la constante de l'eau et du dodécane-thiol sont respectivement de 80 et 2 pF/m. En suivant l'équation (5-3), nous trouvons $C_0 \sim 13$ aF. Cette valeur, intégrée dans l'équation (5-2) avec $V_S \sim 3,5$ V, correspond à un nombre théorique de 300 particules d'or immobilisées dans le gap. Or, nos observations en microscopie ne révèlent qu'une soixantaine de NP qui ne participent pas obligatoirement au transfert électronique. Les ordres de grandeur sont voisins et, compte tenu des approximations effectuées, tout à fait cohérents. Mais il est envisageable que le *tunneling* ne soit pas le seul mécanisme de conduction impliqué.

2.4 – Impact des particules d'or α -oxo aldéhyde sur le courant

Les nanoparticules d'or α -oxo aldéhyde, synthétisées et caractérisées dans le chapitre III, sont spottées sur les nanoélectrodes portant la fonction semicarbazide. Les images MEB correspondantes (voir figure 3.17 chapitre III) montrent clairement l'insertion d'un grand nombre de NPAu dans le gap. Des mesures intensité-tension sont réalisées dans une gamme de ± 5 V (Fig. 5.40). Dix augmentations de courant sont constatées.

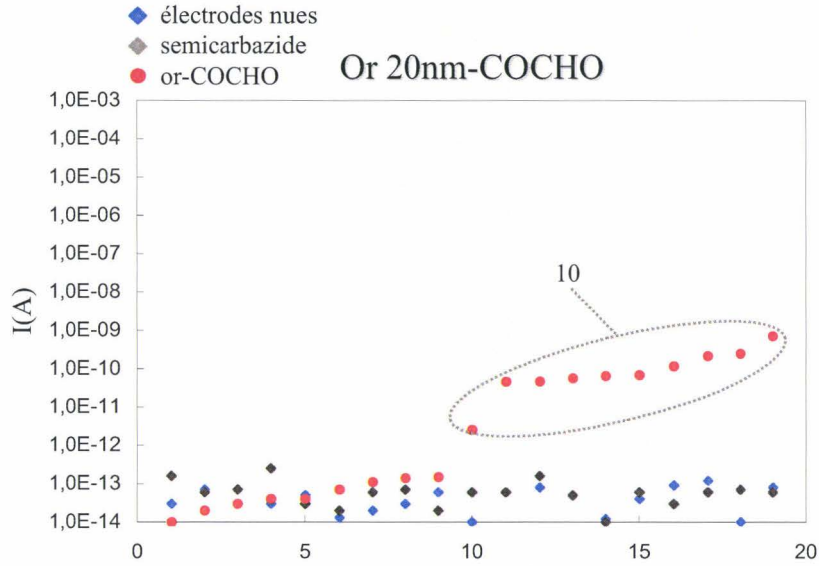


Figure 5. 40 : Diagramme des intensités (U=5V) après dépôt des particules COCHO.

La forme des courbes I(V) est similaire à celle observée dans le paragraphe précédent (Fig. 5.41).

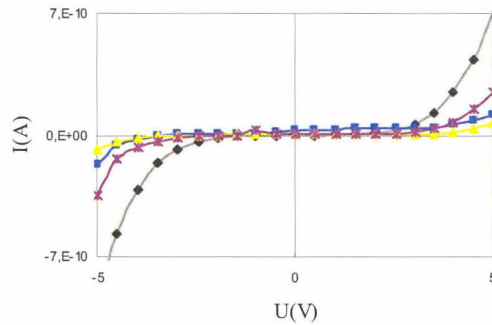


Figure 5. 41 : Courbes I(V) après dépôt de l'or α -oxo aldéhyde

Le calcul des coefficients de détermination se base donc une nouvelle fois sur un modèle polynomial d'ordre 3. Il ressort que les dix variations d'intensité précédentes se rapprochent du modèle (Fig. 5.42).

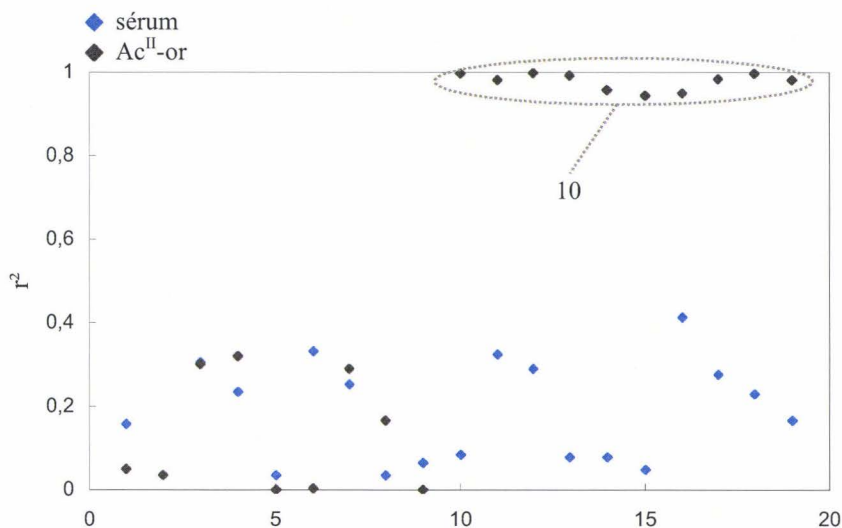


Figure 5. 42 : Calcul du r² après dépôt des NP COCHO selon une régression polynomiale.

Le facteur qualité est donné à titre indicatif (Tableau 5.6) car il n'est pas comparable avec les mesures impliquant des biomolécules. Il est cependant intéressant de remarquer que les courbes I(V) adoptent un profil quasi-identique aussi bien dans le cas d'un dépôt direct de particules d'or 20 nm qu'après l'immobilisation contrôlée d'un complexe [SpA-IgG-Ac^{II} or 25 nm].

| Dépôt | Nb. total d'électrodes | Nb. hausse de courant | % | Gain à 5V | Nb. court -circuit | % | Facteur qualité |
|----------|------------------------|-----------------------|----|-----------|--------------------|---|-----------------|
| Or-COCHO | 20 | 10/19 | 52 | 2349 | 1/20 | 5 | 1221 |

Tableau 5. 6 : Bilan des mesures électriques.

Cette expérience confirme l'hypothèse selon laquelle le transfert électronique entre les nanoélectrodes est assuré en grande partie par les particules métalliques.

2.5 – Influence de l'humidité sur la détection

Durant les expériences précédentes, les échantillons portant les électrodes sont séchés puis placés dans une chambre purgée à l'azote dont la teneur en eau est inférieure à 0,2 ppm. Cependant, une couche résiduelle d'eau demeure sur la surface. Elle peut être soit physisorbée sur la surface selon une couche de moins d'un nanomètre, soit piégée dans la structure tridimensionnelle des protéines. Une conduction de type ionique à travers cette pellicule d'eau est donc envisagée. Celle-ci permettrait le transport de charges électriques entre les deux électrodes et serait partiellement impliquée dans les hausses de conductivité constatées précédemment.

2.5.a - Approche théorique

Nos échantillons subissent, entre les incubations successives du sérum et de l'anticorps secondaire, divers lavages destinés à éliminer les sels tels que le PBS (tampon phosphate et KCl/NaCl), le détergent Tween 20 et les biomolécules en excès. Si les observations en microscopie électronique de nos surfaces n'ont révélé aucune impureté visible, il reste possible que des sels (et donc des ions) résiduels soient présent à l'état dissous dans la couche d'eau surfacique. Dès lors, le système peut se comporter comme une cuve à électrolyse classique comportant une anode et une cathode plongées dans un bain d'eau contenant divers sels : le mouvement des ions (les anions vers l'anode, les cations vers la cathode) pour une tension donnée génère une intensité mesurable.

Ainsi, la conductivité ionique des ions présents est de la forme :

$$\sigma = \lambda_{H_3O^+} \cdot [H_3O^+] + \lambda_{OH^-} \cdot [OH^-] + \lambda_{Na^+} \cdot [Na^+] + \lambda_{K^+} \cdot [K^+] + \lambda_{Cl^-} \cdot [Cl^-] + \lambda_{HPO_4^{2-}} \cdot [HPO_4^{2-}] + \lambda_{H_2PO_4^-} \cdot [H_2PO_4^-] \quad (5-4)$$

λ étant la conductivité ionique molaire et $[X]$ la concentration de chaque espèce ionique présente. Le PBS, fourni par la société Sigma, est en effet composé de NaCl (0,138M), de KCl (0,0027M) et un mélange d'ions phosphates Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (0,01M). Les valeurs des conductivités ioniques molaires sont données dans le tableau 5.7 [Lide, 1993-1994].

| Espèce | λ (S.m ² /mol) à 25°C |
|---|--|
| H ₃ O ⁺ | 3,4965.10 ⁻² |
| OH ⁻ | 1,98.10 ⁻² |
| Na ⁺ | 5,008.10 ⁻³ |
| K ⁺ | 7,35.10 ⁻³ |
| Cl ⁻ | 7,631.10 ⁻³ |
| HPO ₄ ²⁻ | 6,6.10 ⁻³ |
| H ₂ PO ₄ ⁻ | 3,3.10 ⁻³ |

Tableau 5. 7 : Conductivité ionique molaire des espèces utilisées pendant les traitements.

Le pH étant proche de la neutralité (7,4 à 25°C), la conductivité ionique du mélange approche, selon nos calculs, 1,98.10⁻³ S.m². Une telle valeur n'est pas significative dans la mesure où chaque espèce n'est pas strictement équivalente dans l'hypothèse d'un transport ionique du courant. Pratiquement, la concentration des ions H₃O⁺ et OH⁻ est proche de 10⁻⁷ M et reste négligeable. Les porteurs de charges sont plus vraisemblablement issus du tampon PBS qui est utilisé durant les lavages (même si les lavages consécutifs à l'eau mQ et au méthanol devraient en éliminer les traces) et présent dans les protéines commerciales en tant que stabilisant.

2.5.b - Approche expérimentale

L'étude suivante est réalisée sur un couple d'électrodes de gap 30→90 nm après le traitement complet mettant en jeu le complexe [SpA-IgG-Ac^{II}-or]. Celle-ci ne présente aucune hausse de courant après les mesures électriques.

La norme ASTM^a E104-02 décrit une méthode simple afin de générer dans une chambre étanche une humidité relative constante à température ambiante [ASTM]. Cette méthode met en jeu une gamme de solutions salines aqueuses saturées susceptible de fixer, après un délai de stabilisation, l'humidité relative de 2 à 98,5%. Il se produit alors un équilibre entre l'atmosphère ambiante et la solution saturée qui règle l'humidité relative avec une précision constatée de ±0,5%, pourvu que la température de l'enceinte ne varie pas de ±0,5°C.

Classiquement, l'humidité relative ambiante approche les 25-30%. Parmi la gamme de sels proposés, notre choix s'est porté sur le chlorure de potassium KCl qui, une fois mis en solution saturée dans l'eau à 25°C, permet d'atteindre une humidité relative de 85,1%. L'expérience proposée consiste donc à introduire le couple d'électrodes mentionné ci-dessus dans une chambre étanche de petite taille (afin de minimiser le temps d'évolution de l'humidité jusqu'au seuil maximal) comportant les pointes de mesures électriques fixées sur les plots de contact ainsi que la solution saline. Ce dispositif nous permettra donc de mesurer l'évolution éventuelle du courant en fonction de l'humidité relative.

2.5.c – Mode opératoire

Nous utilisons une chambre fermée (volume global proche de 1 dm³) munie d'un cryostat, d'une pompe à membrane et reliée au système de mesure électrique précédemment utilisé. Le KCl est dissout jusqu'à un point proche de la saturation dans un bêcher de trois centimètres de diamètre. Enfin, l'enceinte est maintenue à une température de 25°C. Un capteur d'humidité n'a pu être introduit en même temps que l'échantillon en raison du manque de place. L'expérience sera donc achevée après stabilisation de l'intensité mesurée (dans l'hypothèse où elle varie effectivement). Les mesures, réalisées selon un pas de 100 mV entre -0,1 et +0,1 volts à intervalles de temps réguliers, se stabilisent à +6 heures (Fig. 5.43).

^a American Society for Testing and Materials

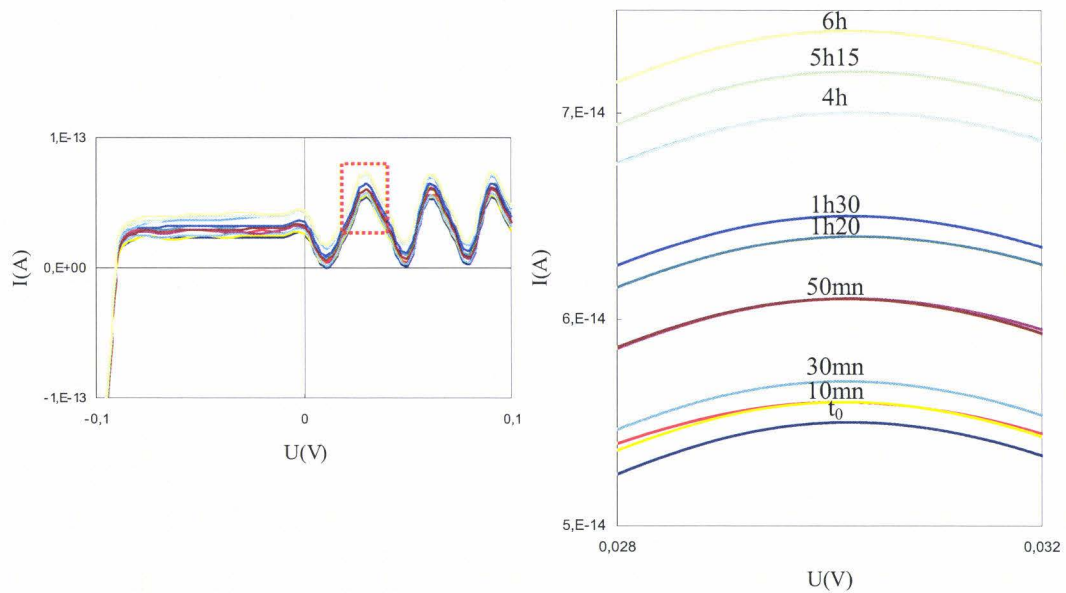


Figure 5. 43 : Courbes I(V) en fonction du temps entre $\pm 0,1V$ avec zoom entre $0,028$ et $0,032V$.

L'intensité, si elle reste confinée à un simple bruit de fond de l'ordre de 10^{-14} ampères, augmente avec l'humidité relative du milieu de 2.10^{-14} ampères, tout en conservant une forme quasiment identique.

2.5.d - Conclusions

Après six heures, nous supposons que l'humidité relative de la chambre a atteint environ 85%. Il apparaît que la proportion d'eau joue un rôle minime dans la conduction du courant entre deux nanoélectrodes, rôle *a priori* insuffisant pour permettre l'observation d'une hausse de courant issue des biomolécules immobilisées. Par conséquent, une conduction strictement ionique ne permet pas de décrire les profils I(V) constatés dans nos expériences précédentes.

3 – Bilan

Nous avons mis au point un dispositif visant à détecter électriquement une interaction biomoléculaire modèle. Une méthode appropriée, combinant une analyse quantitative des intensités à une étude qualitative des profils I(V) selon un modèle de régression statistique, permet de discerner les augmentations de conductivité de simples bruit de fond. De plus, les expériences contrôles réalisées sans sérum prouvent que la détection porte effectivement sur le complexe SpA-IgG. Le gain en courant est, dans ce dernier cas, nul.

La conduction à travers un nanogap variable 30-280 nm suit un régime ohmique. Cependant, il semble qu'un transfert par effet tunnel s'exerce quand le gap est restreint (30-90 nm), provoquant l'apparition d'un blocage coulombien. Dans les deux cas, la présence d'un effet de charge après le dépôt des anticorps secondaires marqués à l'or, ainsi que l'étude parallèle d'anticorps marqués à la rhodamine, démontre que les nanoparticules amplifient considérablement la conductivité du système. Cependant, au regard des gains observés, il est clair qu'un dispositif susceptible de confiner au plus près un faible nombre de NPAu est plus efficace (facteur qualité 5112, tableau 5.8) qu'un large gap (facteur qualité 18).

| Conditions | Sonde | Hausses de courant | Gain de courant | Facteur qualité |
|---|---------|--------------------|-----------------|-----------------|
| Gap 30→280nm Ac ^{II} -or 25nm / ±0,1V | SpA | 36% | 51 | 18 |
| | Sonde 2 | 15% | 15 | 2 |
| Gap 30→280nm Ac ^{II} -rhod / ±0,1V | SpA | 15% | 67 | 10 |
| | Sonde 2 | 4% | 24 | 1 |
| Gap 30→90nm Ac ^{II} -or 25nm / ±5V | SpA | 68% | 7518 | 5112 |
| | Sonde 2 | 12% | 24 | 3 |

Tableau 5. 8 : Bilan de la détection selon les paramètres utilisés.

Les résultats obtenus avec des d'anticorps de chèvre (sonde 2) alternatifs présentant moins d'affinité pour les IgG humaines que la SpA, démontrent une certaine sensibilité de la méthode. La fréquence et l'intensité des détections positives sont moindres (facteurs de 2 et 3 pour chaque gap).

L'importance des particules métalliques est confirmée après le dépôt direct de particules fonctionnelles entre des électrodes 30-90 nm semicarbazide. Les profils intensité-tension sont similaires à ceux observés après dépôt des biomolécules. De plus, les calculs visant à connaître le nombre théorique de particules métalliques immobilisées en fonction de la tension de seuil sont voisins de la réalité. Dès lors, deux conclusions peuvent être tirées : i) les approximations utilisées dans les calculs sont trop grandes pour obtenir des résultats fiables, ii) le transfert électronique par *tunneling* n'est pas le seul mécanisme mis en jeu afin d'observer des variations de conductivité. En effet, les équations tirées de la littérature concernent des réseaux nanocristallins ordonnés. Or, nous présentons un cas intermédiaire dans lequel les particules sont dispersées entre les nanoélectrodes.

En effet, l'étude de l'humidité sur les mesures montre une faible influence de l'eau résiduelle sur l'intensité mesurée. Néanmoins, cette influence existe. De plus, les protéines sont connues pour piéger des molécules d'eau ainsi que les sels utilisés durant les lavages, comme le PBS. Une conduction de type ionique, dans laquelle des charges mobiles se déplacent le long d'une fine couche d'eau microscopique, n'est pas non plus à exclure.

Conclusion générale

Nous avons démontré dans ce mémoire que la détection électrique d'une interaction biomoléculaire dans un milieu biologique complexe était réalisable. Pour cela, nous avons conçu un biocapteur comportant des nanoélectrodes (typiquement séparées de cent nanomètres) en or sur silicium afin de détecter une interaction biomoléculaire *via* une variation de signal électrique. Notre choix s'est porté sur la forte affinité de la protéine A (SpA), immobilisée entre les nanostructures, vers les immunoglobulines (Ig) issues du sérum humain.

Cette approche nous a mené, dans un premier temps, à mettre en place un traitement chimique précis afin de fixer de manière contrôlée la protéine A dans un nanogap (**chapitre III**). La physisorption de la protéine sur une surface silanisée amine a été retenue. Nous nous sommes appuyés sur la synthèse de la fonction semicarbazide, dont la silanisation amine constitue la première étape, afin de valider la réactivité des nanogaps. A l'aide de plusieurs techniques, telles que la goniométrie, la microscopie à force chimique et après la synthèse de nanoparticules (NP) d'or fonctionnelles de diamètre inférieur au nanogap, nous avons démontré que la silanisation amine du nanogap était effective.

Une fois la chimie de surface confirmée, une première approche visant à détecter sélectivement l'interaction protéine A-IgG entre des microélectrodes a été testée (**chapitre IV**). Après validation du protocole de dépôt par fluorescence à l'aide d'un anticorps secondaire rhodaminé puis un ajustement des temps de traitement afin de former le précipité, la méthode s'est avérée concluante. Un microgap de 10 μm a permis de détecter un court-circuit sur 83% des électrodes engagées à partir d'une concentration en SpA de $2,4 \cdot 10^{-2}$ mM. La méthode reste valable jusqu'à une concentration proche de $2,4 \cdot 10^{-8}$ mM.

La seconde et principale approche consiste à s'affranchir de la précipitation pour ne s'intéresser qu'aux propriétés électriques intrinsèques des biomolécules (**chapitre V**). Les nanoélectrodes décrites dans le chapitre III sont réutilisées selon deux géométries différentes : une géométrie "large" dont le gap varie de 30 à 280 nanomètres (A) puis une géométrie restreinte 30-90 nanomètres (B).

Les mesures électriques, après chaque étape de dépôt (SpA, IgG sériques, Ac^{II}-or), ainsi que des expériences de contrôle sans sérum ou avec un anticorps secondaire rhodaminé, ont révélé des hausses de la conductivité seulement après le dépôt des anticorps secondaires. Les gaps A et B affichent, quand l'anticorps est marqué à l'or, des mesures perturbées par un effet de charge clairement associé aux particules métalliques. L'influence des colloïdes (environ 60 par gap) est particulièrement forte avec la forme B dans laquelle

une distance de un à deux nanomètres sépare les particules des électrodes. Un phénomène de blocage coulombien, issu du transfert des électrons par *tunneling* dans l'or, est apparu dans les profils intensité-tension correspondants. Cet effet tunnel est accompagné d'un gain de courant bien plus important (5112 contre 51) que dans la configuration A. Cette hypothèse est confirmée par l'observation de courbes I(V) similaires suite au dépôt direct des particules d'or α -oxo aldéhyde dans un gap B semicarbazide.

La nature exacte du mécanisme de transfert électronique reste encore à déterminer. Les variations de conductivité après dépôt d'Ac^{II} marqués à la rhodamine sont également importantes. Il a été démontré que des alcènes et des cycles aromatiques permettaient le transfert des électrons entre des électrodes le long des systèmes délocalisés π [Adams, 2003]. Peut-être ce mécanisme est-il impliqué ici. Des expériences complémentaires impliquant les Ac^{II} non marqués sont en cours dans notre laboratoire. De plus, nous avons démontré la faible influence de l'humidité sur la détection. L'impact des sels résiduels issus de nos différents lavages et de la couche d'eau microscopique présente sur la surface et dans les biomolécules doit être étudié afin d'optimiser la méthode.

Plusieurs améliorations notables permettraient de simplifier le modèle d'étude biologique avant de le compliquer progressivement à des fins diagnostiques. Le système global doit être réduit au maximum afin d'étudier les propriétés d'assemblages uniques. Il est clair que la différence de sensibilité entre les deux géométries est causée par le rétrécissement des structures. Ceci signifie un ajustement de la longueur des électrodes et du gap afin d'immobiliser un nombre infime (<10) de NP d'or. Est-il préférable d'insérer une bille d'or dans un gap de 30 nm ou bien 100 billes d'or dans un gap de 100 nm ?

La technologie mise en oeuvre afin de fabriquer les nanogaps pourrait également être modifiée. Certaines études mettent en jeu des électrodes interdigitées [Ueno, 2005; Zhu, 2005] ou bien des nanogaps inférieurs à 20 nanomètres conçus par jonction à cassure microfabriquée [Scheer, 1997]. Une telle évolution conduirait également à augmenter la sensibilité de détection en confinant les complexes sur une surface infime.

Un dernier point concerne l'étude de la limite de détection du système. Il est en effet nécessaire, en sérodiagnostic, de définir la concentration minimale en sérum suffisante pour détecter des anticorps particuliers.

En résumé, le travail présenté ici démontre la faisabilité d'une détection secondaire simple selon une méthode transductionnelle novatrice avec l'introduction de biomolécules issues d'un milieu biologique complexe, à savoir le sérum humain. Nous avons observé une amplification de l'intensité selon un facteur 5000 accompagnée d'une "signature" (blocage

coulombien) facilement discernable. Si un tel ensemble est maîtrisé, l'intérêt de notre démarche sera transposable sur des séquences antigéniques présentant un intérêt diagnostique réel, telles les séquences p21 du virus de l'hépatite C ou Gp41 du HIV, déjà détectées par fluorescence sur lame de verre [Duburcq, 2004].

Bibliographie

- Adamczyk, Z., Zembala, M., Siwek, B. and Warszynski, P. (1990) Structure and ordering in localized adsorption of particles *Journal of Colloid and Interface Science* **140**, 123-137
- Adams, D.M., Brus, L., Chidsey, C.E.D., Creager, S. and Creutz, C. (2003) Charge transfer on the nanoscale : current status. *Journal of Physical Chemistry B*, **107**, 6668-6697.
- Akiyama, T., Staufer, A. and deRoos, N.F. (2003) Self-sensing and self-actuating probe based on quartz tuning fork combined with microfabricated cantilever for dynamic mode atomic force microscopy *Applied Surface Science*, **210**, 18-21.
- Albrecht, R., Akamine, S., Carver, T.E. and Quate, C.F. (1990) Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, **8**, 3386-3396.
- Alexandre, I., Hamels, S., Dufour, S., Collet, J., Zammattéo, N., De Longueville, F., Gala, J.L. and Remacle, J. (2001) Colorimetric silver detection of DNA microarrays. *Anal Biochem*, **295**, 1-8.
- ASTM. Standard practice for maintaining constant relative humidity by means of aqueous solutions. *réf E104-02 2002*.
- Aviram, A. and Ratner, M.A. (1974) Molecular rectifiers. *Chemical Physics Letters*, **29**, 277-283.
- Avouris, P., Hertel, T., Martel, R., Schmidt, T., Shea, H.R. and Walkup, R.E. (1999) Carbon nanotubes: nanomechanics, manipulation, and electronic devices *Applied Surface Science* **141**, 201-209.
- Bain, C.D. and Whitesides, G.M. (1988) Depth sensitivity of wetting : monolayers of ω -mercapto ethers on gold. *Journal of the American Chemical Society*, **110**, 5897-5898.
- Baro, A.M., Miranda, R., Alaman, J., Garcia, N., Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. and Carrascosa, J.L. (1985) Determination of surface topography of biological specimens at high resolution by scanning tunnelling microscopy. *Nature*, **315**, 253-254.
- Barrett, R.C. and Quate, C.F. (1991) Charge storage in a nitride-oxide-silicon medium by scanning capacitance microscopy. *Journal of Applied Physics*, **70**, 2725-2733.
- Bartz, M., Küther, J., Nelles, G., Weber, N., Seshadri, R. and Tremel, W. (1999) Monothiols derived from glycols as agents for the stabilization of gold colloids in water: Preparation, self-assembly and use as crystallization templates. *Journal of Materials Chemistry*, **9**, 1121-1125.
- Bayot, D., Degand, M. and Devillers, M. (2005) Synthesis and characterization of homo- and heterobimetallic niobium^V and tantalum^V peroxo-polyaminocarboxylato complexes and their use as single or multiple molecular precursors for Nb-Ta mixed oxides. *Journal of Solid State Chemistry*, **178**, 2635-2642.
- Benoit, M., Gabriel, D., Gerisch, G. and Gaub, H.E. (2000) Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nature Cell Biology*, **2**.
- Bent, S.F. (2002) Organic functionalization of group IV semiconductor surfaces : principles, examples, applications, and prospects. *Surface Science*, **500**, 879-903.
- Berge, T., Jenkins, N.S., Hopkirk, R.B., Waring, M.J., Edwardson, J.M. and Henderson, R.M. (2002) Structural perturbations in DNA caused by bis-intercalation of ditercalinium visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res*, **30**, 2980-2986.
- Bessot, J.J. (1976) Les nouvelles techniques de dépôts sous vide – Evolution et tendance. *Surfaces*, **3**, 124-128.
- Bezryadin, A., Dekker, C. and Schmid, G. (1997) Electrostatic trapping of single conducting nanoparticles between nanoelectrodes. *Applied Physics Letters*, **71**, 1273-1275.
- Binnig, G., Gerber, C., Stoll, E., Albrecht, R. and Quate, C.F. (1987) Atomic resolution with atomic force microscope *Surface Science Letters*, **189-190**, A390.
- Birrell, G.B., Hedberg, K.K. and Griffith, O.H. (1987) Pitfalls of immunogold labeling: analysis by light microscopy, transmission electron microscopy, and photoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem*, **35**, 843-853.
- Blackwell, V.C., Hamilton, A.J. and Hay, R. (2000) Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot of the antibody responses of patients infected with *Mycobacterium marinum*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **27**, 185-190.
- Blodgett, K.A. (1937) Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties. *Physical Review*, **51**, 964-982.
- Bonn, D. and Kegel, W.K. (2003) Stokes–Einstein relations and the fluctuation-dissipation theorem in a supercooled colloidal fluid. *Journal of Chemical Physics*, **118**, 2005-2009.
- Bottomley, S.P., Sutton, B.J. and Gore, M.G. (1995) Elution of human IgG from affinity columns containing immobilised variants of protein A. *J Immunol Methods*, **182**, 185-192.
- Boulas, C., Davidovits, J.V., Rondelez, F. and Vuillaume, D. (1996) Suppression of charge carrier tunneling through organic self-assembled monolayers. *Physical Review Letters*, **76**, 4797-4800.
- Brands, M., Carl, A. and Dumpich, G. (2005) Preparation of large area sub-50 nm polymer nanoring arrays. *Superlattices and Microstructures*, **37**, 388-393.
- Briggs, J. and Zuk, R. (1989) Fast biosensor-based system for measuring total DNA in protein solutions. *Dev Biol Stand*, **70**, 245-253.
- Brown, L.O. and Hutchison, J.E. (1999) Controlled growth of gold nanoparticles during ligand exchange. *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 882-883.
- Brown, L.O. and Hutchison, J.E. (2001) Formation and electron diffraction studies of ordered 2-D and 3-D superlattices of amine-stabilized gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, **105**, 8911-8916.
- Brugnara, M., Della Volpe, C., Penati, A., Siboni, S., Poli, T. and Toniolo, L. (2003) Correct use of the contact angle in the evaluation of the protective action induced from polymer coating on the stone. *Ann Chim*, **93**, 881-888.
- Brzoska, J.B., BenAzouz, I. and Rondelez, F. (1994) Silanization of Solid Substrates: A Step Toward Reproducibility *Langmuir*, **10**, 4367-4373.

- Bumm, L.A., Arnold, J.J., Cygan, M.T., Duunbar, T.D., Burgin, T.P., Jones, L., Allara, D.L., Tour, J.M. and Weiss, P.S. (1996) Are Single Molecular Wires Conducting? *Science*, **271**, 1705-1707.
- Butt, H.J. (1991) Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope. *Biophysics Journal*, **60**, 1438-1444.
- Cahill, D.J. (2001) Protein and antibody arrays and their medical applications. *J Immunol Methods*, **250**, 81-91.
- Casey, K.G. and Quitevis, E.L. (1988) Effect of Solvent Polarity on the Nonradiative Processes in Xanthene Dyes: Rhodamine B in Normal Alcohols. *Journal of Physical Chemistry*, **92**, 6590-6594.
- Cheng, Y.T., Pun, C.C., Tsai, C.Y. and Chen, P.H. (2005) An array-based CMOS biochip for electrical detection of DNA with multilayer self-assembly gold nanoparticles *Sensors and Actuators B: Chemical Article in Press*.
- Chiang, C.K., Druy, M.A., Gau, S.C., Heeger, A.J., Louis, E.J., MacDiarmid, A.G., Park, Y.W. and Shirakawa, H. (1978) Synthesis of highly conducting films of derivatives of polyacetylene, (CH)_x. *Journal of the American Chemical Society*, **100**, 1013-1015.
- Chiu, G.L.T. and Shaw, J.M. (1997) Optical lithography: Introduction. *Journal of Research and Development*, **41**, 3-6.
- Choi, C.H., Liu, D.J., Evans, J.W. and Gordon, M.S. (2002) Passive and Active Oxidation of Si(100) by Atomic Oxygen: A Theoretical Study of Possible Reaction Mechanisms *Journal of the American Chemical Society*, **124**, 8730-8740.
- Chon, H., Bluysen, H.A.R., Holstege, F.C.P., Koomans, H.A., Joles, J.A. and Braam, B. (2005) Gene expression of energy and protein metabolism in hearts of hypertensive nitric oxide- or GSH-depleted mice. *European Journal of Pharmacology*, **513**, 21-33.
- Chou, S.Y. and Krauss, P.R. (1997) Imprint lithography with sub-10 nm feature size and high throughput. *Microelectronic Engineering*, **35**, 237-240.
- Chumanov, G., Sokolov, K., Gregory, B.W. and Cotton, T.M. (1995) Colloidal metalfilms as a substrate for surface-enhanced spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry*, **99**, 9466-9471.
- Coen, M.C., Lehmann, R., Groning, P., Biemann, M., Galli, C. and Schlappbach, L. (2001) Adsorption and Bioactivity of Protein A on Silicon Surfaces Studied by AFM and XPS. *J Colloid Interface Sci*, **233**, 180-189.
- Collier, T.O., Jenney, C.R., DeFife, K.M. and Anderson, J.M. (1997) Protein adsorption on chemically modified surfaces. *Biomed Sci Instrum*, **33**, 178-183.
- Cox, J.D., Curry, M.S., Skirboll, S.K., Gourley, P.L. and Sasaki, D.Y. (2002) Surface passivation of a microfluidic device to glial cell adhesion : a comparison of hydrophobic and hydrophilic SAM coatings. *Biomaterials*, **23**, 929-935.
- Davies, D.R. and Metzger, H. (1983) Structural basis of antibody function. *Annu Rev Immunol*, **1**, 87-117.
- Deal, B.E. and Grove, A.S. (1965) General Relationship for the Thermal Oxidation of Silicon. *Journal of Applied Physics* **36**, 3770-3778.
- Derjaguin, B.V. and Landau, L. (1941) Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochimica URSS*, **14**, 633-662.
- Di Ventra, M., Lang, N.D. and Pantelides, S.T. (2002) Electronic transport in single molecules *Chemical Physics*, **281**, 189-198.
- Di Ventra, M., Pantelides, S.T. and Lang, N.D. (2000) First-principles calculation of transport properties of a molecular device. *Phys Rev Lett*, **84**, 979-982.
- Doris, B., Jeong, M., Kanarsky, T., Ying, Z., Roy, R.A., Dokumaci, O., Zhibin, R., Fen-Fen, J., Leathen, S., Natzle, W., Hsiang-Jen, H., Mezzapelle, J., Mocuta, A., Womack, S., Gribelyuk, M., Jones, E.C., Miller, R., Wong, H.S.P. and Haensch, W. (2002) Extreme Scaling with Ultra- Thin Si channel MOSFETs. *International Electron Devices Meeting*, 267-270.
- Downs, M.E., Warner, P.J., Turner, A.P. and Fothergill, J.C. (1988) Optical and electrochemical detection of DNA. *Biomaterials*, **9**, 66-70.
- Drake, B., Prater, C.B., Weisenhorn, A.L., Gould, S.A., Albrecht, T.R., Quate, C.F., Cannell, D.S., Hansma, H.G. and Hansma, P.K. (1989) Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. *Science*, **243**, 1586-1589.
- Dubertret, B., Calame, M. and Libchaber, A.J. (2001) Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nat Biotechnol*, **19**, 365-370.
- Duburcq, X., Olivier, C., Desmet, R., Halasa, M., Carion, O., Grandidier, B., Heim, T., Stievenard, D., Auriault, C. and Melnyk, O. (2004a) Polypeptide semicarbazide glass slide microarrays: characterization and comparison with amine slides in serodetection studies. *Bioconjug Chem*, **15**, 317-325.
- Duburcq, X., Olivier, C., Malingue, F., Desmet, R., Bouzidi, A., Zhou, F., Auriault, C., Gras-Masse, H. and Melnyk, O. (2004b) Peptide-protein microarrays for the simultaneous detection of pathogen infections. *Bioconjug Chem*, **15**, 307-316.
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J.M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*, **21**, 10-14.
- Duke, C.B. (1996) Semiconductor surface reconstruction : The structural chemistry of two-dimensional surface compounds. *Chemical Review*, **96**, 1237-1260.
- Ekins, R. (1980) More sensitive immunoassays. *Nature*, **284**, 14-15.
- Ekins, R.P. and Chu, F.W. (1991) Multianalyte microspot immunoassay--microanalytical "compact disk" of the future. *Clin Chem*, **37**, 1955-1967.
- Eley, D.D. and Spivey, D.I. (1962) Semiconductivity of organic substances. Part 9.—Nucleic acid in the dry state. *Transactions of the Faraday Society*, **58**, 411-415.
- Elghanian, R., Storhoff, J.J., Mucic, R.C., Letsinger, R.L. and Mirkin, C.A. (1997) Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, **277**, 1078-1081.

- Emberly, E. and Kirczenow, G. (1998) Theoretical study of electrical conduction through a molecule connected to metallic nanocontacts. *Physical Review B*, **58**, 10911-10920.
- Emili, A.Q. and Cagney, G. (2000) Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays. *Nat Biotechnol*, **18**, 393-397.
- Engvall, E., Jonsson, K. and Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta*, **251**, 427-434.
- Faucheux, N., Schweiss, R., Lutzow, K., Werner, C. and Groth, T. (2004) Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials*, **25**, 2721-2730.
- Fleming, G.R., Martin, J.L. and Breton, J. (1988) Rate of primary electron transfer in photosynthetic reaction centers and their mechanistic implications. *Nature*, **333**, 190-192.
- Fodor, S.P., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T. and Solas, D. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, **251**, 767-773.
- Fraxedas, J., Molas, S., Figueras, A., Jiménez, I., Gago, R., Auban-Senzier, P. and Goffman, M. (2002) Thin films of molecular metals: TTF-TCNQ. *Journal of Solid State Chemistry*, **168**, 384-389.
- Freeman, R.G., Grabar, K.C., Allsion, K.J., Bright, R.M., Jackson, M.A., Smith, P.C., Walter, D.G. and Natan, M.J. (1995) Self-assembled metal colloid monolayers: An approach to SERS substrates. *Science*, **267**.
- Frisbie, C.D., Rozsnyai, L.F., Noy, A., Wrighton, M.S. and Lieber, C.M. (1994) Functional group imaging by chemical force microscopy. *Science*, **265**, 2071-2074.
- Fuhrer, M.S., Lim, A.K.L., Shih, L., Varadarajan, U., Zettl, A. and MacEuen. (2000) Transport through crossed nanotubes *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **6**, 868-871.
- Fujihira, M. and Ohzono, T. (1999) Bases of chemical force microscopy by friction: Energetics and dynamics of wearless friction between organic monolayers in terms of chemical and physical properties of molecules *Japanese Journal of Applied Physics*, **38**, 3918-3931.
- Glad, M., Norrlöw, O., Sllergren, B., Siegbahn, N. and Mosbach, K. (1985) Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica *Journal of Chromatography A*, **347**, 11-23.
- Göddenhenrich, T., Lemke, H., Hartmann, U. and Heiden, C. (1990) Force microscope with capacitive displacement detection *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, **8**, 383-387.
- Graille, M., Stura, E.A., Corper, A.L., Sutton, B.J., Taussig, M.J., Charbonnier, J.B. and Silverman, G.J. (2000) Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5399-5404.
- Gray, H.B. and Winkler, J.R. (1996) Electron transfer in proteins. *Annu Rev Biochem*, **65**, 537-561.
- Grill, L., Rieder, K.H., Moresco, F., Stojkovic, S., Gourdon, A. and Joachim, C. (2005) Controlling the electronic interaction between a molecular wire and its atomic scale contacting pad. *Nano Lett*, **5**, 859-863.
- Gu, J., Tanaka, S., Otsuka, Y., Tabata, H. and Kawai, T. (2002) Self-assembled dye-DNA network and its photoinduced electrical conductivity. *Applied Physics Letters* **80**, 688-690.
- Gulmann, C., Counihan, I., Grace, A., Patchett, S., Leen, E., Leader, M. and Kay, E. (2003) Cytokeratin 7/20 and mucin expression patterns in oesophageal, cardia and distal gastric adenocarcinomas. *Histopathology*, **43**, 453-461.
- Guo, W.F., Lin, R.X., Huang, J., Zhou, Z., Yang, J., Guo, G.Z. and Wang, S.Q. (2005) Identification of Differentially Expressed Genes Contributing to Radioresistance in Lung Cancer Cells using Microarray Analysis. *Radiat Res*, **164**, 27-35.
- Haguet, V., Martin, D., Marcon, L., Heim, T., Stievenard, D., Olivier, C., El-Mahdi, O. and Melnyk, O. (2004) Combined nanogap nanoparticles nanosensor for electrical detection of biomolecular interactions between polypeptides. *Applied Physics Letters* **84**, 1213-1215
- Halamek, J., Pribyl, J., Makower, A., Skladal, P. and Scheller, F.W. (2005) Sensitive detection of organophosphates in river water by means of a piezoelectric biosensor. *Anal Bioanal Chem*.
- Han, T., Williams, J.M. and Beebe, T.P. (1995) Chemical Bonds Studied with Functionalized Atomic Force Microscopy Tips. *Analytica Chimica Acta*, **307**, 365-376.
- Hatzakis, M., Canavello, B.J. and Shaw, J.M. (1980) Single-Step Optical Lift-Off Process. *Journal of Research and Development*, **24**, 452-460.
- Heath, J.R. and Ratner, M.A. (2003) Molecular electronics. *Physics Today*, **56**, 43-49.
- Hiyama, E., Hiyama, K., Nishiyama, M., Reynolds, C.P., Shay, J.W. and Yokoyama, T. (2003) Differential gene expression profiles between neuroblastomas with high telomerase activity and low telomerase activity. *Journal of Pediatric Surgery*, **38**, 1730-1734.
- Hjelm, H., Hjelm, K. and Sjoquist, J. (1972) Protein A from Staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. *FEBS Lett*, **28**, 73-76.
- Horisberger, M. (1981) Colloidal gold: a cytochemical marker for light and fluorescent microscopy and for transmission and scanning electron microscopy. *Scan Electron Microsc*, 9-31.
- Hostetler, M.J., Wingate, J., Zhong, C.J., Harris, J.E., Vachet, R.W., Clark, M.R., Londono, D., Green, S.J., Stokes, J.J., Wignall, G.D., Glish, G.L., Porter, M.D., Evans, N.D. and Murray, R.W. (1998) Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.4 to 5.2 nanometers: Core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir*, **14**, 17-30.
- Hudelist, G., Pacher-Zavisin, M., Singer, C.F., Holper, T., Kubista, E., Schreiber, M., Manavi, M., Bilban, M. and Czerwenka, K. (2004) Use of high-throughput protein array for profiling of differentially expressed proteins in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*, **86**, 281-291.

- Hunter, R.J. and Wright, H.J.L. (1971) The dependence of electrokinetic potential on concentration of electrolyte *Journal of Colloid and Interface Science* **37**, 564-580
- Hunter, W.R., Holloway, T.C., Chatterjee, P.K. and Tasch, A.F. (1981) *IEEE Electron Device Letters*, **EDL2**, 4.
- Ieong, M., Doris, B., Kedzierski, J., Rim, K. and Yang, M. (2004) Silicon Device Scaling to the Sub-10-nm Regime *Science*, **306**, 2057-2060
- Irving, R.A. and Hudson, P.J. (2000) Proteins emerge from disarray. *Nat Biotechnol*, **18**, 932-933.
- Iwasa, S., Maeda, K., Nakano, K., Ohfuji, T. and Hasegawa, E. (1996) Design Characterization of Alicyclic Polymers with Alkoxy-ethyl Protecting Groups for ArF Chemically Amplified Resists. *Journal of Photopolymer Science and Technology*, **9**, 447-456.
- Jahn-Schmid, B., Harwanegg, C., Hiller, R., Bohle, B., Ebner, C., Scheiner, O. and Mueller, M.W. (2003) Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy*, **33**, 1443-1449.
- Ji, M., Hou, P., Li, S., He, N. and Lu, Z. (2004) Colorimetric silver detection of methylation using DNA microarray coupled with linker-PCR. *Clin Chim Acta*, **342**, 145-153.
- Joachim, C. (1991) The conductance of a single molecule ? *New Journal of Chemistry*, **15**, 223-229.
- Joachim, C., Gimzewski, J.K., Schlittler, R.R. and Chavy, C. (1995) Electronic transparency of a single C60 molecule. *Physical Review Letters*, **74**, 2102-2105.
- Joachim, C., Gimzewski, J.K. and Tang, H. (1998) Physical principles of the single-C60 transistor effect. *Physical Review B*, **58**, 16407-16417
- Joos, T.O., Schrenk, M., Hopfl, P., Kroger, K., Chowdhury, U., Stoll, D., Schorner, D., Durr, M., Herick, K., Rupp, S., Sohn, K. and Hammerle, H. (2000) A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis*, **21**, 2641-2650.
- Kelley, S.O., Boon, E.M., Barton, J.K., Jackson, N.M. and Hill, M.G. (1999) Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA. *Nucleic Acids Research*, **27**, 4830-4837.
- Kem, W. (1993) Handbook of Semiconductor Wafer Cleaning Technology. *W.Ed.*, New Jersey.
- Kergueris, C., Bourgoin, J.P. and Palacin, S. (1999) Experimental investigations of the electrical transport properties of dodecanethiol and α,ω bistihothiophene molecules embedded in metal-molecule-metal junctions. *Nanotechnology*, **10**, 8-13.
- Kerslake, E.D.S. and Wilson, C.G. (1996) Pharmaceutical and biomedical applications of fiber optic biosensors based on infra red technology *Advanced Drug Delivery Reviews* **21**, 205-213.
- Kikuchi, J., Mitsui, Y., Asakura, T., Hasuda, K., Araki, H. and Owaku, K. (1999) Spectroscopic investigation of tertiary fold of staphylococcal protein A to explore its engineering application. *Biomaterials*, **20**, 647-654.
- Kondo, A., Murakami, F. and Higashitani, K. (1992) Circular dichroism studies on conformational changes in protein molecules upon adsorption on ultrafine polystyrene particles. *Biotechnology and Bioengineering*, **40**, 889-894.
- Kooij, E.S., Brouwer, E.A.M., Wormeester, H. and Poelsema, B. (2003) Formation and optical characterisation of colloidal gold monolayers *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **222**, 103-111
- Kryszewski, M. (1998) Gradient polymers and copolymers. *Polymers for Advanced Technologies*, **9**, 244-259.
- Kuznetsov, Y.G., Gurnon, J.R., Van Etten, J.L. and McPherson, A. (2005) Atomic force microscopy investigation of a chlorella virus, PBCV-1. *J Struct Biol*, **149**, 256-263.
- Lakard, B., Herlem, G., de Labachellerie, M., Daniau, W., Martin, G., Jeannot, J.C., Robert, L. and Fahys, B. (2004) Miniaturized pH biosensors based on electrochemically modified electrodes with biocompatible polymers. *Biosens Bioelectron*, **19**, 595-606.
- Langmuir, I. (1917) The constitution and fundamental properties of solids & liquids . II . Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, **39**, 1848-1906.
- Legendre, L. and Legendre, P. (1998) *Numerical ecology*. Elsevier Science BV.
- Leveque, G., Bonnet, J., Tahraoui, A. and Girard, P. (1998) Observation of surface potential at nanometer scale by electrostatic force microscopy (EFM) with large signals *Materials Science and Engineering B*, **51**, 197-201
- Liang, R.Q., Tan, C.Y. and Ruan, K.C. (2004) Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement. *J Immunol Methods*, **285**, 157-163.
- Lide, D.R. (ed.). (1993-1994) *Handbook of chemistry and physics*.
- Lin, L., Zhao, H.Q., Li, J.R., Tang, J.A., Duan, M.X. and Jiang, L. (2000) Study on colloidal au-enhanced DNA sensing by quartz crystal microbalance. *Biochemical and Biophysical Reserch Communication*, **274**, 817-820.
- Lindmark, R., Thorén-Tolling, K. and Sjoquist, J. (1983) Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *Journal of Immunological Methods*, **62**, 1-13.
- Lindsay, S. (2005) Single-Molecule Electronic Measurements with metal electrodes. *Journal of Chemical Education*, **82**, 727-733
- Liston, E.M. (1989) Plasma Treatment for Improved Bonding: A Review. *Journal of Adhesion*, **30**, 198.
- Liu, J., Ong, W., Roman, E., Lynn, M.J. and Kaifer, A.E. (2000) Cyclodextrin-modified gold nanospheres. *Langmuir*, **16**, 3000-3002.
- Ludwig, M., Dettmann, W. and Gaub, H.E. (1997) Atomic force microscope imaging contrast based on molecular recognition. *Biophysical Journal*, **72**, 445-448.
- Lyklema, H. (1995) Fundamentals of interface and colloid science *Academic Press*, London.
- Lyubchenko, Y.L. and Shlyakhtenko, L.S. (1997) Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 496-501.
- MacBeath, G. and Schreiber, S.L. (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, **289**, 1760-1763.
- Madou, M. (1997) Fundamentals of microfabrication. *CRC Press*.

- Maiyalagan, T. and Viswanathan, B. (2005) Template synthesis and characterization of well-aligned nitrogen containing carbon nanotubes. *Materials Chemistry and Physics*, **93**, 291-295.
- Malaquin, L., Vieu, C., Geneviève, M., Tauran, Y., Carcenac, F., Pourciel, M.L., Leberre, V. and Trévisiol, E. (2004) Nanoelectrode-based devices for electrical biodetection in liquid solution. *Microelectronic Engineering*, **73-74**, 887-892.
- Mangenev, C., Ferrage, F., Aujard, I., Marchi-Artzner, V., Jullien, L., Ouari, O., Rekaï el, D., Laschewsky, A., Vikholm, I. and Sadowski, J.W. (2002) Synthesis and properties of water-soluble gold colloids covalently derivatized with neutral polymer monolayers. *J Am Chem Soc*, **124**, 5811-5821.
- Manz, A., Pamme, N. and Iossifidis, D. (2004) Bioanalytical chemistry. *Imperial College London*.
- Martin, Y. and Wickramasinghe, H.K. (1987) Magnetic imaging by "force microscopy" with 1000 Å resolution. *Applied Physics Letters*, **50**, 1455-1457.
- Maskos, U. and Southern, E.M. (1992) Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1679-1684.
- McWhorter, P., Frazier, A.B. and Rai-Choudhury, P. (1997) Chapter 1: Micromachining and trends for the twenty-first century. *Handbook of microlithography, micromachining, and microfabrication*, 4-30.
- Medlin, J. (2001) Array of hope for gene technology. *Environ Health Perspect*, **109**, A34-37.
- Melnyk, O., Duburcq, X., Olivier, C., Urbes, F., Auriault, C. and Gras-Masse, H. (2002) Peptide arrays for highly sensitive and specific antibody-binding fluorescence assays. *Bioconjug Chem*, **13**, 713-720.
- Metzger, R.M. (2003) Unimolecular electrical rectifiers. *Chem Rev*, **103**, 3803-3834.
- Meyer, G. and Amer, N.M. (1988) Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, **53**, 1045-1047.
- Miller, J.C. and Miller, J.N. (1993) Statistics for analytical Chemistry. 3^e Edition, **Ellis Horwood**.
- Miller, J.C., Zhou, H., Kwekel, J., Cavallo, R., Burke, J., Butler, E.B., Teh, B.S. and Haab, B.B. (2003) Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics*, **3**, 56-63.
- Nakayama, H., Ohno, H. and Okahata, Y. (2001) Intramolecular electron conduction along DNA strands and their temperature dependency in a DNA-aligned cast film. *Chem Commun (Camb)*, 2300-2301.
- Okahata, Y., Kobayashi, T., Nakayama, H. and Tanaka, K. (1998) DNA-aligned cast film and its anisotropic electron conductivity *Supramolecular Science* **5**, 317-320.
- Olivier, C., Hot, D., Huot, L., Ollivier, N., El-Mahdi, O., Gouyette, C., Huynh-Dinh, T., Gras-Masse, H., Lemoine, Y. and Melnyk, O. (2003) Alpha-oxo semicarbazone peptide or oligodeoxynucleotide microarrays. *Bioconjug Chem*, **14**, 430-439.
- Olson, M.A. (1998) Mean-field analysis of protein-protein interactions. *Biophysical Chemistry*, **75**, 115-128.
- Onoa, G.B., Cervantes, G., Moreno, V. and Prieto, M.J. (1998) Study of the interaction of DNA with cisplatin and other Pd(II) and Pt(II) complexes by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1473-1480.
- Ouerghi, O., Touhami, A., Othmane, A., BenOuada, H., Martelet, C., Fretigny, C. and Jaffrezic-Renault, N. (2002) Investigating antibody-antigen binding with atomic force microscopy *Sensors and Actuators B: Chemical*, **84**, 167-175
- Overney, R.M., Meyer, E., Frommer, J., Brodbeck, D., Lüthi, R., Howald, L., Güntherodt, H.J., Fujihira, M., Takano, H. and Gotoh, Y. (1992) Friction measurements on phase-separated thin films with a modified atomic force microscope. *Nature*, **359**, 133-135.
- Park, H., Lim, A.K.L. and Alivisatos, A.P. (1999) Fabrication of metallic electrodes with nanometer separation by electromigration. *Applied Physics Letters* **75**, 301-303.
- Park, S.J., Taton, T.A. and Mirkin, C.A. (2002) Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science*, **295**, 1503-1506.
- Parthasarathy, R., Lin, X.M. and Jaeger, H.M. (2001) Electronic transport in metal nanocrystal arrays : the effect of structural disorder on scaling behavior. *Physical Review Letters*, **87**, 186807.
- Patolsky, F., Ranjit, K.T., Lichtenstein, A. and Willner, I. (2000) Dendritic amplification of DNA analysis by oligonucleotide-functionalized Au-nanoparticles. *Chemical Communications. London*, **12**, 1025-1026.
- Phadke, R.S. (1992) Biosensors and enzyme immobilized electrodes. *Biosystems*, **27**, 203-206.
- Poirier, G.E. and Pylant, E.D. (1996) The Self-Assembly Mechanism of Alkanethiols on Au(111). *Science*, **272**, 1145-1148.
- Poma, A., Spano, L., Pittaluga, E., Tucci, A., Palladino, L. and Limongi, T. (2005) Interactions between saporin, a ribosome-inactivating protein, and DNA: a study by atomic force microscopy. *J Microsc*, **217**, 69-74.
- Porath, D., Bezryadin, A., de Vries, S. and Dekker, C. (2000) Direct measurement of electrical transport through DNA molecules. *Nature*, **403**, 635-638.
- Powell, R.D., Halsey, C.M., Spector, D.L., Kaurin, S.L., McCann, J. and Hainfeld, J.F. (1997) A covalent fluorescent-gold immunoprobe: simultaneous detection of a pre-mRNA splicing factor by light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem*, **45**, 947-956.
- Quinn, D.I., Henshall, S.M. and Sutherland, R.L. (2005) Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer*, **41**, 858-887.
- Ram, M.K., Carrara, S., Paddeu, S. and Nicolini, C. (1997) Effect of annealing on physical properties of conducting poly(ortho-anisidine) Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films* **302**, 89-97.
- Rankl, M., Laib, S. and Seeger, S. (2003) Surface tension properties of surface-coatings for application in biodiagnostics determined by contact angle measurements. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, **30**, 177-186.

- Reed, M.A., Zhou, C., Muller, C.J., Burgin, T.P. and Tour, J.M. (1997) Conductance of a Molecular Junction *Science*, **278**, 252-254.
- Reichert, J., Csaki, A., Kohler, J.M. and Fritzsche, W. (2000) Chip-based optical detection of DNA hybridization by means of nanobead labeling. *Anal Chem*, **72**, 6025-6029.
- Renault, J.P., Bernard, A., Juncker, D., Michel, B., Bosshard, H.R. and Delamarche, E. (2002) Fabricating microarrays of functional proteins using affinity contact printing. *Angew Chem Int Ed Engl*, **41**, 2320-2323.
- Richman, D.D., Cleveland, P.H., Oxman, M.N. and Johnson, K.M. (1982) The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species *Journal of Immunology*, **128**, 2300-2305.
- Robinson, W.H., DiGennaro, C., Hueber, W., Haab, B.B., Kamachi, M., Dean, E.J., Fournel, S., Fong, D., Genovese, M.C., de Vegvar, H.E., Skrinier, K., Hirschberg, D.L., Morris, R.I., Muller, S., Pruijn, G.J., van Venrooij, W.J., Smolen, J.S., Brown, P.O., Steinman, L. and Utz, P.J. (2002) Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med*, **8**, 295-301.
- Robison, J.E., Perreard, L. and Bernard, P.S. (2004) State of the science: molecular classifications of breast cancer for clinical diagnostics. *Clin Biochem*, **37**, 572-578.
- Rose, S.D. and Schena, M. (2000) *Microarray biochip technology : Novel Microarray Printing and Detection Technologies*. Eaton Publishing.
- Saha, K., Bender, F. and Gizeli, E. (2003) Comparative study of IgG binding to proteins G and A: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device. *Anal Chem*, **75**, 835-842.
- Salvadori, M.C., Fritz, M.C., Carraro, C., Maboudian, R., Monteiro, O.R. and Brown, I.G. (2001) Characterization of AFM cantilevers coated with diamond-like carbon *Diamond and Related Materials*, **10**, 2190-2194
- Sandhyarani, N. and Pradeep, T. (2003) Current understanding of the structure, phase transitions and dynamics of self-assembled monolayers on two- and three-dimensional surfaces. *International Reviews in Physical Chemistry*, **22**, 221-262.
- Sasaki, Y.C., Yasuda, K., Susuki, Y., Ishibashi, T., Satoh, I., Fujiki, Y. and Ishiwata, S. (1997) Two-dimensional arrangement of a functional protein by cysteine-gold interaction : enzyme activity and characterization of a protein monolayer on a gold substrate. *Biophysical Journal*, **72**, 1842-1848.
- Scheer, E., Joyez, P., Esteve, D., Urbina, C. and Devoret, M.H. (1997) Conduction channel transmissions of atomic-size aluminum contacts. *Physical Review Letters* **78**, 3535-3538.
- Scheib, S., Cava, M.P., Baldwin, J.W. and Metzger, R.M. (1998) In search of D- σ -A molecular rectifiers : the D- σ -A system derived from triptycenequinone and tetrathiafulvalene. *Thin Solid Films*, **327**, 100-103.
- Schwartz, D. (1993) Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. 4^e Edition **Médecine-Sciences Flammarion**.
- Shin, Y.G.K., Newton, M.D. and Isied, S.S. (2003) Distance dependence of electron transfer across peptides with different secondary structures: the role of peptide energetics and electronic coupling *Journal of The American Chemical Society*, **125**, 3722-3732.
- Siqueira Petri, D.F., Wenz, G., Schunk, P. and Schimmel, T. (1999) An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on SiO₂ and the vapor deposition of gold layers. *Langmuir*, **15**, 4520-4523.
- Slot, J.W. and Geuze, H.J. (1985) A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *European Journal of Cell Biology*, **38**, 87-93.
- Slowinski, K., Chamberlain, R.V., Miller, J.C. and Majda, M. (1997) Through-bond and chain-to-chain coupling. Two pathways in electron tunneling. Through liquid alkanethiol monolayers on mercury electrodes. *Journal of the American Chemical Society*, **119**, 11910-11919.
- Steward, M.W. (1984) Structure and biological activities of its immunoglobulin classes. *Outline studies in biology antibodies : Their structure and function, chapter 5, Chapman & Hall*.
- Storm, A.J., vanNoort, J., deVries, S. and Dekker, C. (2001) Insulating behavior for DNA molecules between nanoelectrodes at the 100 nm length scale. *Applied Physics Letters* **79**, 3881-3883.
- Sugimura, H. and Nakagiri, N. (1997) Nanoscopic Surface Architecture Based on Scanning Probe Electrochemistry and Molecular Self-Assembly *Journal of the American Chemical Society*, **119**, 9226-9229.
- Suleiman, A.A. and Guilbault, G.G. (1994) Recent developments in piezoelectric immunosensors. A review. *Analyst*, **119**, 2279-2282.
- Svarovsky, S.A., Szekely, Z. and Barchi, J.J. (2005) Synthesis of gold nanoparticles bearing the Thomsen-Friedenreich disaccharide: a new multivalent presentation of an important tumor antigen. *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**, 587-598.
- Tans, S.J., Devoret, M.H., Dai, H., Thess, A., Smalley, R.E., Geerligs, L.J. and Dekker, C. (1997) Individual single-wall carbon nanotubes as quantum wires. *Nature*, **386**, 474-477.
- Thai Do, Q., Clemens, H. and Lorke, A. (2003) Coulomb blockade systems fabricated by atomic force microscopy. *Nanotechnology*, **2**, 774-777.
- Thiébaud, P., Beuret, C., de Rooij, N.F. and Koudelka-Hep, M. (2000) Microfabrication of Pt-tip microelectrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **70**, 51-56.
- Thomas, R.C., Houston, J.E., Crooks, R.M., Kim, T. and Michalske, T.A. (1995) Probing adhesion forces at the molecular scale *Journal of the American Chemical Society*, **117**, 3830-3834.
- Tsai, C.Y., Chang, T.L., Chen, C.C., Ko, F.H. and Chen, P.H. (2005) An ultra sensitive DNA detection by using gold nanoparticle multilayer in nano-gap electrodes *Microelectronic Engineering*, **78-79**, 546-555.
- Ueno, K., Hayashida, M., Ye, J.Y. and Misawa, H. (2005) Fabrication and electrochemical characterization of interdigitated nanoelectrode arrays *Electrochemistry Communications* **7**, 161-165.
- Ulman, A. (1991) An introduction to ultrathin organic films. *From Langmuir-Blodgett to self-assembly Boston : Academic*.

- van Oss, C.J., Chaudhury, M.K. and Good, R.J. (1987) Monopolar surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, **28**, 35-64.
- Velev, O.D. and Kaler, E.W. (1999) In Situ Assembly of Colloidal Particles into Miniaturized Biosensors *Langmuir*, **15**, 3693-3698.
- Waltenburg, H.N. and Yates, J.T. (1995) Surface chemistry of silicon. *Chemical Review*, 1589-1673.
- Wang, B., Wang, H., Li, H., Zeng, C. and Hou, J.G. (2000) Tunable single-electron tunneling behavior of ligand-stabilized gold particles on self-assembled monolayers. *Physical Review B*, **63**, 035403-035407.
- Wasserman, S.R., Tao, Y.T. and Whitesides, G.M. (1989) Structure and reactivity of alkylsiloxane monolayers formed by reaction of alkyltrichlorosilanes on silicon substrates. *Langmuir*, **5**, 1074-1087.
- Wittpahl, V., Behnke, U., Wand, B. and Mertin, W. (1998) Cantilever influence suppression of contactless IC-testing by electric force microscopy *Microelectronics Reliability*, **38**, 981-986
- Wold, D.J. and Frisbie, C.D. (2001) Fabrication and characterization of metal-molecule-metal junctions by conducting probe atomic force microscopy. *J Am Chem Soc*, **123**, 5549-5556.
- Wong, H.S.P. (2005) Beyond the conventional transistor. *Solid-State Electronics*, **49**, 755-762.
- Wulfkuhle, J., Espina, V., Liotta, L. and Petricoin, E. (2004) Genomic and proteomic technologies for individualisation and improvement of cancer treatment. *Eur J Cancer*, **40**, 2623-2632.
- Xue, M., Li, J., Lu, Z., Ko, P.K. and Chan, M. (2002) Array-Based Electrical Detector of Integrated DNA Identification System for Genetic Chip Applications. *Proceedings of the 32nd European Solid-State Device Research Conference (ESSDERC 2002)*, 483-486.
- Yaliraki, S.N. and Ratner, M.A. (1998) Molecule-Interface Coupling Effects on Electronic Transport in Molecular Wires. *The Journal of Chemical Physics*, **109**, 5036-5043.
- Yang, Q., Atanasov, P. and Wilkins, E. (1999) Needle-type lactate biosensor. *Biosens Bioelectron*, **14**, 203-210.
- You, H.X. and Lowe, C.R. (1996) AFM Studies of Protein Adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science*, **182**, 586-601.
- Zhang, H., He, H.X., Mu, T. and Liu, Z.F. (1998) Force titration of amino group-terminated self-assembled monolayers of 4-aminothiophenol on gold using chemical force microscopy *Thin Solid films*, **327**, 778-786.
- Zhao, H.Q., Lin, L., Li, J.R., Tang, J.A., Duan, M.X. and Liang, L. (2001) DNA biosensor with high sensitivity amplified by gold nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, **3**, 321-323.
- Zhou, C., Deshpande, M.R., Reed, M.A., Jones, L. and Tour, J.M. (1997) Nanoscale metal self-assembled monolayer metal heterostructures. *Applied Physics Letters* **71**, 611-613.
- Zhu, M., Jiang, Z. and Jing, W. (2005) Fabrication of polypyrrole-glucose oxidase biosensor based on multilayered interdigitated ultramicroelectrode array with containing trenches *Sensors and Actuators B: Chemical* **110**, 382-389

