



Mémoire de fin d'études

PRESENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE MASTER

Filière : Physique
Option : Physique des Matériaux

THÈME

PLATEFORME A BASE DE SILICIUM DESTINEE A
LA DETECTION D'ESPECES BIOLOGIQUE

Préparé par : MEZHOU Mouna

Soutenu le : 06/07/2019

Devant le jury :

Président :	LABGAA Noudjoud	MCB	Université de BBA
Rapporteur :	BENMOUHOU B Chafia	MCB	Université de BBA
Examineur :	BENCHIHEUB Nadjet	MCB	Université de BBA
Examineur :	BENKARA Nadjima	MCB	Université de BBA
Invité :	BERRAHAIL Mounira	MCB	Université de BBA

Année Universitaire 2018-2019

Remerciements

Avant tous nous remercions dieu le clément, le méxicordieux qui m'a donné la patience et l'énergie pour la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier également mon encadreur Dr. BENMOHOUB CHAFIA qui m'a orienté tout au long de ce travail.

Je remercier également Dr. BENKARA NADJIMA d'avoir accepté d'examiner ce jury et Dr. LABGAA NOUDJOUH d'avoir accepté de présider ce manuscrit.

Je remercier également Dr. BENCHIHEUB NADJET d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Je remercier également Dr. BERRAHAIL MOUNIRA d'avoir accepté l'invitation

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Avec les sentiments de gratitude les plus sincères.

Je dédie ce modeste travail :

A ma cher père « Ahmed » pour son amour, sa patience, ses sacrifices, ses encouragements permanents pendant mes études.

A ma chère maman « Djahida » qui m'est la plus chère dans ce monde, qui a toujours éclairé mon chemin, depuis le jour où j'ai vu la lumière par ses prières, son amour, ses sacrifices, ses encouragements, par l'éducation qui elle m'a inculquée et toutes les peines qu'elle s'est donnée pour moi pour ma réussite.

A mes frères Lhaoisse, Houssam.

A mes adorables sœurs Zahirae, Naima, Malia, Khalissa, Nassima.

A ma la femme de mon frère Sabrina.

A mes J'aime les jeunes Nihal, Akram, Houda, Rihab, Sadjida, Nourhan, Amani .

A mes toute la famille « Mezhoud » : mes oncles, mes cousines .

A mes chère amis Aziza, Khadidja, Haizia, Salma, Radia, Farida, Ahlame, Widad, Houria, Samia, Zahia, Moufida, Bouchera, Amina, wafaà, somia ,Kenza, Sirin, Rjma, Anisa, Nesrin, Rbiha, laila, Rebh, Sabrina.

A tous ceux et celles qui ont contribué à ma formation.

MOUNA

Table des matières

Dédicaces

Remerciements

Table des matières..... i

Liste des figures..... ii

Liste des tableaux..... iii

Introduction générale.....1

Chapitre 1 : Etat de l'art de la fonctionnalisation du silicium.....3

1.1 Structure cristalline du silicium... ..3

1.1.1. Différents types de silicium.....4

1.2 La fonctionnalisation.....6

1.2.1 Fonctionnalisation directe.....7

1.2.2 Fonctionnalisation indirecte.....9

1.2.3 Différentes formes de silanols.....12

1.3 Procédés de greffage des biomolécules sur la surface de silicium.....16

1.3.1 Notion de greffage.....16

1.3.2 Types de molécules greffées sur la surface de silicium.....16

1.3.3 Procédés de greffage organiques sur le silicium.....20

1.4 Conclusion.....22

Chapitre 2 : Décontamination et silanisation des substrats de silicium23



2.1	Notion de contamination.....	23
2.1.1	Types de contaminants.....	23
2.1.2	La source de la contamination.....	24
2.1.3	Effet des contaminants.....	25
2.2	Techniques de préparation de la surface du silicium.....	26
2.2.1	Nettoyage des surfaces.....	26
2.2.2	Décapage.....	28
2.2.3	Importance du décapage de la surface de silicium.....	28
2.3	Silanisation.....	29
2.3.1	Notion de silanisation.....	29
2.3.2	Quelques types d'alkoxysilanes.....	30
2.3.3	Processus de silanisation à l'APTES.....	32
2.4	Caractérisation du silicium après traitement au silane.....	33
2.4.1	Caractérisation par spectroscopie infrarouge.....	33
2.4.2	Caractérisation par angle de contact du Silicium après greffage de l'APTES.....	36
2.4	Conclusion.....	36
	Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde.....	37
3.1	Définition.....	37
3.1.1	La biotine.....	37

3.1.2 L'avidine.....	38
3.1.3 Le complexe Biotine-avidine.....	38
3.2 Le couplage des biomolécules sur le silicium silanisé.....	39
3.2.1 L'adsorption.....	41
3.2.2 L'inclusion ou piégeage.....	41
3.2.3 La microencapsulation.....	41
3.2.4 La réticulation et la co-réticulation.....	42
3.2.5 Le couplage covalent.....	43
3.2.6 La méthode Langmuir-Blodgett.....	43
3.3 Réticulation.....	45
3.3.1 Types de rétiulation.....	45
3.3.2 Validation de la phase de réticulation.....	48
3.4 Immobilisation de la sonde.....	49
3.4.1 Validation de l'immobilisation de sonde.....	50
3.5 Phase de détection.....	51
3.6 Protocol.....	52
3.7 Conclusion.....	53
Conclusion générale	54
Références bibliographique.....	56
Résumé	

Liste des figures

Chapitre 1 : Etat de l'art de la fonctionnalisation du silicium

Figure 1.1 Structure cristallographique de silicium de type diamant....	4
Figure 1.2 Filme mince de silicium amorphe	4
Figure 1.3 La structure cristallographique de silicium monocristallin type diamant	5
Figure 1.4 Forme des lingots de Silicium polycristallin	6
Figure 1.5 Silicium Monocristallin, Silicium Polycristallin, Silicium Amorphe.....	6
Figure 1.6 Immobilisation des biomolécules par adsorption.....	8
Figure 1.7 Immobilisation des biomolécules par liaison covalente.....	9
Figure 1.8 Mécanisme proposé par Chidsey et al. Du greffage des alcènes sur une surface de silicium hydrogéné, en présence d'un initiateur radicalaire.....	10
Figure 1.9 Pont siloxane (a) et groupe silanol (b), présents sur les surfaces de silice.....	11
Figure 1.10 Schéma d'une réaction de silanisation. Les silanols en surface réagissent avec un organosilane trifonctionnel où EtO est le groupement fonctionnel pouvant réagir avec les silanols et R le groupement organique à fixer.....	11
Figure 1.11 Polymérisation d'un organosilane trifonctionnel en présence de molécules d'eau.....	10

Figure 1.12 Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption purement exponentielle, Silanisation type a.....	13
Figure 1.13 Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption purement exponentielle, Silanisation type e.....	14
Figure 1.14 Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption purement exponentielle, Silanisation type ha.....	14
Figure 1.15 Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption purement exponentielle, Silanisation type c1, c2.....	16
Figure 1.16 Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique.....	17
Figure 1.17 La structure schématique d'une molécule anticorps.....	18
Figure 1.18 Structure d'une cellule bactérienne.....	19
Figure 1.19 Représentation schématique des différents bio- Récepteurs.....	19
Figure 1.20 Mécanisme de dissolution du silicium : composantes chimique et électrochimique.....	21
Figure 1. 21 Plateau en téflon contenant le matériel nécessaire au greffage électrochimique (a) Schémas de la cellule dans laquelle a eu lieu le greffage électrochimique, vue de côté (b) et vue de dessus (c).....	22

Chapitre 2 : Décontamination et silanisation des substrats de silicium

Figure 2.1 une surface hydroxylée de silicium.....	29
---	----

Figure 2.2 Formule développée de (3-aminopropyl)-triéthoxysilane (APTES).....	30
Figure 2.3 Formule développée de (3-aminopropyl) diéthoxyméthylsilane.....	30
Figure 2.4 Formule développée de (3-aminopropyl)-diméthyléthoxysilane.....	31
Figure 2.5 Formule développée de (3-aminopropyl)-Triméthoxysilane.....	31
Figure 2.6 Formule développée de (3-glycidoxypropyl)-diméthyléthoxysilane.....	31
Figure 2.7 Formule développée de (3-mercaptopropyl)-triméthoxysilane.....	32
Figure 2.8 Représentation des molécules de (a) 3-aminopropyltriéthoxylesilane (APTES), (b) 3-aminopropyl (diéthoxyle) méthylesilane (APMDES) et (c) 3-(éthoxylediméthylesilyl) propylamine (APDMES).....	32
Figure 2.9 Formule chimique du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES).....	33
Figure 2.10 Schéma réactionnel de la silanisation avec l'APTES.....	33
Figure 2.11 Spectres FTIR : APTES (spectre en rouge) et APTES après fonctionnalisation (spectre en bleu).....	35
Figure 2.12 Photographie d'une goutte d'eau (3µL) déposée sur la surface du Si après greffage d'APTES.....	36

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

Figure 3.1 Structure de la biotine. A. Formule développée et numérotation des atomes, B. Structure tridimensionnelle	37
Figure 3.2 Structure de l'avidine.....	48
Figure 3.3 Différents modes d'immobilisation des enzymes.....	40
Figure 3.4 Exemple de la réticulation au glutaraldéhyde.....	42
Figure 3.5 Formule développée de glutaraldéhyde.....	45
Figure 3.6 Mécanisme de greffage de la réticulation glutaraldéhyde sur la surface silanisé par l'APTES.....	46
Figure 3.7 Formule développée de glyoxal.....	47
Figure 3.8 Formule développée de glycoluril.....	47
Figure 3.9 Formule développée de glycérol.....	48
Figure 3.10 Spectre FTIR de la liaison double entre l'APTES et glutaraldéhyde (C=N).....	48
Figure 3.11 Mécanisme d'immobilisation d'une protéine sur la surface de silicium par l'intermédiaire de groupements amines greffés.....	50
Figure 3.12 Topographies AFM et profils linéaires des surfaces de SiO ₂ à terminaison COOH après le dépôt d'avidine en (a) 5 nM et (b) Solution d'avidine à 160 nM. Toutes les images sont obtenues dans l'air.....	51
Figure 3.13 différentes étapes de fonctionnalisation de l'avidine a la surface de silicium.....	52

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Etat de l'art

Tableau 1.1 catégories de biomolécules douées de propriétés de reconnaissance.....	20
---	----

Chapitre 3 Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

Tableau 3.1 Caractéristiques des principales méthodes d'immobilisation	44
---	----

Introduction générale

Introduction générale

Ces dix dernières années, les biocapteurs à base de silicium ont connu un développement considérable. Ce développement est dû en majeure partie à l'utilisation du silicium, un matériau de prédilection dans la technologie des semi-conducteurs. En plus de la microélectronique, ce matériau a prouvé son efficacité dans le domaine du traitement de surface. Ceci nous ramène automatiquement au domaine dans lequel nous avons choisi de faire notre étude.

L'objectif majeur de notre travail est de faire une étude globale sur les différentes étapes par lesquelles passe la fabrication d'un biocapteur. Partant de l'étape de décontamination de la surface et arrivant jusqu'à l'étape d'immobilisation de la molécule sonde.

Dans ce cas-là, nous avons consacré un premier chapitre à l'état de l'art dans la conception d'un biocapteur. Ce chapitre sera une introduction brève à toutes les phases essentielles à la réalisation d'une plateforme à base de silicium, destinée à la détection d'une molécule biologique.

La première étape dans l'élaboration d'un biocapteur et qui constitue une étape cruciale dans la réussite de celui-ci est l'étape de décontamination. En effet, les plaquettes de silicium contiennent généralement des impuretés qui peuvent empêcher la réussite du traitement chimique envisagé sur la surface de celui-ci. Nous avons consacré, ainsi, un deuxième chapitre à l'énumération de certains de ces contaminants et de leurs origines. Vu l'importance de cette phase, plusieurs protocoles de nettoyage ont été proposés dans la littérature.

La seconde partie non moins importante de ce chapitre est la phase de décapage. Cette phase qui permet d'activer la surface de silicium provoquant, ainsi, la création de groupements hydroxyles nécessaires à la réussite de la phase de silanisation qui constituera une étape importante du chapitre deux.

L'objectif de la silanisation est le greffage à la surface du silicium de groupements fonctionnels, dans notre cas des fonctions amines. Pour se faire nous avons choisi un agent de couplage parmi les organosilanes afin d'obtenir des terminaisons amines. Cet organosilane est l'aminopropyltriméthoxysilane (APTES).

Le rôle de ces fonctions amines est de réagir avec des groupements fonctionnels d'une biomolécule (sonde) permettant son immobilisation sur la surface du silicium.

Introduction générale

Une validation de chaque étape est nécessaire pour la réussite du processus de silanisation. C'est pourquoi il est plus qu'important de faire une caractérisation à chaque procédure accomplie. Nous avons choisi de citer comme technique de caractérisation, la spectroscopie infrarouge et la microscopie à force atomique (AFM).

Le troisième et dernier chapitre de ce manuscrit se consacre à la phase nécessaire de réticulation (cross-linking) qui favorise le lien entre les groupements fonctionnels (les amines) obtenus lors de la phase de silanisation et les groupements fonctionnels de la molécule sonde. Parmi les agents de réticulation, nous avons cité le glutaraldehyde, qui se trouve être le crosslinker le plus approprié à ce type de biomolécule.

Ce chapitre constitue la base de notre travail car il traite principalement de l'immobilisation de la biomolécule sonde sur la surface du substrat de silicium. La plateforme en question peut être le support de plusieurs types de biomolécules, sauf que nous avons choisi de concentrer notre étude autour du complexe avidine /biotine. La raison de ce choix est justifiée par le fait que l'affinité entre l'avidine et la biotine est extrêmement forte. Ce qui facilite énormément la tâche.

On clôturera ce chapitre par citer un protocole choisi minutieusement et qui englobe le mode opératoire jugé le plus approprié pour l'obtention d'un résultat optimal.

Chapitre 1

Etat de l'art de la
fonctionnalisation du
silicium

Chapitre 1: Etat de l'art de la fonctionnalisation du silicium

La fonctionnalisation du silicium est considérée aujourd'hui comme l'une des technologies les plus développées, non seulement en raison des propriétés spectaculaires que confère ce matériau dans le domaine de la microélectronique mais également sa capacité à subir un traitement chimique superficielle induisant des fonctions extraordinaires pouvant être exploitées dans d'autres domaines comme la médecine, la biologie, l'agroalimentaire, etc...

Ce chapitre évoque, justement, un état de l'art global sur les différentes phases par lesquelles doit passer une surface de silicium et les process qu'elle doit subir pour la conception d'un biocapteur destiné à la détection de biomolécules cibles telles des protéines.

1.1 Structure cristalline du silicium

Le Silicium (symbole **Si**, numéro atomique 14) constitué, sous forme de silice et de silicates, est un élément chimique de la famille des cristallogènes. Le substrat utilisé est du silicium monocristallin (111) vicinal, obtenu en coupant le cristal de silicium par un plan cristallographique faiblement désorienté par rapport à un plan dense, il possède de bonnes propriétés électroniques. Ce sont ces quelques propriétés particulièrement remarquables des surfaces de silicium hydrogénées [1].

Le Silicium est un matériau semi-conducteur le plus utilisé pour la fabrication de dispositifs microélectroniques ainsi que des cellules photovoltaïques [2]. Il possède 4 électrons sur sa couche périphérique et il appartient aux 14 colonnes de la classification périodique des éléments [3]. Le silicium cristallin présente une structure de type diamant (Figure 1.1). Les atomes de silicium occupent les positions d'un réseau cubique à faces centrées avec des atomes de silicium occupant un site tétraédrique sur deux de la maille [4]. Forme dérivée de la structure cubique faces centrées (CFC) est $(\frac{1}{4}, \frac{1}{4}, \frac{1}{4})$, avec un paramètre de maille de 0,357 nm. Chaque atome de silicium est entouré de quatre proches voisins avec lesquels il présente des liaisons de type covalent. En raison du caractère localisé de ces liaisons, le silicium est un matériau isolant, à l'état parfait, à 0°K [5].

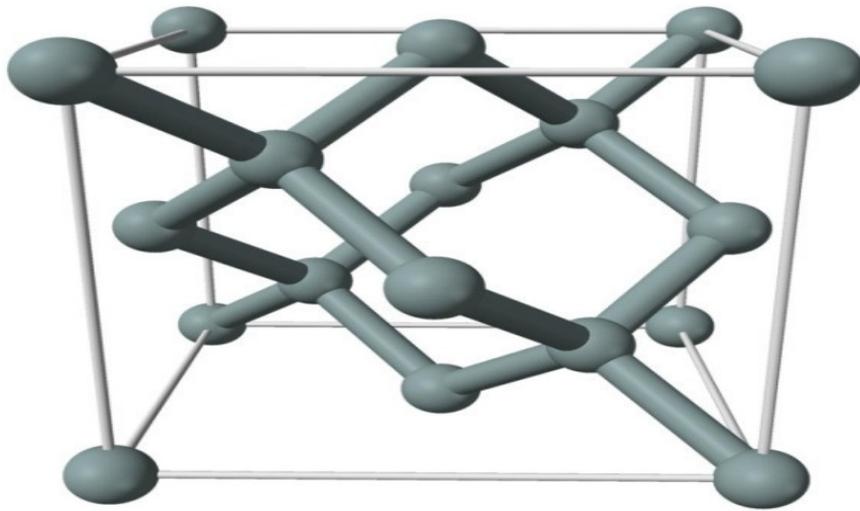


Figure 1.1 Structure cristallographique de silicium de type diamant.

1.1.1 Différents types de silicium

a) Le silicium amorphe

La périodicité est perdue dans ce type de structure, l'ordre est maintenu uniquement au niveau des premiers voisins. Localement, les liaisons Si-Si sont très similaires à l'ordre cristallin. Les distances entre deux atomes donnés dans ce type de structure peuvent être quatre ou cinq fois la distance interatomique du silicium cristallin. La conséquence de ce désordre est qu'il y a des atomes de silicium qui ne sont pas tétra-coordonnés créant ainsi des liaisons pendantes. Ces liaisons sont des pièges pour les électrons et influent sur les propriétés électroniques du silicium amorphe [6].

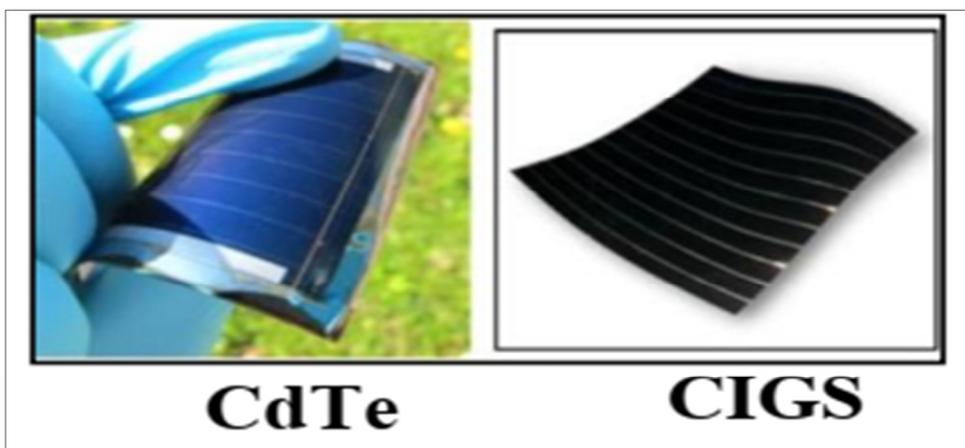


Figure 1.2 Film mince de silicium amorphe [6].

b) Le silicium monocristallin

Monocristallin est une structure cubique diamant dans laquelle deux réseaux cubiques à faces centrées s'interpénètrent. Chaque atome d'un des réseaux est entouré par 4 proches voisins équidistants de l'autre réseau formant un tétraèdre, Gerl 1997 [2]. Le monocristal possède une seule orientation cristallographique. La fusion de zone et le tirage en creuset (méthode de Czochralski) sont les deux méthodes utilisées couramment pour obtenir des lingots monocristallins de grande pureté, longs de plusieurs mètres et d'un diamètre allant jusqu'à 0.3m. On a des rendements photovoltaïques supérieurs à 15 % [3].

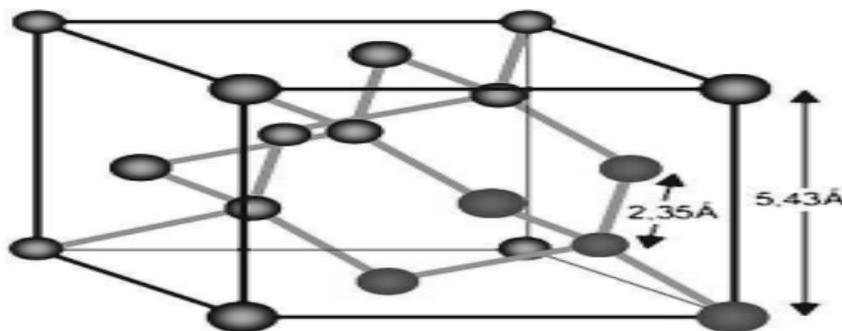


Figure 1.3 La structure cristallographique de silicium monocristallin type diamant [2].

c) Le silicium polycristallin

Cette structure est constituée de grains dont la taille varie de quelques centaines de nanomètres à quelques millimètres suivant les conditions d'élaboration, séparés entre eux par des joints de grains. Les joints de grains délimitant des grains d'orientations différentes constituent des zones désordonnées, assimilées à du silicium amorphe [7].

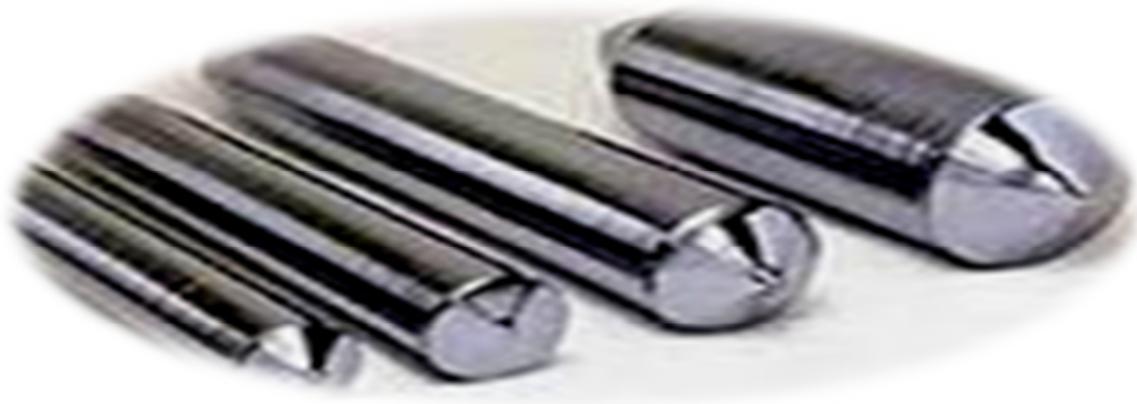


Figure 1.4 Forme des lingots de Silicium polycristallin [3]

d) Le silicium multicristallin

Le silicium multicristallin suffisamment épais possède la même structure de bande que le silicium monocristallin. Les défauts structuraux aux joints de grains créent localement des niveaux intermédiaires dans la zone interdite. Le silicium multicristallin et contrairement au silicium polycristallin, les joints de grains traversent de part et d'autre les cellules et sont parallèles au champ électrique, ce qui n'affecte donc pas les porteurs majoritaires [5].

NB: on observe bien, d'après la figure 1.5, la différence dans la structure cristalline pour les trois types de silicium.

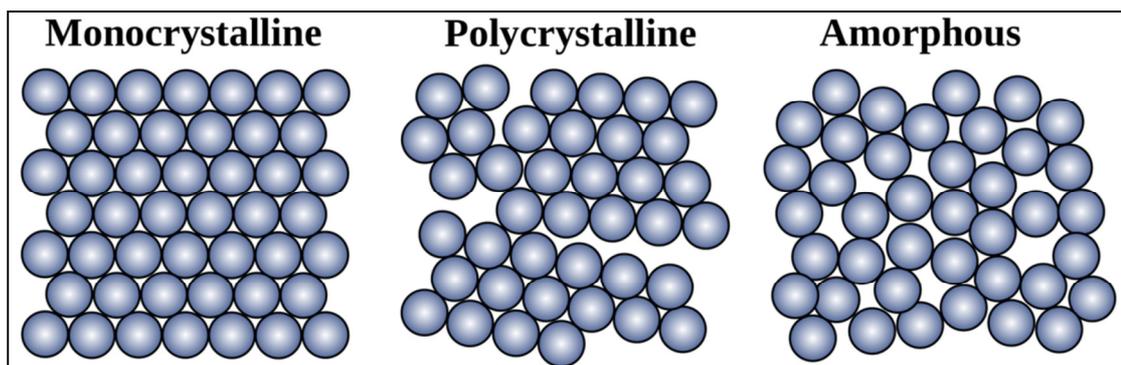


Figure 1.5 Silicium Monocristallin, Silicium Polycristallin, Silicium Amorphe [8].

1.2 Fonctionnalisation

La fonctionnalisation de la surface d'un substrat est une opération qui consiste à modifier la structure et/ou la chimie de sa surface afin de l'adapter à des conditions

Chapitre 1: Etat de l'art de la fonctionnalisation du silicium

d'utilisation données. Dans le cadre de la fonctionnalisation de la surface d'implants osseux par des molécules impliquées dans les processus de formation osseuse, trois voies peuvent être envisagées: la physisorption, la chimisorption et le greffage covalent [9]. La fonctionnalisation des surfaces a fait depuis longtemps partie des procédés industriels de fabrication d'objets divers, que ce soit pour des raisons cosmétiques ou pour lutter contre la corrosion des métaux. De plus en plus, de nouvelles fonctions sont ajoutées aux surfaces des objets, et de nouveaux procédés sont mis au point pour assurer des fonctions déjà existantes, en réponse aux enjeux économiques ou environnementaux. Les procédés de traitement ou de «fonctionnalisation» des surfaces sont extrêmement variés, faisant intervenir des domaines technologiques tels que :

- Produire des groupes fonctionnels spécifiques à la surface pour des interactions spécifiques avec d'autres groupes fonctionnels (molécules, peptides, protéines, cellules).
- Augmenter l'énergie de surface.
- Augmenter l'hydrophobicité ou l'hydrophilicité.
- Rendre la surface plus inerte chimiquement [10].

1.2.1 Fonctionnalisation directe

a) Par adsorption (physisorption)

Le phénomène d'adsorption est l'augmentation de la concentration de molécules à l'interface entre un solide et un gaz ou un liquide. Elle est à distinguer de l'absorption, qui consiste en la pénétration des espèces dans le volume du solide. C'est le phénomène d'adsorption qui nous intéresse pour comprendre par exemple la présence d'eau dans le matériau pendant son exposition à l'air de la salle blanche, où l'humidité relative (ou pression partielle d'eau) est fixée en permanence [11]. La physisorption est réversible et s'effectue sans présence d'intermédiaire entre l'adsorbat et l'adsorbant. L'adsorption de protéines sur des surfaces solides est largement appliquée dans un certain nombre de domaines tels que la biologie, la médecine et la biotechnologie [12]. Le phénomène d'adsorption conduit à un relargage rapide et non contrôlé dans le temps à cause des liaisons faibles et réversibles établies entre la molécule biologique et la surface du substrat [13]. La

Chapitre 1: Etat de l'art de la fonctionnalisation du silicium

quantité relargée peut être contrôlée en fonction de la quantité adsorbée à la surface du substrat. La fixation des biomolécules sur le support peut se faire soit par des forces de dispersion (Van der Waals), soit par des forces polaires résultant de la présence de champs électriques dans les micropores, soit par des liaisons hydrogènes dues aux groupements hydroxyyles ou amines [10].

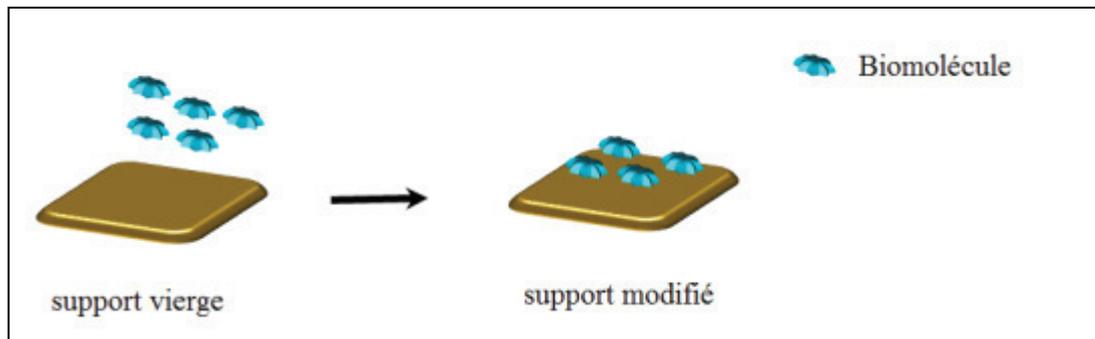


Figure 1.6 Immobilisation des biomolécules par adsorption [14].

b) Par couplage covalent

Le premier exemple de monocouche organique greffée par une liaison covalente Si-C sur une surface de silicium hydrogénée a été obtenu par Chidsey et al. dans les années 1990 [4]. Ces méthodes sont basées sur la réaction entre un groupement fonctionnel du ligand (non essentiel pour son activité catalytique) et des groupements réactifs de la surface solide. Les groupements fonctionnels disponibles pour les enzymes ou les protéines proviennent des chaînes latérales des acides aminés, notamment les groupements 3-amine (NH_2) de la lysine, carboxyle (COOH) de l'aspartate et du glutamate, sulfhydryles de la cystéine et hydroxyphénolique de la tyrosine [15].

Par définition, la liaison covalente (plusieurs centaines de kJ/mol) est une liaison chimique qui se produit entre deux non-métaux ayant des électronégativités semblables. L'immobilisation covalente de molécules biologiquement actives à la surface d'un substrat d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) nécessite l'emploi de molécules intermédiaires (agent de couplage) qui établissent le lien entre le substrat et les biomolécules. L'utilisation de ces intermédiaires permet de contrôler la densité de greffage à la surface du substrat, de limiter l'encombrement stérique des molécules biologiques et de contrôler le relargage des biomolécules dans le milieu biologique [9].

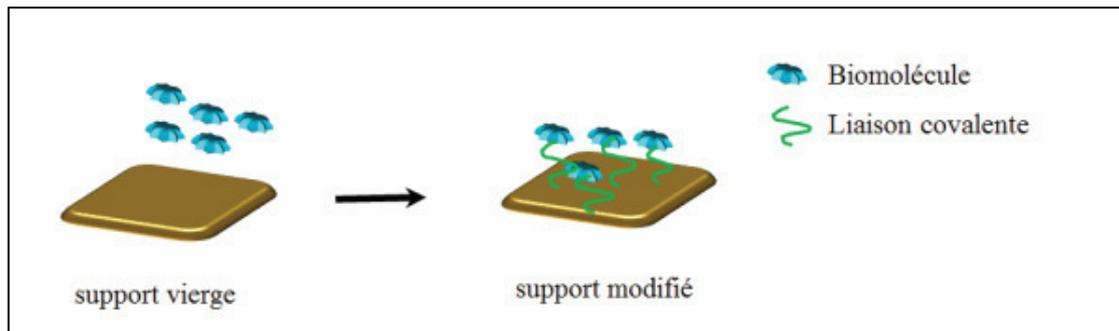


Figure 1.7 Immobilisation des biomolécules par liaison covalente [16].

1.2.2 Fonctionnalisation indirecte

a) Hydrosilylation



Les couches organiques formées par hydrosilylation se retrouvent principalement dans le domaine des biocapteurs [17]. L'hydrosilylation est par définition une réaction d'insertion d'une liaison insaturée carbone – carbone (C-C) dans la liaison silicium – hydrogène (Si-H). Elle se fait donc principalement sur la surface du silicium hydrogéné, vierge de tout oxyde. Toutefois, une réaction semblable peut être réalisée sur la surface du germanium hydrogéné, dans ce cas, la réaction est une hydrogermylation [18]. La liaison covalente entre la surface et la couche organique est une liaison Si-C présentant une grande stabilité, en raison de sa très faible polarité. Les liaisons Si-C sont notamment connues pour être résistantes à l'hydrolyse en milieu alcalin [19].

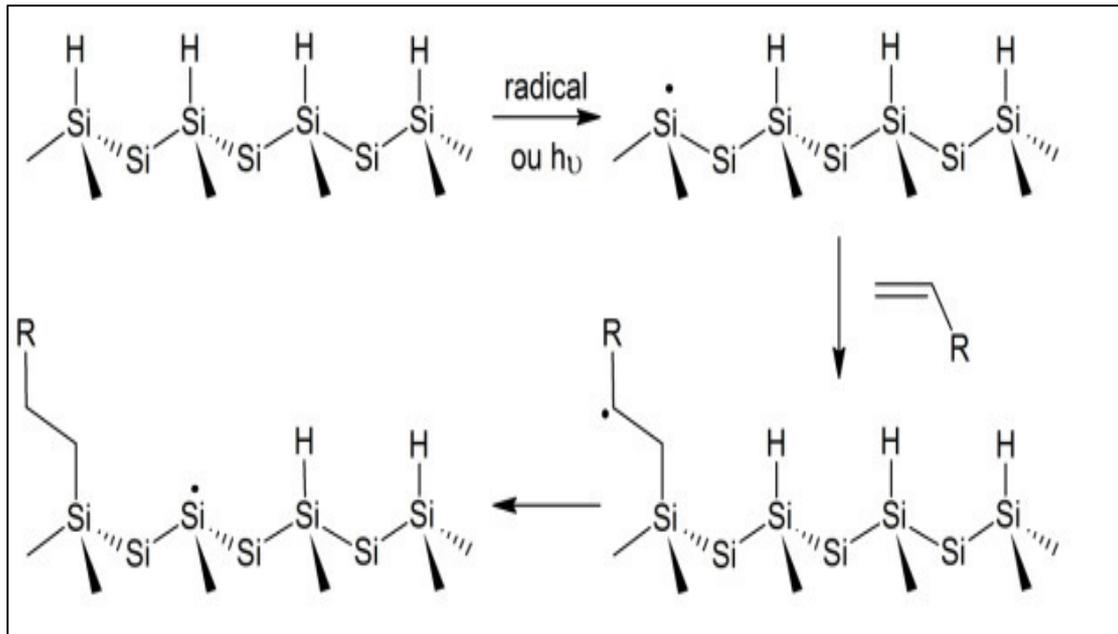


Figure 1.8 Mécanisme proposé par Chidsey et al. [20] du greffage des alcènes sur une surface de silicium hydrogéné, en présence d'un initiateur radicalaire.

b) Silanisation

La réaction de silanisation est une fonctionnalisation par des molécules organiques très exploitée et utilisée pour de nombreuses applications [21]. C'est une technique importante pour la fabrication de dispositifs variés notamment dans le domaine des capteurs [22]. Les silanes sont principalement greffés sur l'oxyde de silicium ou le verre [23], utilisés pour la fonctionnalisation de toute surface hydroxylée (présentant des groupements $-OH$). La première étape consiste en l'hydrolyse du silane en silanol, silanediol ou silanetriol.

• Principe

La silanisation permet alors d'obtenir une couche d'accrochage qui assure la fixation entre le support inorganique solide (substrat de silice) et les molécules biologiques. La silice est constituée d'un réseau de tétraèdres SiO_4 . Les atomes Si de surface conservent leur coordination avec quatre atomes d'oxygène sous forme de groupes silanols ou de ponts siloxanes (Figure 1.9) [24].

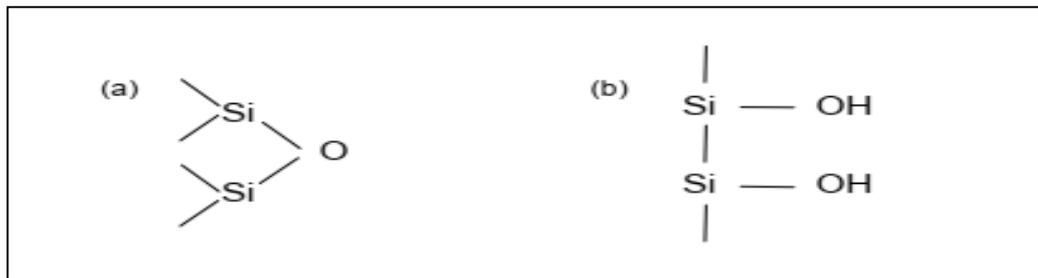


Figure 1.9 Pont siloxane (a) et groupe silanol (b), présents sur les surfaces de silice [24].

Pour être réactifs, les groupements de surface doivent être sous leur forme silanol car la fixation de molécules organiques (comme les silanes) à la surface de la silice implique un greffage covalent où les silanols en surface réagissent avec un organosilane (Figure 1.10) [24].

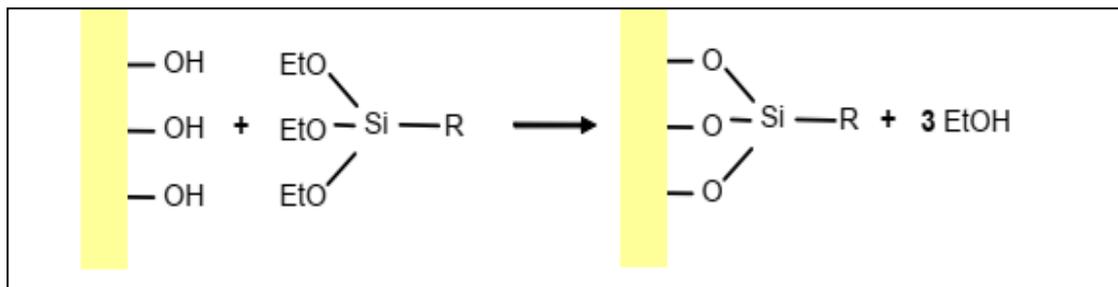


Figure 1.10 Schéma d'une réaction de silanisation. Les silanols en surface réagissent avec un organosilane trifonctionnel où EtO est le groupement fonctionnel pouvant réagir avec les silanols et R le groupement organique à fixer [24].

Trois types d'organosilanes peuvent être utilisés: mono-, di- et trifonctionnels qui possèdent respectivement un, deux et trois groupement fonctionnels pouvant réagir avec les silanols présents sur la surface de silice. Les organosilanes monofonctionnels présentent l'avantage de ne se greffer que sous la forme d'une monocouche. Cependant, leur réactivité est faible et ne permet pas d'obtenir des couches denses. Les silanes di- et trifonctionnels sont plus réactifs. Par contre, ils peuvent se polymériser en solution (Figure 1.11) avant le greffage à la surface, ce qui peut générer la formation de multicouches où l'accessibilité aux fonctions réactives devient

Chapitre 1: Etat de l'art de la fonctionnalisation du silicium

plus limitée. Ce phénomène est considérablement réduit lorsque les silanes sont utilisés en milieu organique [24].

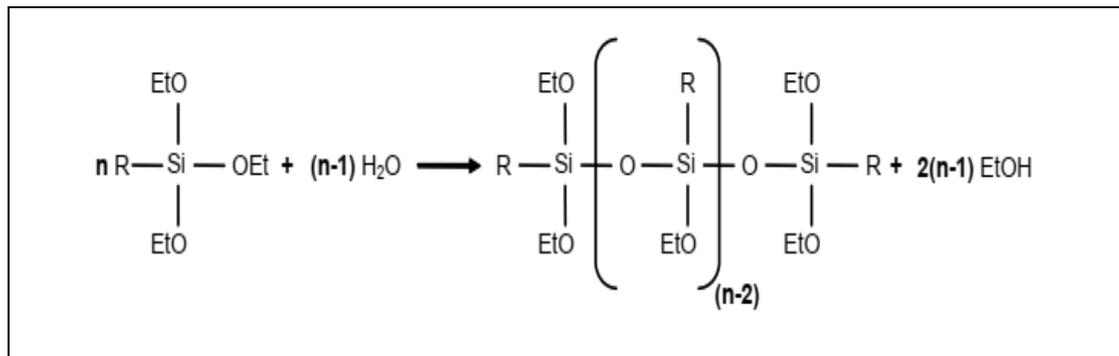


Figure 1.11 Polymérisation d'un organosilane trifonctionnel en présence de molécules d'eau [24].

1.2.3 Différentes formes de silanols

a) Silanisation type a

La figure 1.12 montre l'état de la surface silanisée selon le type a. Il apparaît clairement que ce type de silanisation produit une surface recouverte de façon inhomogène comme nous l'attendions et qu'il reste de nombreux endroits nus sans silane. Ceci s'ajoute à l'aspect de la surface à l'œil nu juste après le traitement: la plaque est transparente et lisse comme s'il n'y avait eu aucune modification [25].

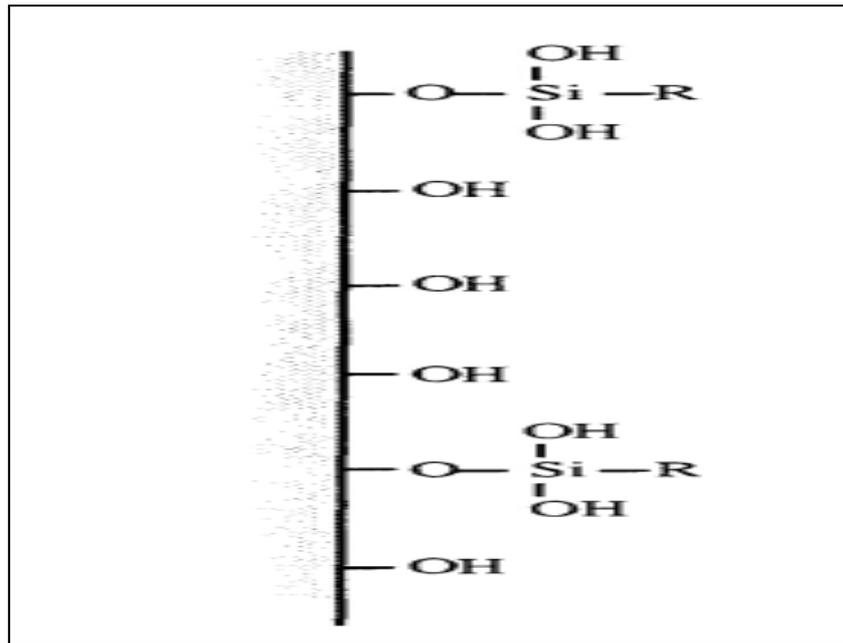


Figure 1.12 Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption purement exponentielle, Silanisation type a [25].

b) Silanisation type e

La figure 1.13 montre l'état de la surface silanisée selon le type e. Lorsque la plaque silanisée est lavée au toluène et à l'acétone, la surface apparaît granuleuse à l'œil nu, recouverte de fines particules blanches qui ne sont pas éliminées au lavage. Ceci laisse présager, bien avant l'analyse, une surface formée d'un film polymère multicouches. L'analyse de l'image révèle la présence de globules polymères larges et dispersés dont les dimensions sont variables (axe long de 5 à 15 μm et axe court de 2 à 5 μm) [25].

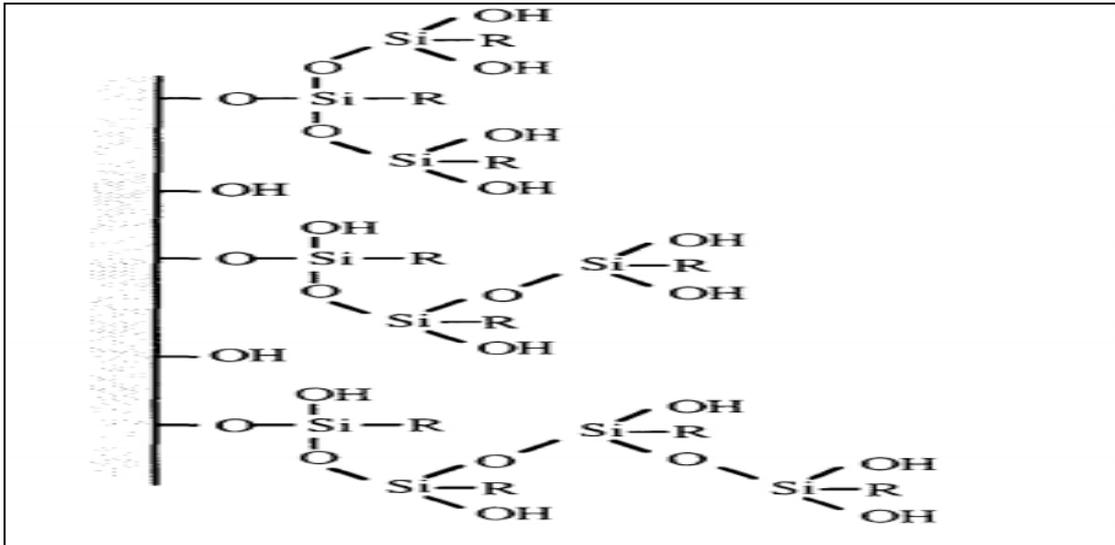


Figure 1.13 Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption purement exponentielle, Silanisation type e [25].

c) Silanisation type ha

La figure (1.14) montre l'état de la surface après silanisation selon le type ha. A l'œil nu, la plaque présente un voile blanchâtre. Comme nous l'attendions, la silanisation ha est associée à une surface contenant de petits globules de polymères dispersés de façon homogène et de taille plus réduite (jusqu'à 3 μm de diamètre) [25].

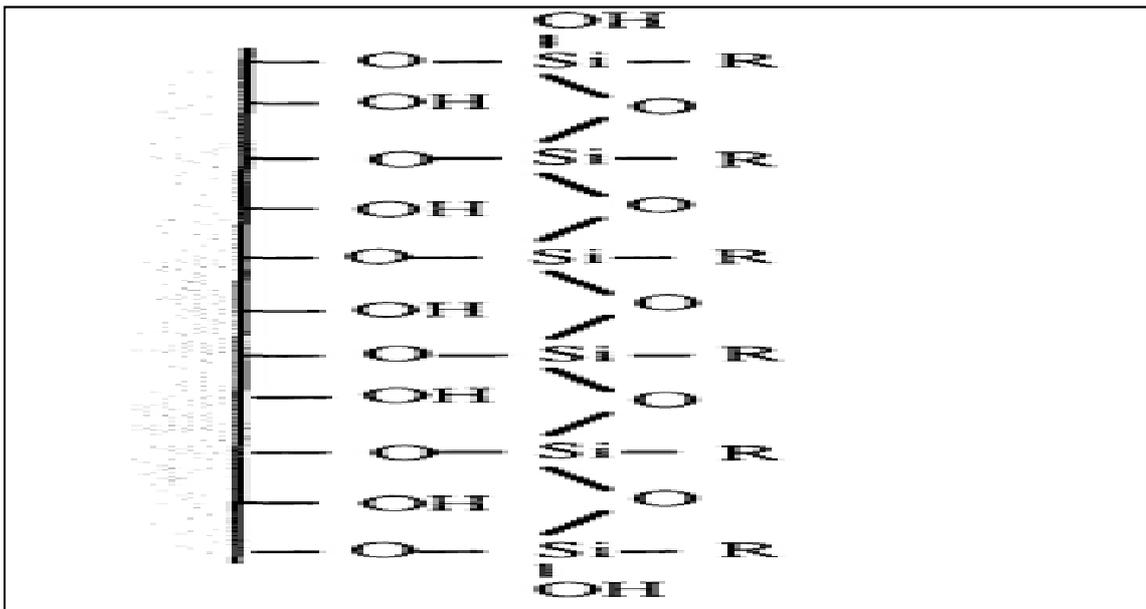


Figure 1.14 Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption purement exponentielle, Silanisation type ha [25].

d) Silanisation type C1a

La surface présente une homogénéité comparable à celle observée dans le cas d'une silanisation de type ha (à l'œil nu) mais des globules beaucoup plus volumineux ne permettent pas de réaliser l'analyse par microscopie optique à champ proche, d'après l'étude faite. Ainsi, ils ont remarqué qu'à l'approche de la pointe sur la surface, les globules se déforment ce qui conduit à penser que le recouvrement de la surface n'est pas rigide mais est constitué d'un film polymère qui peut s'affaisser facilement. La présence de chlorure de para-toluène sulphonyle engendre certes une homogénéité de la surface mais ce catalyseur entraîne apparemment une trop forte réactivité des sites amines et conduit à des globules polymères qui se développent en dehors de la surface [25].

e) E- Silanisation type c2e

La figure 1.15 montre l'état de la surface après une silanisation de type c2e. L'aspect de la surface est intermédiaire entre une silanisation type (e) (même type de globules mais environ deux fois plus petits) et une silanisation type ha (distribution homogène). Ceci indique que:

- la présence d'eau engendre une formation de type polymère.
- le catalyseur inhibe légèrement ce phénomène et favorise l'ancrage en plusieurs points [25].

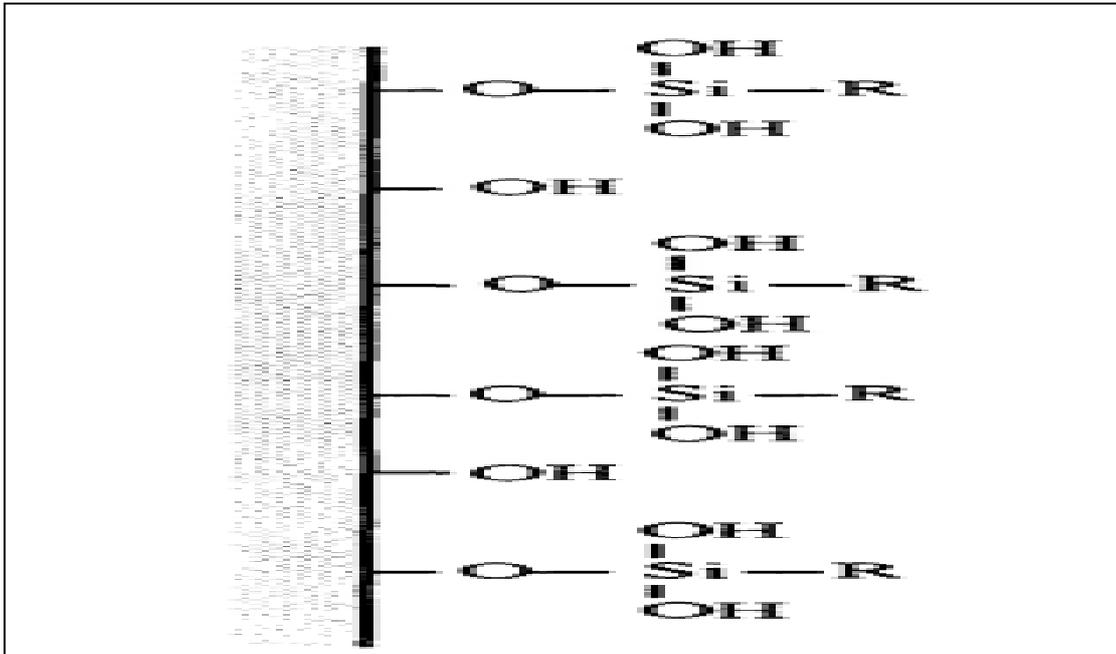


Figure 1.15 Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption purement exponentielle, Silanisation type c1, c2 [25].

1.3 Procédés de greffage des biomolécules sur la surface de silicium

1.3.1 Notion de greffage

Un greffage est une technique qui permet d'incorporer de nouvelles fonctions à une surface sans en modifier les propriétés intrinsèques. Ils existent deux voies pour réaliser un greffage: la voie chimique ou la voie physique. Les techniques de greffage, citées dans la littérature, sur différents types de polymères, sont nombreuses. Nous nous focalisant sur ceux réalisés par réaction radicalaire [26].

1.3.2 Types de molécules greffées sur la surface de silicium

a) Les biomolécules

La biomolécule est une molécule qui participe au processus métabolique et à l'entretien d'un organisme vivant, par exemple les glucides, les lipides, les protéines, et les acides nucléiques. On parle aussi de biomolécules pour des molécules identiques à celles trouvées dans le vivant, mais obtenues par d'autres moyens, par exemple dans les conditions qui prévalent dans l'espace (thème de l'exobiologie) ou dans des processus purement géophysiques. Les molécules de grande taille peuvent

Chapitre 1: Etat de l'art de la fonctionnalisation du silicium

être appelées macromolécules [27]. Les biomolécules utilisées pour la réalisation d'un biocapteur sont des protéines biologiquement actives qui doivent être immobilisées sur les transducteurs pour assurer un contact intime nécessaire pour obtenir une réponse du transducteur [24].

b) Les différents types des biomolécules

Plusieurs entités biologiques ont été utilisées pour l'élaboration d'une grande variété de capteurs biologiques.

- **Les enzymes**

Les biocapteurs à enzymes utilisent des enzymes spécifiques pour la capture et la génération catalytique d'un produit qui est alors directement mesuré grâce à une large gamme de transducteurs (électrochimiques, optiques, thermiques, ampérométriques, acoustiques...). Ce type de biocapteurs a été souvent utilisé pour la quantification de contaminants tels que les pesticides, herbicides ou antibiotiques [15].

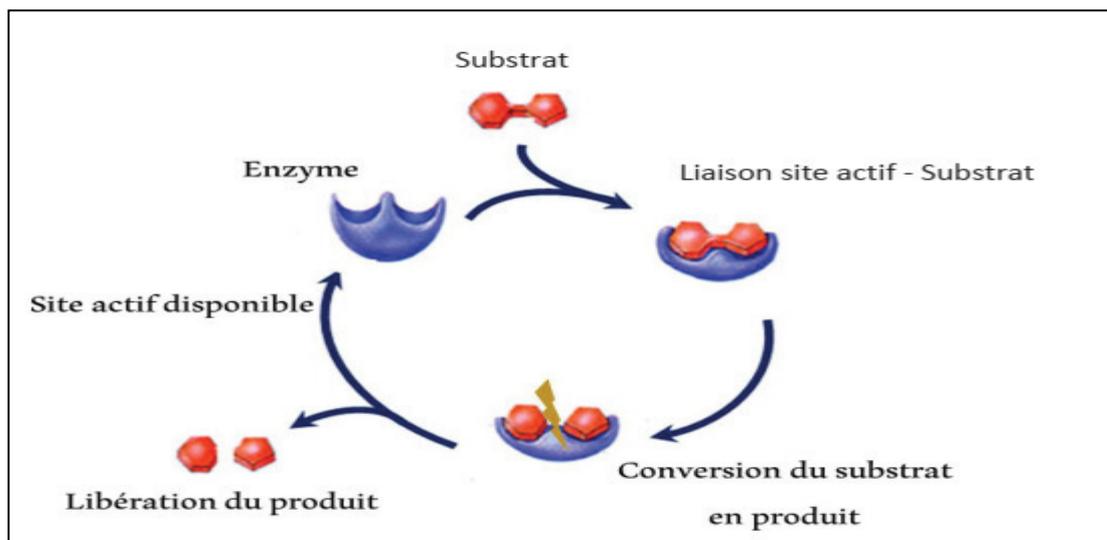


Figure 1.16 Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique [28].

- **Les anticorps**

Un immunocapteur est un biocapteur qui utilise des anticorps comme ligand biologique. Les transducteurs les plus couramment utilisés sont essentiellement de type optique, électrochimique ou piézoélectrique [15].

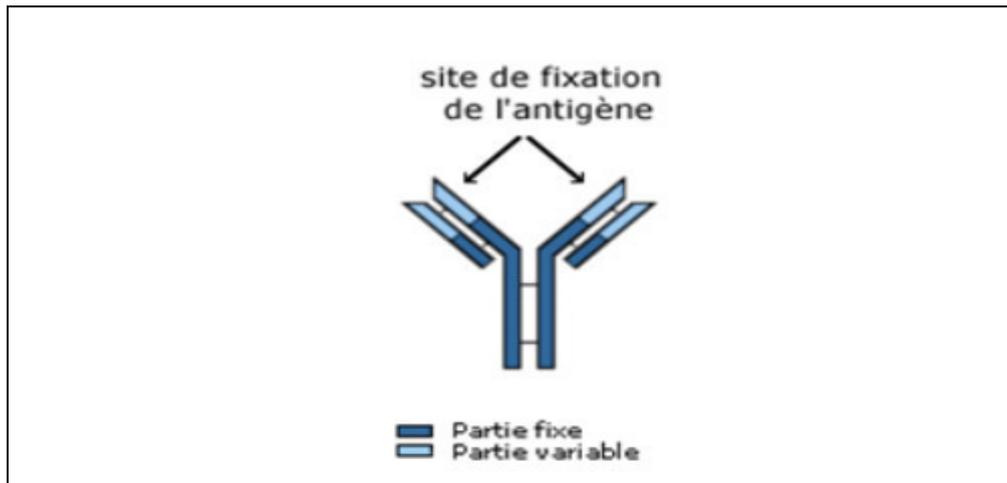


Figure 1.17 La structure schématique d'une molécule anticorps [29].

c) Les microbes

Les biocapteurs microbiens, largement utilisés pour quantifier les contaminants chimiques environnementaux, utilisent des cellules microbiennes viables telles que les bactéries et les levures [15].

d) Les bactéries

Les bactéries constituent un matériel biologique intéressant pour la conception d'un biocapteur. En effet, elles vivent dans quasiment tous les environnements naturels, sont faciles à manipuler et constituent un réservoir d'enzymes en grande partie inexploré. Un grand avantage de l'utilisation des bactéries est qu'elles peuvent rapidement être produites en grande quantité et à moindre coût. Leur réponse à tout changement du milieu est rapide, ce qui en fait de bons indicateurs de perturbation de leur environnement, Briscoe et al. 1996 [30].

Titre d'exemple: la bactérie **Escherichia Coli** utilisé comme biorécepteur pour la détection des métaux lourds, en utilisant leurs effets physiologiques [31].

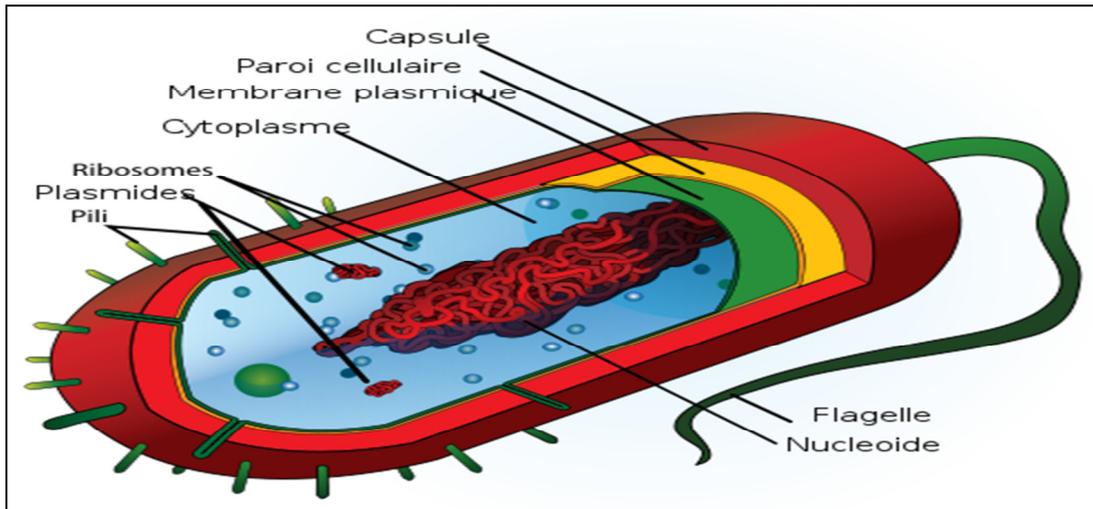


Figure 1.18 Structure d'une cellule bactérienne [31].

e) L'ADN

Les capteurs ADN ou biopuces utilisent comme ligand l'acide désoxyribonucléique [32].

Outre les enzymes, les anticorps et les cellules, de nouvelles molécules sont apparues récemment [33] :

- ✓ **Les aptamères** qui sont des simples brins d'ADN ou d'ARN ayant une capacité à reconnaître différentes cibles, notamment des protéines, avec de fortes affinités et spécificité. Ils sont faciles à immobiliser à la surface d'un biocapteur et peuvent être synthétisés de façon reproductible et en grande quantité.
- ✓ **Les lipocalines** qui constituent une famille de protéines permettant le stockage ou le transport de composés organiques hydrophobes ou chimiquement sensibles.

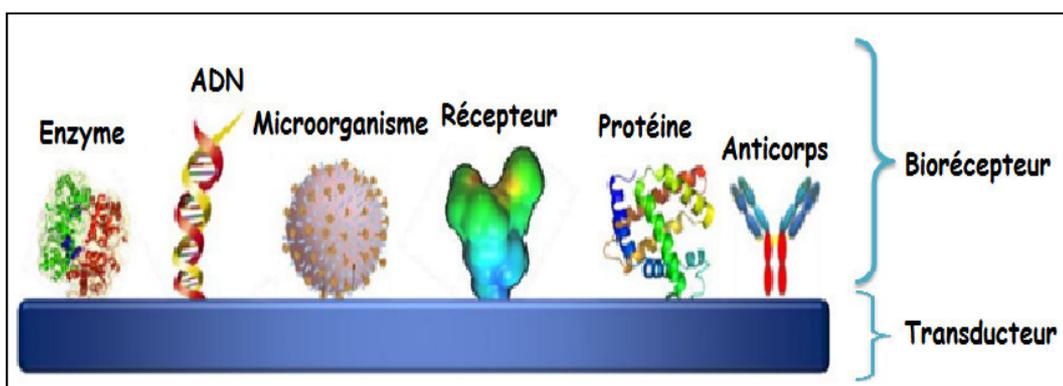


Figure 1.19 Représentation schématique des différents bio-récepteurs [33].

Chapitre 1: Etat de l'art de la fonctionnalisation du silicium

Ligand	Substances Liées
Enzymes	Substrat, (gamme très large), inhibiteurs
Immunoglobulines	Grande variété de molécules de toutes tailles (antigènes, toxines, haptènes...)
Lécithines, ou autres protéines spécifiques	Oligosaccharides
Récepteurs	Hormones, toxines, neurotransmetteurs, drogues
Avidine	Biotine
Protéine A	IgG, IgM, IgA
ADN	ADN, ARN

Tableau 1.1 Catégories de biomolécules douées de propriétés de reconnaissance [24].

1.3.3 Procédés de greffage organique sur silicium

Le premier exemple de monocouche organique greffée par une liaison covalente Si-C sur une surface de silicium hydrogénée a été obtenu par Chidsey et al. [19] dans les années 1990. Le greffage est obtenu par l'établissement d'une liaison covalente silicium-carbone à partir de la réaction d'une espèce chimique sur une surface de silicium hydrogénée. Différentes méthodes de greffage peuvent être mises en œuvre pour la préparation des surfaces greffées [17, 34,35 ,36].

Chapitre 1: Etat de l'art de la fonctionnalisation du silicium

a) Les procédés chimiques

D'après l'expérience réalisée par Chidsey et al. [19], le greffage a été réalisé à partir d'un précurseur alcène en présence d'un initiateur radicalaire (peroxyde de di-acyle) à 100°C pendant 1 heure [4].

b) Les procédés électrochimiques

Le silicium utilisé dans les greffages électrochimiques sera de préférence faiblement résistif pour assurer un greffage homogène des surfaces. Il n'aurait lieu qu'au voisinage du contact électrique dans le cas d'un silicium hautement résistif. La liaison covalente Si-C se forme par réaction électrochimique entre une surface fraîchement hydrogénée et un organomagnésien. Une grande vigilance est à respecter pour neutraliser en toute sécurité, par ajout goutte à goutte d'éthanol sous la hotte, les solutions utilisées contenant le magnésien encore très réactif à la sortie de la boîte à gants [4].

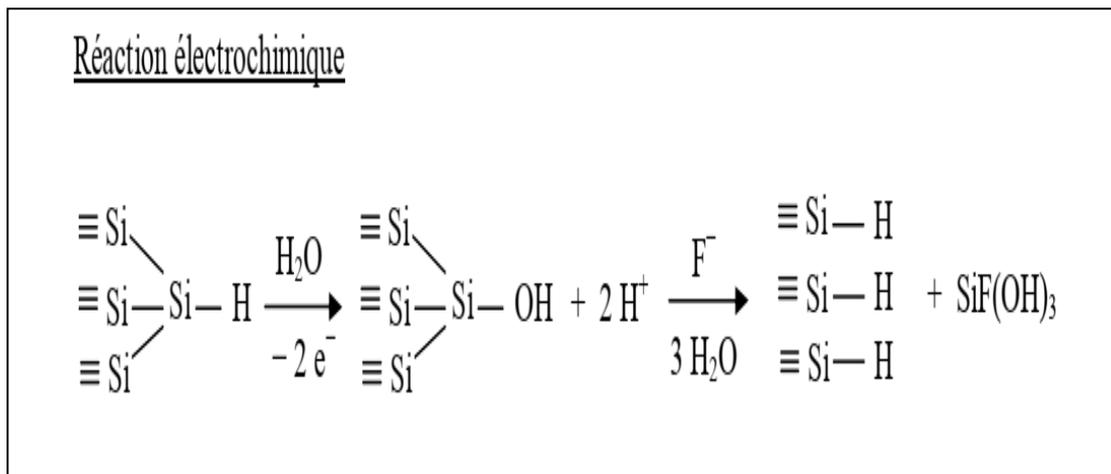


Figure 1.20 Mécanisme de dissolution du silicium: composantes électrochimiques [1].

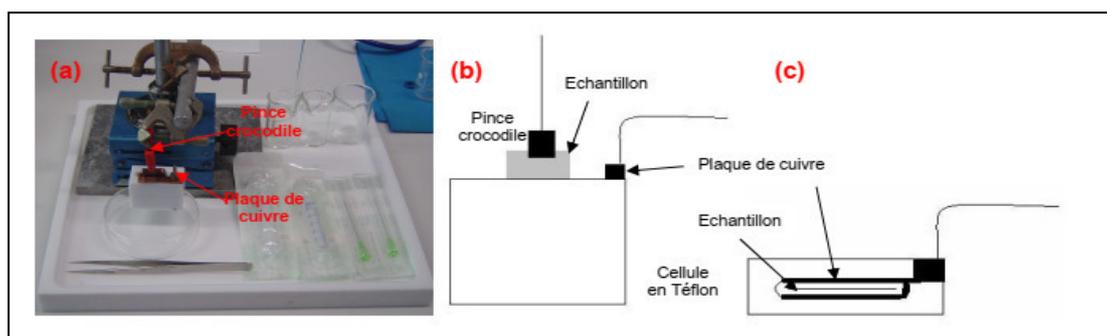


Figure 1.21 Plateau en téflon contenant le matériel nécessaire au greffage électrochimique (a) Schémas de la cellule dans laquelle a eu lieu le greffage électrochimique, vue de côté (b) et vue de dessus (c) [4].

c) Les procédés photochimiques: hydrosilylation photochimique

Par analogie à la chimie organique et organométallique, une irradiation UV peut initier l'hydrosilylation d'un composé insaturé par clivage homolytique d'une liaison Si-H. Le groupe de Chidsey a montré que l'irradiation UV (185 et 253,7 nm) d'une surface de silicium terminée hydrogène, pendant 2h, à température ambiante, en présence d'alcènes aliphatiques, conduit au greffage de chaînes alkyles [38]. Il a été montré plus tard que l'irradiation d'une surface hydrogénée à des longueurs d'onde plus élevées (supérieures à 385 nm), en présence d'alcènes, conduit également à une monocouche alkyle, mais l'irradiation doit être prolongée pendant 20 à 24 h, en chauffant la solution à 50°C [39]. L'avantage principal de ces réactions initiées par voie photochimique est l'absence de chauffage. Le mécanisme est semblable à celui proposé dans le cas de la réaction initiée par un radical [1]

1.4 Conclusion

D'après l'étude approfondie que nous avons faite dans le domaine des biocapteurs, en s'appuyant sur une littérature riche et variée, nous avons pu acquérir une compréhension du fonctionnement de ces composants qui ne cessent de se développer. En effet, avec la technologie innovante des semi-conducteurs, il s'est avéré que le silicium est un très bon candidat quant à la conception des transducteurs dédiés à la reconnaissance biologique grâce à ses propriétés facilitant le traitement que se soit chimique ou physique de sa surface. Dans cette optique, maintes domaines se sont fortement intéressés à ce matériau, pour y introduire des fonctions, qui jusque là n'étaient pas encore possibles.

Chapitre 2
décontamination et
silanisation des substrats
de silicium

Chapitre 2 : Décontamination et silanisation des substrats de silicium

La surface de silicium est toujours contaminée par différents polluants, les contaminations organiques (huiles, graisse, etc....) et les composés métalliques (oxydes, carbures, etc....) dont il s'agira d'éliminer afin de conférer à l'interface hydrophile obtenue l'aspect souhaité. Cette contamination a commencé à disparaître en raison de la découverte de différentes techniques de nettoyages dans les années 1970.

Ce chapitre se consacre à la description de certaines méthodes de nettoyage et de décapage physico-chimiques des surfaces de silicium pour éliminer toutes les contaminations présentes sur ces surfaces. Vient ensuite, la phase de silanisation qui implique l'utilisation des alcoxysilanes organofonctionnels dont nous citerons quelques types. Nous achèverons ce chapitre par citer l'étape de caractérisation, une étape critique dont dépend la réussite des différentes constructions de couches qui viendront par la suite.

2.1 Notion de contamination

La contamination affecte directement les rendements de production et la fiabilité des composants. Les contaminants présents peuvent être classés en trois catégories: les particules, les impuretés métalliques et les impuretés organiques. Ils peuvent être de nature moléculaire, ionique ou atomique [40].

2.1.1 Types de contaminants

a) Contamination Particulaire

Le mot particule désigne ici des corps d'origine organique (cendre, fumée...) ou minérale (silice,...) de petite taille ($< 100 \mu\text{m}$ pour les poussières), soit en suspension dans l'air (aérosols), dans l'eau ou dans les produits chimiques utilisés, soit au repos sur les surfaces des équipements (pinces, récipients, machines,...) [40].

Les particules peuvent adhérer particulièrement à la surface du silicium selon plusieurs mécanismes:

- Interaction entre particules chargées.
- Interaction entre particules neutres.
- Interaction entre couches électrisées.
- Liaison chimique entre la particule et la surface du silicium.

Chapitre 2 : Décontamination et silanisation des substrats de silicium

b) Contamination métallique

L'implantation ionique, la gravure ionique réactive (RIE) et les solutions chimiques sont les principales sources de contamination métallique. Les impuretés les plus fréquentes sont : Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Au, Al, Cr... et la contamination apparaît à un niveau de 10^{10} atomes/cm² [40].

La précipitation des atomes métalliques sur la surface du silicium peut s'effectuer selon deux mécanismes [40]:

- ✚ Liaison directe sur la surface du silicium par échange entre un ion métallique et un atome d'hydrogène 'terminal' (qui sature les liaisons pendantes à la surface du silicium). Ces impuretés sont très difficiles à enlever.
- ✚ Oxydation de la surface et inclusion d'impuretés métalliques dans cet oxyde (exemple Al, Cr, Fe...). Ces impuretés s'enlèvent avec la couche d'oxyde (en utilisant de l'HF dilué par exemple).

c) Contamination organique

Principalement due aux résidus de résines (photoresist), elle peut aussi avoir pour source les vapeurs organiques, l'air ambiant et les récipients de stockage [40].

2.1.2 Sources de contamination

La contamination présente lors de l'élaboration des circuits intégrés peut avoir deux origines : elle peut directement résulter de l'environnement dans lequel sont manipulées les substrats échantillons ou venir des procédés de fabrication eux-mêmes [41].

a) L'environnement

Malgré l'amélioration constante des protocoles de propreté dans les unités de production, une pollution résiduelle peut toujours être présente durant les cycles de fabrication. La généralisation des stockages et des manipulations de substrats en milieux confinés tend à minimiser ces risques. Aujourd'hui, l'environnement ne participe que très modestement à la pollution particulière observée [41].

b) Les procédés de fabrication

Ce sont les procédés de fabrication, eux-mêmes, qui sont responsables de la majeure partie de la contamination [42]. Après chaque procédé, l'enlèvement des

Chapitre 2 : Décontamination et silanisation des substrats de silicium

résidus des résines photosensibles (par exemple dans les techniques photolithographiques) est également un problème récurrent. Les étapes de polissage (principalement en back-end) laissent également de hauts niveaux de particules et de contamination métallique [43].

De manière générale, les procédés humides s'accompagnent d'un risque de dépôt de particules, de métaux, et d'espèces non volatiles. L'origine peut être la pollution accidentelle des bains mais c'est souvent l'imperfection du rinçage qui est à l'origine de cette pollution [41].

2.1.3 Effet des contaminants

Les effets néfastes des contaminants dans la technologie des composants sont répertoriés comme suit :

a) Effet des métaux

Les métaux reconnus les plus dangereux pour les oxydes de grille sont dans l'ordre: le calcium, le fer et l'aluminium. Néanmoins, des concentrations surfaciques relativement importantes sont nécessaires pour pouvoir mesurer les premières dégradations y compris pour des oxydes d'épaisseur inférieure à 5 nm selon OHMI et al. [44]. Le calcium peut générer de la rugosité à l'interface silicium/oxyde, le fer ségrégue à l'interface, l'aluminium reste en surface de l'oxyde et modifie la cinétique d'oxydation.

b) Effet des composés organiques

Les composés organiques affectent également les performances intrinsèques des oxydes en particulier lorsque ceux-ci sont réalisés directement sur le silicium sans oxyde chimique (dépôt de composés organiques après nettoyage HF (enlèvement de la couche d'oxyde natif) [45]. La formation de carbure de silicium est une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène.

c) Effet des anions

L'effet des anions tels que les sulfates, nitrates, phosphores, est encore assez mal connu. On citera le cas du brome [46], qui, en concentration très importante dans l'acide chlorhydrique (10 ppm), génère des claquages extrinsèques dans les oxydes.

d) Effet de la rugosité

Des simulations numériques permettent d'attribuer cet effet aux « grands pics » (>1nm) de la rugosité qui augmentent localement le champ électrique dans l'oxyde, pouvant conduire jusqu'à sa destruction selon Tardif et al. [46]. Cet effet a été vérifié expérimentalement en générant volontairement des pics de silicium dans un bain d'HF non dégazé (attaque par l'oxygène).

2.2 Techniques de préparation des substrats de silicium

2.2.1 Nettoyage des surfaces

Le nettoyage est une étape d'une gamme de transformations conférant à la surface traitée un état nécessaire et suffisant pour garantir la qualité du stade suivant et par là-même, du produit fini [47]. Le nettoyage des substrats devient de plus en plus critique. Pour cette raison, le nettoyage et la préparation des surfaces font parties des secteurs les plus dynamiques de l'industrie des semi-conducteurs. Le nettoyage des substrats est l'une des étapes les plus importantes pour la production de circuits intégrés (la microélectronique) [41].

a) Méthode RCA

Le procédé de nettoyage dit RCA parce que développé dans les laboratoires de la "Radio Company of America" (procédé mis au point en 1960 par Kern et Puotinen et publié en 1970) est toujours le plus couramment employé. Il se décompose en trois phases qui correspondent aux actions de trois solutions chimiques [40]:

- **Oxydation en milieu basique (SC1)**

La solution SC1 (Standard Cleaning 1) comprenant de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) ou ammoniaque et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou eau oxygénée. Le nettoyage SC1 est essentiellement utilisé pour le retrait particulaire par mécanisme de gravure. Pour les particules (organiques et inorganiques) SC1 a une double action d'oxydation (avec H_2O_2) et de répulsion (avec l'ion OH^- de NH_4^+ , OH^- qui charge négativement la surface du wafer et les particules). Plus le pH est élevé et plus faible sera le nombre de particules à se déposer à la surface, c'est pourquoi SC1 est très efficace pour enlever les particules [40].

Chapitre 2 : Décontamination et silanisation des substrats de silicium

- **Oxydation en milieu acide (SC2)**

Le nettoyage SC2 (Standard Cleaning 2) est essentiellement utilisé pour enlever les contaminations métalliques. Il est composé d'acide chlorhydrique (HCl) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cette oxydation est plus forte en milieu acide qu'en milieu basique car l'eau oxygénée a besoin de protons H⁺ pour jouer son rôle d'oxydant [40].

NB : SC₁ et SC₂ ont la capacité d'enlever les impuretés métalliques de la surface de Si grâce au pouvoir oxydant de H₂O₂.

- **Désoxydation HF (avec l'acide fluorhydrique)**

La désoxydation des substrats de silicium engendre une passivation de surface par les liaisons H et O-H, dont les éléments sont fournis par l'eau et l'acide. En effet, lors du bain dans une solution d'acide fluorhydrique, la réaction suivante a lieu:



Cette réaction engendre le retrait de la couche de SiO₂ natif. Immédiatement après, les atomes d'hydrogène viennent combler les liaisons pendantes des atomes de silicium en surface. Il en résulte une diminution des défauts de surface du silicium [48]. Plusieurs types de liaisons entre le silicium et l'hydrogène sont possibles. Celles-ci dépendent de l'énergie disponible lors de la réaction chimique ainsi que de l'orientation cristalline du substrat silicium [49].

Les utilisations de cet acide sont multiples, en électronique, biologie ou chimie (nettoyage de surfaces, gravure, digestion des minéraux, coloration, synthèse...) [50]. Il permet d'éliminer, par dissolution, l'oxyde superficiel formé à la surface du silicium lors des oxydations avec SC1 et SC2 [40].

b) Variantes à RCA

Diverses méthodes sont aujourd'hui employées pour améliorer la qualité du nettoyage de la surface du Si. Beaucoup d'entre elles sont des variantes additionnelles de la méthode RCA [40].

- L'action des ultrasons avec SC1 rend plus efficace l'élimination des particules (organiques et inorganiques); ce procédé permet aussi d'enlever la contamination par le Cu (par échange d'ions avec l'ammoniaque).

Chapitre 2 : Décontamination et silanisation des substrats de silicium

- En réduisant la proportion de NH_4OH dans SC1, le temps de nettoyage, la température de la solution, on réduit le temps d'attaque de la surface par NH_4OH et donc on améliore l'état de surface (surface moins rugueuse).
- Les matrices organiques sont plus efficacement éliminées lorsqu'on utilise de l'eau ultra pure dans laquelle on injecte de l'ozone: l'ozone (O_3) dissoute dans H_2O se décompose et devient un agent oxydant qui décompose les Matières organiques.
- Le mélange HF (ultra pur) et eau oxygénée est utilisé pour enlever l'oxyde natif et les métaux nobles (dans ce cas l'étape SC2 est supprimée).

2.2.2 Décapage

Le but de cette opération, est d'éliminer les produits de surface indésirables (en particulier les oxydes) [51].

a) Solution piranha

Le décapage chimique des échantillons silicium peut être réalisé par piranha. Une solution de Piranha est un mélange d'acide sulfurique (H_2SO_4) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), utilisé pour éliminer les résidus organiques des substrats. Les échantillons sont totalement immergés dans la solution acide pendant quelques minutes, le temps du décapage est considéré comme une fonction du degré de souillure de l'échantillon [52].

Le mélange piranha produit une réaction très exothermique (plus de 100°C). Son nom vient du fait qu'elle attaque rapidement tout ce qui est organique. La réaction peut s'emballer avec un apport trop grand de composés organiques, provoquant ainsi d'immenses quantités de chaleur et de gaz, et pouvant entraîner une explosion.

2.2.3 Importance du décapage de la surface de silicium

Le décapage des surfaces de silicium permet l'obtention de surfaces riches en groupements hydroxyles (OH). Un groupement hydroxyle est un groupement de chimie organique constitué d'un atome d'oxygène et d'un atome d'hydrogène. Il caractérise, associé à une chaîne carbonée aliphatique, les différents alcools et placé sur un cycle aromatique les phénols. Il est aussi présent dans les très nombreux composés dits hydroxylés [53].

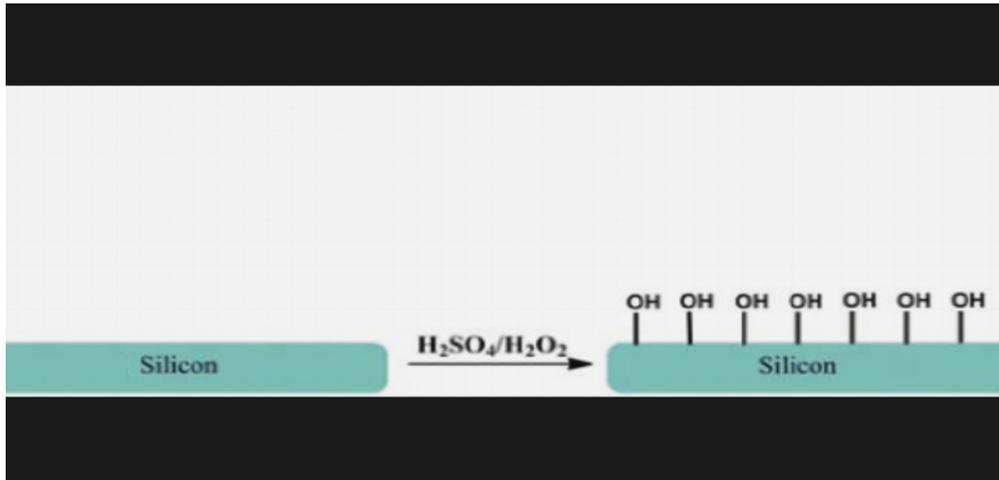


Figure 2.1 une surface hydroxylée de silicium.

Etant donné que les surfaces de verre, de silicium, d'alumine, d'oxyde de titane et de quartz, ainsi que d'autres surfaces d'oxyde métallique, sont riches en groupements hydroxyles. Une surface hydroxylée est une condition fondamentale pour réussir la silanisation [54].

2.3 Silanisation

2.3.1 Notion de silanisation

La silanisation de surface, est une méthode fréquemment utilisée pour modifier la surface d'un substrat en assurant une liaison forte substrat/molécule [55]. La silanisation est le revêtement d'une surface avec des molécules d'alcoxysilane organofonctionnelles. Les composants minéraux tels que le verre et les surfaces d'oxydes métalliques peuvent tous être silanisés, car ils contiennent des groupements hydroxyles qui attaquent et déplacent les groupes alcoxy sur le silane, formant ainsi une liaison covalente Si-O-Si dite siloxane.

La silanisation a donc pour objectif de former des liaisons aux interfaces entre les composants minéraux et les composants organiques [56]. Les alcoxysilanes organofonctionnels sont classés en fonction de leurs fonctions organiques.

2.3.2 Quelques types d'alkoxysilanes

a) Les aminosilanes

La fonction organique est une amine primaire ou secondaire:

- ❖ APTES (3-aminopropyl)-triéthoxysilane N° CAS 919-30-2 [56].

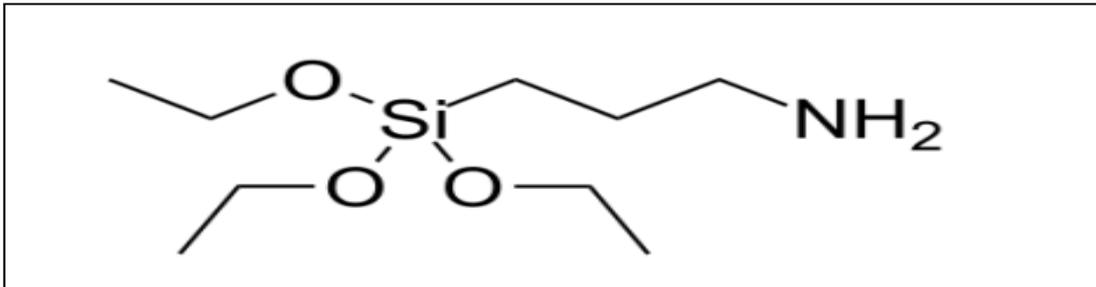


Figure 2.2 Formule développée de (3-aminopropyl)-triéthoxysilane (APTES).

- ❖ APDEMS (3-aminopropyl)-diéthoxyméthylsilane N° CAS 3179-76-8 [56].

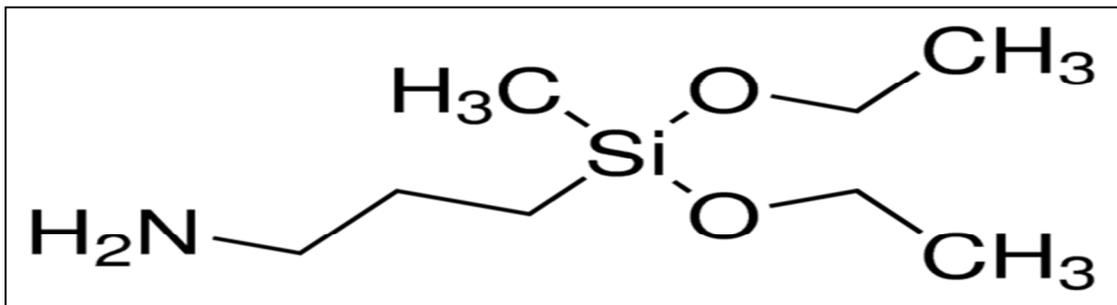


Figure 2.3 Formule développée de (3-aminopropyl)-diéthoxyméthylsilane.

- ❖ APDMES (3-aminopropyl)-diméthyléthoxysilane N° CAS 2031-62-1 [56].

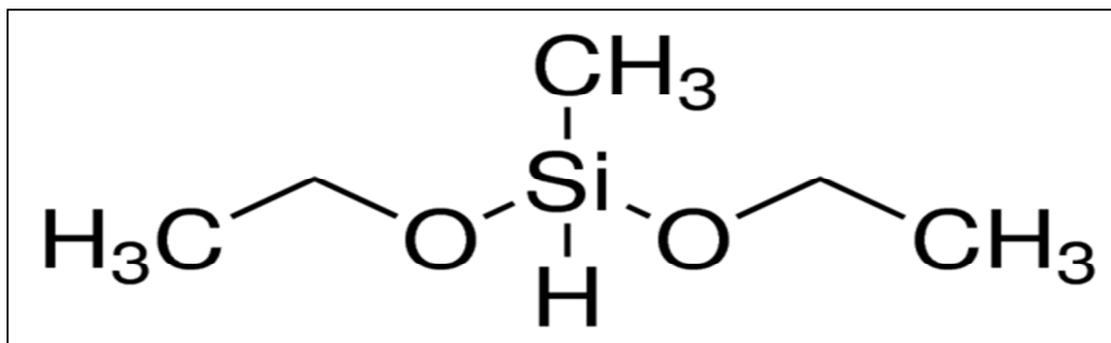


Figure 2.4 Formule développée de (3-aminopropyl)-diméthyléthoxysilane.

❖ APTMS (3-aminopropyl)-triméthoxysilane N° CAS 13822-56-5 [56].

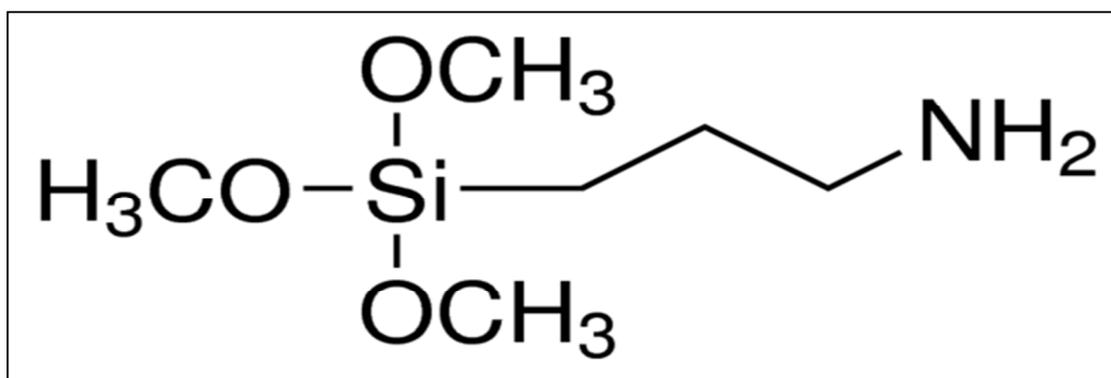


Figure 2.5 Formule développée de (3-aminopropyl)-triméthoxysilane.

b) Glycidoxysilanes

La fonction organique est un époxyde:

❖ GPMES (3-glycidoxypropyl)-diméthyléthoxysilane N° CAS 2602-34-8 [56].

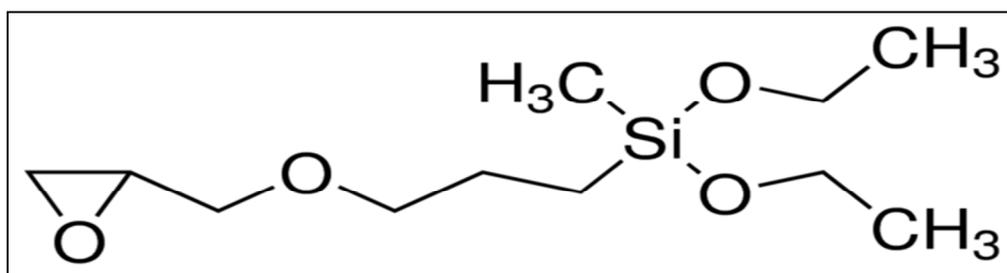


Figure 2.6 Formule développée de (3-glycidoxypropyl)-diméthyléthoxysilane.

c) Mercaptosilanes

La fonction organique est un thiol:

- ❖ **MPTMS** (3-mercaptopropyl)-triméthoxysilane N° CAS 4420-74-0 [56].

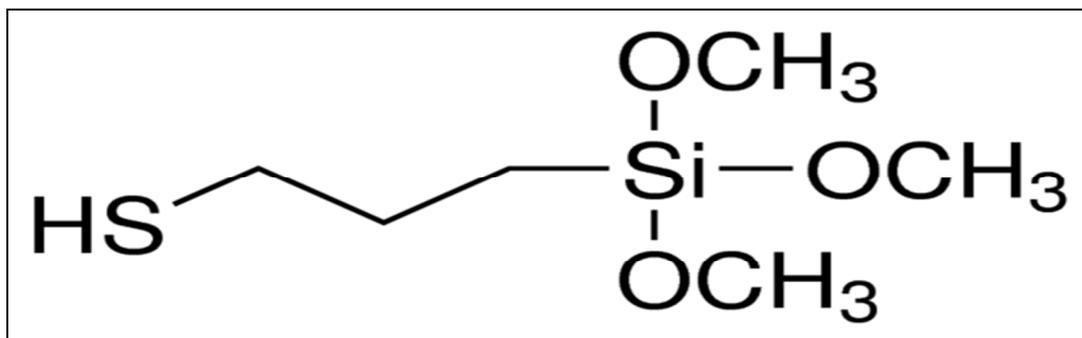


Figure 2.7 Formule développée de (3-mercaptopropyl)-triméthoxysilane.

- ❖ **MPDMS** (3-mercaptopropyl)-méthyl diméthoxysilane N° CAS 31001-77-1 [56].

NB : même figure 2.7.

2.3.3 Processus de silanisation à l'APTES

L'APTES comporte trois branches éthoxyle alors qu'il n'y en a que deux dans l'APDEMS (l'autre groupement étant une fonction méthyle) et une seule dans l'APDMES (les deux autres groupements étant des fonctions méthyles). Cette différence de fonctionnalité peut impliquer une variation de la réactivité de ces molécules vis-à-vis des sites OH de la surface d'un substrat [57].

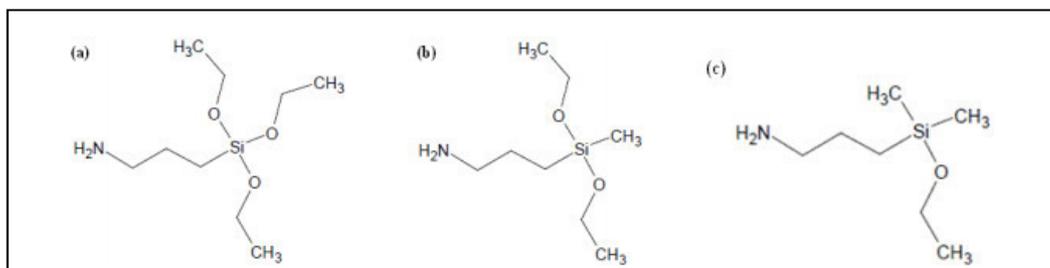


Figure 2.8 Représentation des molécules de (a) (3-aminopropyl)-triéthoxysilane (APTES), (b) (3-aminopropyl)-diéthoxyméthylsilane (APDEMS) et (c) (3-aminopropyl)-diméthyléthoxysilane (APDMES) [57].

Chapitre 2 : Décontamination et silanisation des substrats de silicium

Le silane choisi est le (3-aminopropyl)-triéthoxysilane (APTES) en raison de sa facilité de mise en œuvre (forme liquide) et de son utilisation importante dans l'industrie. Il comporte trois groupes réactifs éthoxy et une chaîne propyle ayant à son extrémité une fonction amine (Figure 2.9) [58].

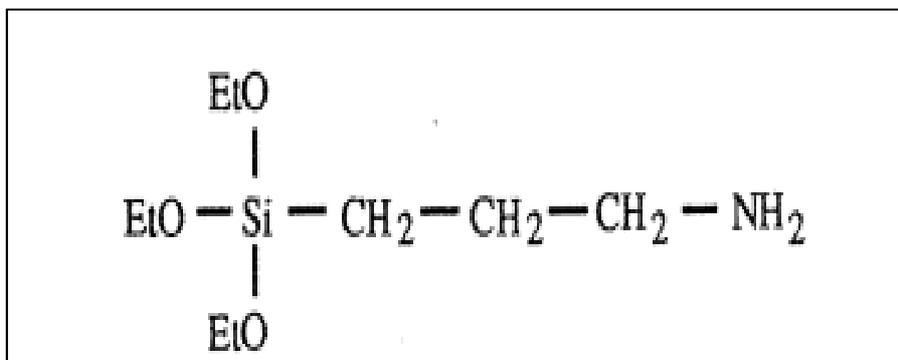


Figure 2.9 Formule chimique du (3-aminopropyl)-triéthoxysilane (APTES) [58].

La liaison obtenue avec les groupes -OH de la surface est une liaison de type siloxane avec départ d'éthanol. En absence totale d'eau, un seul éthoxy réagit avec un seul silanol selon le schéma réactionnel suivant [58] :

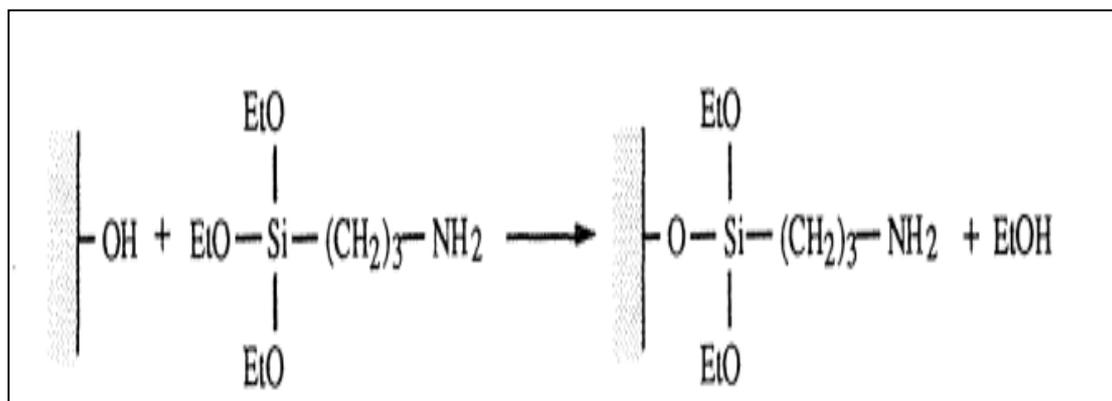


Figure 2.10 Schéma réactionnel de la silanisation avec l'APTES [58].

2.4 Caractérisation du silicium après traitement au silane

2.4.1 Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Dans la phase de validation du greffage des molécules de silane, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la caractérisation par spectroscopie infrarouge. Cette méthode très efficace quant à l'identification des différentes bandes d'absorption, en général, après chaque greffage réalisé sur la surface du silicium.

Chapitre 2 : Décontamination et silanisation des substrats de silicium

D'après l'étude que nous avons faite, nous avons constaté une littérature riche en spectres infrarouges démontrant la réussite de la phase de silanisation grâce à l'apparition des bandes relatives aux groupements fonctionnels amines (NH_2). Parmi ces spectres, nous avons choisi de nous référer au spectre de la figure 2.11 dans le souci de bien observer les liaisons covalentes qui ont été établies entre la surface de silicium hydroxylée et les molécules de silane. En effet d'après la figure 2.11, les analyses FTIR des couches déposées révèlent la présence de la vibration d'élongation correspondant à l'amine primaire ($-\text{NH}_2$), au niveau des fréquences 3360 et 3240 cm^{-1} [59].

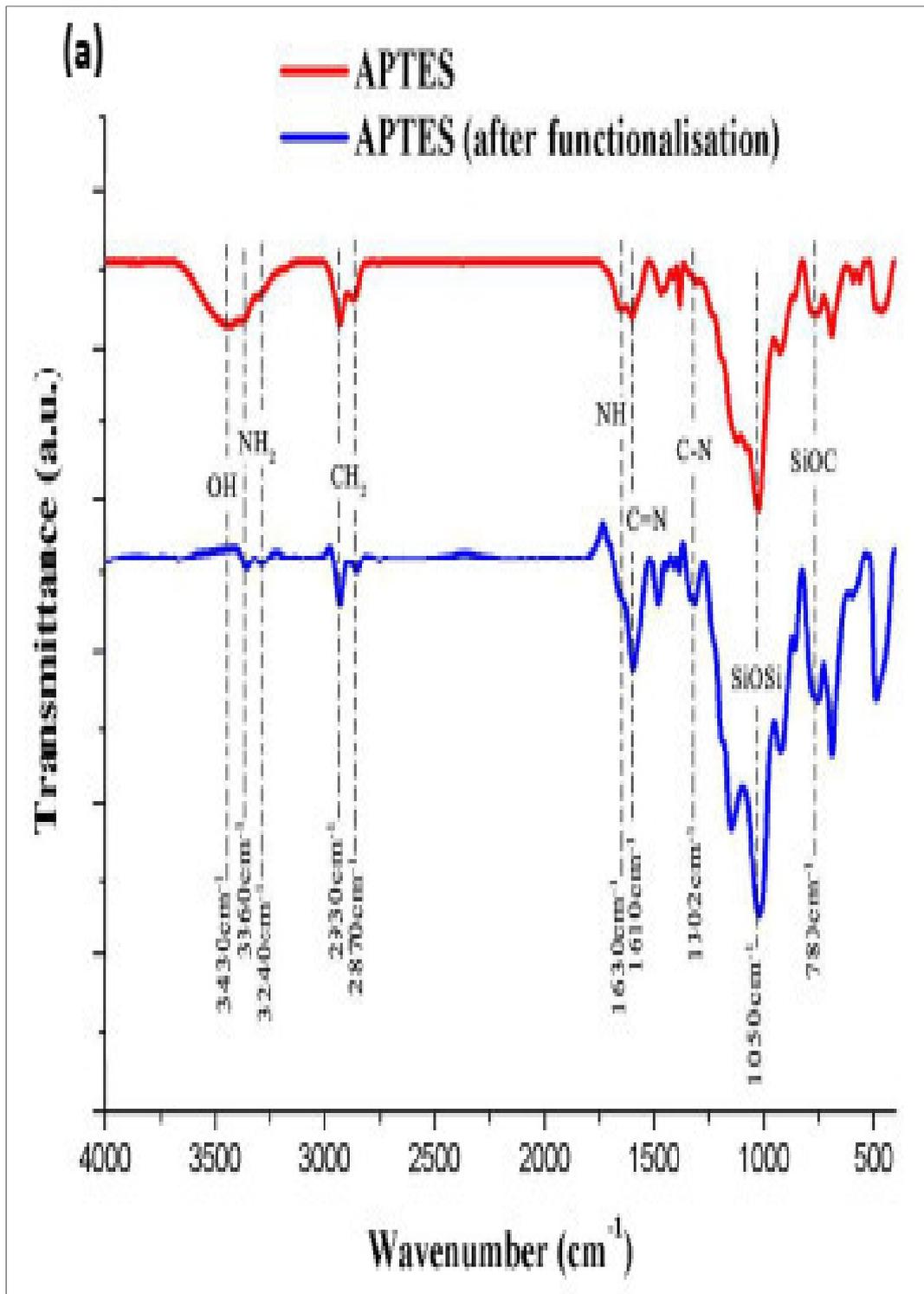


Figure 2.11: Spectres FTIR : APTES (spectre en rouge) et APTES après fonctionnalisation (spectre en bleu) [59].

2.4.2 Caractérisation par angle de contact du Silicium après greffage de l'APTES

Après le greffage de l'APTES sur silicium oxydé, l'angle de contact augmente généralement (peut atteindre 40°) [60], Figure 2.12 confirmant la transformation des fonctions OH en groupes NH_2 moins polaires. Les couches ainsi générées sont extrêmement compactes. Cela permet dans le cas de l'APTES d'apporter un grand nombre de fonctions amines disponibles pour une post-fonctionnalisation [60].

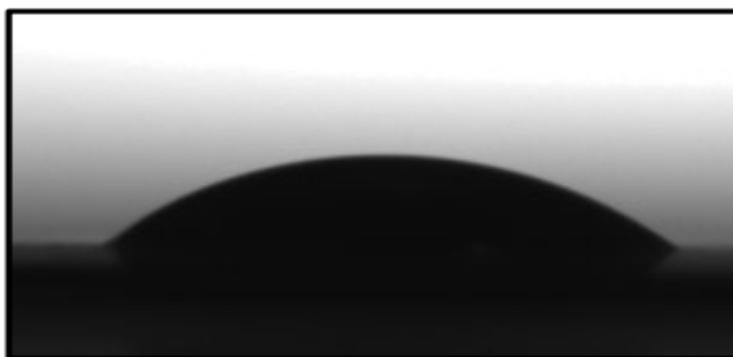


Figure 2.12 Photographie d'une goutte d'eau ($3\mu\text{L}$) déposée sur la surface du Si après greffage de l'APTES [60].

2.5 Conclusion

Dans ce chapitre, une étude de la phase de décontamination et de silanisation des surfaces de silicium a été faite. Ce chapitre comporte deux parties essentielles. Une première partie consacrée à l'étude des différentes sources de contamination des surfaces et des méthodes de nettoyage de ces contaminants et de décapage. En effet le nettoyage pré-greffage est un point clef dans la réussite du traitement qui sera envisagé par la suite, il conditionne l'état de l'interface avec la couche déposée par la suite.

La deuxième partie étudie le processus de silanisation des surfaces en citant les différents types d'organosilane. Nous avons achevé ce chapitre en citant des méthodes de caractérisation des surfaces traitées accompagnées d'exemples, extraits de la littérature, de caractérisation d'une surface de silicium par spectroscopie infrarouge et la caractérisation par angle de contact.

Chapitre 3

Biofonctionnalisation
d'une surface de silicium
immobilisation de la
molécule sonde

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

La biofonctionnalisation consiste à fixer des biomolécules sur une surface dans le but de contrôler les réponses cellulaires sur l'implant de façon plus spécifique. Ainsi de nombreuses équipes ont immobilisé des protéines ou séquences peptidiques à la surface de biomatériaux afin de favoriser l'adhésion spécifique des cellules [61]. Ainsi l'immobilisation des biomolécules sur la surface est une étape clé dans la fabrication d'un biocapteur (biopuce). En effet, la méthode d'immobilisation doit être efficace, reproductible, garantir une bonne homogénéité des plots, une densité de sondes élevée et surtout une immobilisation stable dans les conditions d'utilisation ultérieures. Selon les propriétés de la surface et des biomolécules, différents types d'interaction peuvent être mis en œuvre. Nous nous concentrerons ici sur les stratégies d'immobilisation par bio-affinité.

3.1 Définition

3.1.1 La biotine

La biotine est la vitamine H ou B8, sa masse molaire est de 244 Da [62]. Il s'agit d'une molécule bicyclique. Le premier cycle est un cycle tétrahydrothiophène, le second est un cycle imidazolidone (uréidique). Sur le premier cycle est greffé un acide valérique (Figure 3.1A) [63]. Elle présente trois centres de chiralité qui induisent une conformation spatiale *cis* entre les deux cycles et entre le cycle uréidique et l'acide valérique (Figure 3.1B).

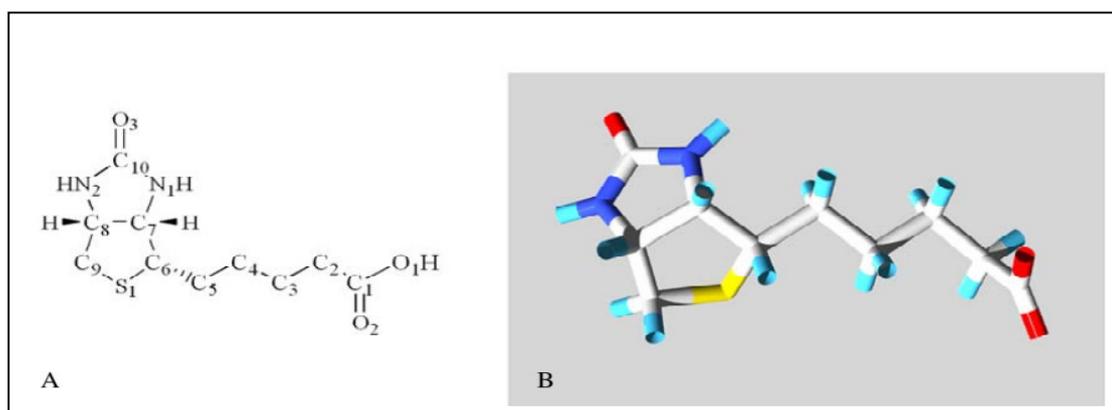


Figure 3.1 Structure de la biotine. **A.** Formule développée et numérotation des atomes. **B.** Structure tridimensionnelle [63].

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

3.1.2 L'avidine

Est une protéine présente dans le blanc d'œuf des oiseaux. C'est une protéine tétramérique dont la taille totale est estimée entre 66 et 69 kDa (Figure 3.2). Elle est thermolabile, c'est-à-dire qu'elle est dégradée par la chaleur. Elle peut se fixer à la vitamine B8 (biotine) [64].

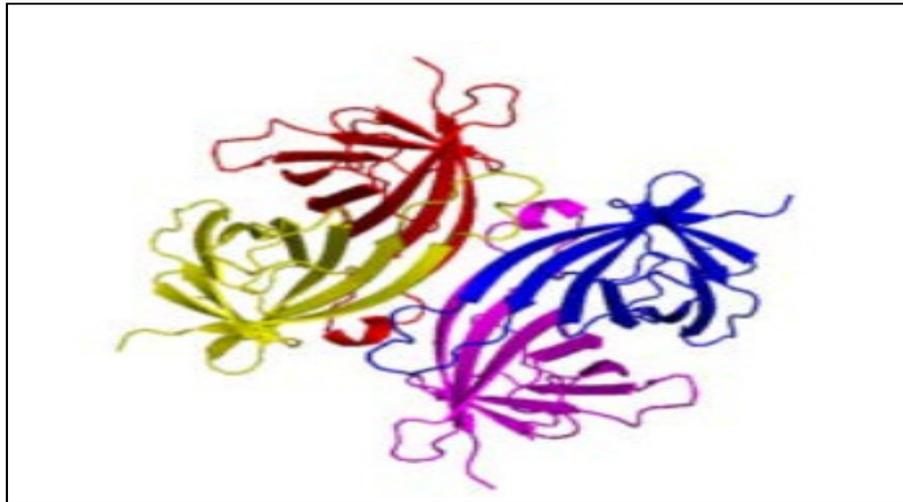


Figure 3.2 Structure de l'avidine [65].

3.1.3 Le complexe Biotine-avidine

Le couple biotine-avidine constitue ainsi un modèle idéal pour les études de bioconjugaison [65] en raison de sa très forte constante d'affinité ($K_a = 10^{15} M^{-1}$, contre généralement $10^9 M^{-1}$ pour les autres couples antigène/anticorps)

Les systèmes avidine-biotine ont souvent été utilisés comme systèmes d'assemblage par affinité pour le développement des biocapteurs. De tels systèmes peuvent être facilement utilisés en couplant un groupement avidine situé en position terminale sur un groupement amino-alkyle (biotine-NH₂) [66]. La biotine et l'avidine peuvent toutes deux être couplées à d'autres protéines ou marqueurs fluorescents sans perte d'affinité, ce qui représente un grand avantage, particulièrement pour l'immobilisation d'objets biologiques et la caractérisation des interactions [67].

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

3.2 Couplage des biomolécules sur le silicium silanisé

Généralement, les biomolécules utilisées pour la réalisation d'un biocapteur sont des protéines biologiquement actives qui doivent être immobilisées sur les transducteurs pour assurer un contact intime nécessaire pour obtenir une réponse du transducteur. Les qualités demandées à la couche biosensible (enzymatique) sont nombreuses:

- **Stabilité:** la capacité à conserver l'activité de l'enzyme pour un temps suffisamment long pour effectuer les analyses nécessaires;
- **Sélectivité:** l'aptitude de l'enzyme à reconnaître seulement un soluté défini;
- **Régénérabilité:** l'aptitude de l'enzyme à retrouver l'activité initiale après le cycle de mesure;
- **Sensibilité:** la capacité à déterminer la concentration nécessaire: elle est définie par le rapport entre le signal enregistré et la concentration mesurée;
- **De l'espace de reconnaissance:** la possibilité du soluté de passer facilement à travers la couche biosensible vers l'enzyme.

La conception d'un biocapteur nécessite l'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur. Les techniques d'immobilisation ont été développées pour l'immobilisation d'enzyme [68], mais elles sont applicables à d'autres protéines. Le choix de la technique d'immobilisation dépend aussi des conditions d'utilisation du capteur. Les critères déterminants ont été étudiés par Kumaran et Tian Minh [69]. Les enzymes peuvent être immobilisées par des méthodes chimiques et/ou physiques. Nous avons résumé les différentes méthodes d'immobilisation que l'on rencontre dans la littérature [69-70] sur la figure 3.3.

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

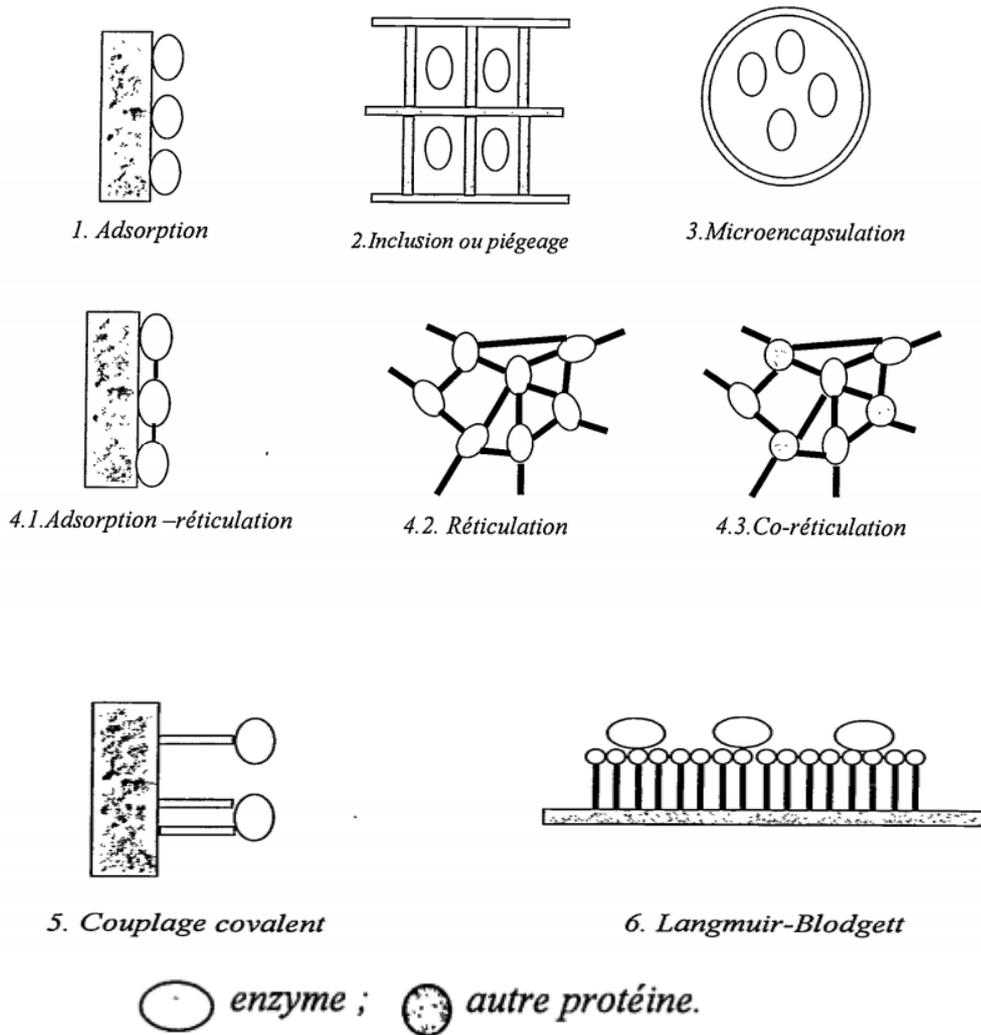


Figure 3.3 Différents modes d'immobilisation des enzymes.

L'immobilisation d'une enzyme sur un transducteur se traduit très fréquemment par un abaissement de l'activité de l'enzyme. Celui-ci résulte non seulement des conditions de mises en œuvre lors de l'étape d'immobilisation, mais également du micro-environnement de l'enzyme immobilisée au sein de la membrane. Les conditions locales de pH, les contraintes stériques locales qui peuvent induire une perte de flexibilité de la protéine ou une diminution de l'accessibilité du site actif peuvent ainsi conduire à cette baisse d'activité.

Les techniques d'immobilisation d'enzymes peuvent être classées en 6 catégories:

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

3.2.1 L'adsorption

L'adsorption est due à des interactions de type ionique, hydrophobe ou encore aux liaisons hydrogène entre l'enzyme et la surface du transducteur. Cette technique permet une immobilisation simple et non dénaturante de l'enzyme. Toutefois les enzymes ainsi immobilisées peuvent facilement se désorber sous l'action du pH ou de la force ionique. La stabilité et la durée d'utilisation des biocapteurs ainsi obtenus se trouvent diminuées. Malgré la simplicité de mise en œuvre de cette technique d'immobilisation, elle demeure peu utilisée pour la conception des biocapteurs.

3.2.2 L'inclusion ou piégeage

La méthode d'inclusion consiste à incorporer l'enzyme dans un gel insoluble. Ce gel peut être constitué d'une matrice organique (polymère) [71] ou inorganique (argiles) [72]. Dans les deux cas, l'enzyme est mélangée au matériau, puis déposée à la surface d'un transducteur sous certaines conditions. L'enzyme se trouve alors piégée mécaniquement à l'intérieur des matrices polymériques ou inorganiques. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de l'enzyme grâce à une porosité du gel suffisante. Toutefois cette technique est parfois limitée par la taille des pores du gel qui favorise le relargage des enzymes de faible poids moléculaire. Dans cette méthode, l'activité de l'enzyme est dépendante du micro-environnement local de l'enzyme immobilisée (pH, force ionique, diffusion moléculaire, etc...)

En ce qui concerne les matrices organiques, le premier exemple d'immobilisation a été décrit en 1967 [73]. Il consistait à piéger le glucose oxydase dans un gel de polyacrylamide.

3.2.3 La microencapsulation

Dans cette technique, l'enzyme reste en solution à l'intérieur d'un compartiment limité par une membrane sélective permettant de contrôler la taille des molécules susceptibles de diffuser vers l'enzyme. Cette membrane enzymatique forme des cavités ou microsphères assez importantes pour retenir des protéines de grande taille tout en laissant diffuser les substrats ou produits de taille beaucoup plus petite.

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

3.2.4 La réticulation et la co-réticulation

Il s'agit de la réticulation ou co-réticulation avec un agent bifonctionnel (généralement en association avec 1 à 3 polymères). Il est possible d'immobiliser les molécules d'enzyme en procédant à leur pontage covalent à l'aide de réactifs bifonctionnels tel que le glutaraldéhyde [69].

Ces liaisons covalentes intermoléculaires donnent des composés de haut poids moléculaire qui sont insolubles dans l'eau. Il est également possible de coréticuler une enzyme et une protéine inactive, par exemple, l'albumine. L'utilisation de cette protéine permet, par une meilleure répartition des masses des différentes protéines, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues.

Notre étude portera sur l'utilisation de cette méthode d'immobilisation de l'avidine afin d'élaborer un biocapteur pour la détection de la biotine (Figure 3.4).

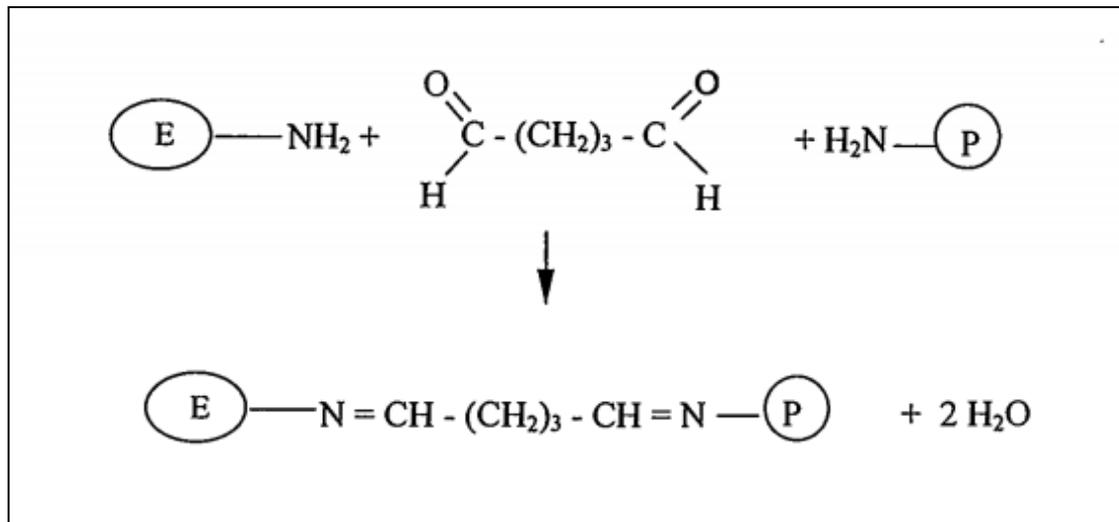


Figure 3.4 Exemple de la réticulation au glutaraldéhyde.

La réticulation est également utilisée pour accroître la stabilité des complexes enzyme-support obtenus après adsorption ou inclusion.

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

3.2.5 Le couplage covalent

Le couplage covalent d'enzyme sur un transducteur nécessite la présence d'un groupement fonctionnel sur la surface de celui-ci. Ces groupements sont en général -COOH, -NH₂, -OH ou -SH; ils sont peu réactifs chimiquement et il convient de les activer pour qu'ils réagissent dans des conditions douces avec des groupements fonctionnels de l'enzyme, n'intervenant pas dans le processus de reconnaissance moléculaire. On peut aussi procéder à la silanisation de supports portant des groupements M-OH pour changer la nature des groupements de surface.

3.2.6 La méthode Langmuir-Blodgett

Comme les protéines (enzymes, anticorps, etc...) possèdent de nombreux groupements fonctionnels (NH₂, COOH, OH, SH...) présents dans les acides aminés constituant la protéine, ils peuvent interagir avec d'autres molécules présentant des groupements fonctionnels et ainsi les protéines peuvent être immobilisées dans un film Langmuir-Blodgett. Elles peuvent être immobilisées à l'intérieur d'une monocouche ou prises en sandwich entre deux monocouches de molécules amphiphiles. De nombreux travaux ont montré que cette technique douce peut améliorer les propriétés de la membrane enzymatique, et peut être utilisée pour réaliser des microbiocapteurs [74-75].

En conclusion, les caractéristiques des méthodes d'immobilisation d'enzyme sont résumées dans le tableau 3.1. Ces méthodes doivent garantir différentes conditions:

- l'activité de l'enzyme doit être maintenue;
- les sites actifs de l'enzyme immobilisée doivent être accessibles par le substrat;
- le transport de masse des substrats et des produits doit être possible à l'intérieur de la membrane enzymatique.

On classe en général toutes les méthodes d'immobilisation en deux grandes catégories:

- Les monocouches constituées par la méthode d'adsorption, d'adsorption-réticulation, de couplage covalent et de Langmuir-Blodgett.
- Les couches épaisses constituées, quant à elles par une méthode de réticulation, ou coréticulation, de piégeage et de microcapsulation.

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

Méthodes d'immobilisation	Avantages	Inconvénients
1. Adsorption physique	Extrême simplicité	Système instable(phénomène de désorption), relargage d'enzyme, domaine de travail limité, stabilité insuffisante, sensible au pH, à la force ionique, et à la température.
2. Inclusion ou piégeage	Application à des cellules entières ou des organelles, l'environnement peut préserver une bonne activité enzymatique.	Membrane épaisse: effet de la diffusion des espèces.
3. Microencapsulaion	Le biorécepteur est en solution, son activité reste maximale.	Technique complexe
4. Réticulation	Facile à mettre en œuvre, peut être utilisé pour augmenter la stabilité des édifices obtenus par les méthodes (1,2,6).	Perte d'activité due à la réaction chimique, problème de diffusion, difficulté de contrôler le degré de réticulation: manque de reproductibilité.
4. Co-réticulation	Facile à mettre en œuvre, peut être utilisé pour augmenter la stabilité des édifices obtenus par les méthodes (1,2,6). L'utilisation d'une protéine inerte sérum albumine ou gélatine permet de minimiser l'inactivation de l'enzyme par les réactifs bifonctionnels.	Perte d'activité due à la réaction chimique, problème de diffusion, difficulté de contrôler le degré de réticulation: manque de reproductibilité.
5. Couplage covalent	Grande stabilité, problème de diffusion atténué, peut conserver l'accessibilité des sites induisant des temps de réponse très courts, pas de perte en enzyme	Nécessite une surface de transducteur ou de membrane fonctionnalisable, perte d'activité due à la réaction chimique.
6. Langmuir-Blodgett	Technique "douce"; obtention d'édifices supramoléculaires bien contrôlés; faible épaisseur des couches enzymatiques.	Technique complexe et onéreuse; durée de vie limitée.

Tableau 3.1 Caractéristiques des principales méthodes d'immobilisation.

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

3.3 Réticulation

L'immobilisation par réticulation consiste à créer des liaisons chimiques entre molécules bio-réceptrices en utilisant un agent réticulant, par exemple une molécule biofonctionnelle permettant d'assurer la liaison entre deux composés [76].

3.3.1 Types de réticulation

a) Le glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde (GA), appelé aussi 1,5-pentanedial ou aldéhyde glutarique (N° CAS 111-30-8), est un dialdéhyde aliphatique. A l'état pur, il se présente sous la forme d'un liquide huileux ou de cristaux incolores à odeur âcre, mais dans la pratique, ce produit est livré sous forme de solutions aqueuses à 25 % ou 50 %.

C'est un produit très réactif qui s'oxyde à l'air et polymérise à la chaleur. Il est utilisé dans de nombreux domaines concernés par sa réactivité avec les protéines tels que le traitement de l'eau, l'imperméabilisation du papier et du textile, le tannage du cuir, la stabilisation des émulsions photographiques et aussi la fixation des cellules en histologie [77]. Le glutaraldéhyde est une substance utilisée pour la fixation des protéines et la stérilisation mais aussi dans certains processus industriels [78]. Le glutaraldéhyde, qui possède deux groupements aldéhydes, est un agent de réticulation intermoléculaire très efficace qui réagit avec les groupements amines des protéines [79]. Sa structure chimique est présentée dans la figure 3.5.

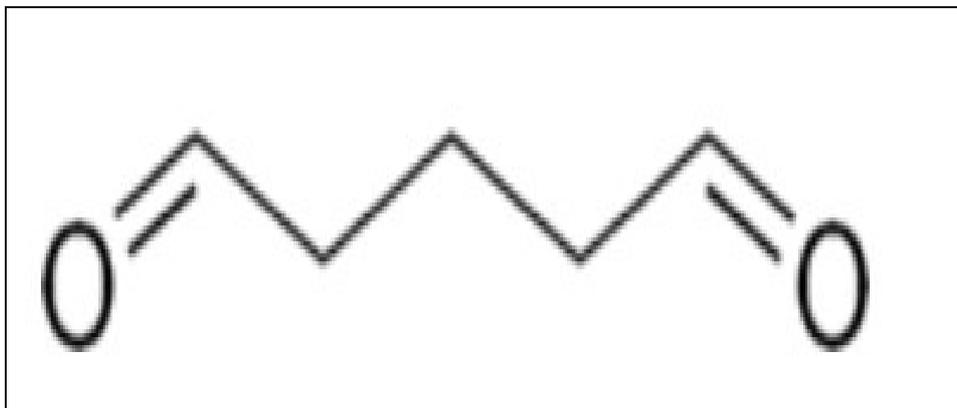


Figure 3.5 Formule développée de glutaraldéhyde.

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

NB: Dans ce cas, nous avons choisi le glutaraldéhyde afin d'avoir un lien entre la protéine (avidin /biotine) et l'APTES.

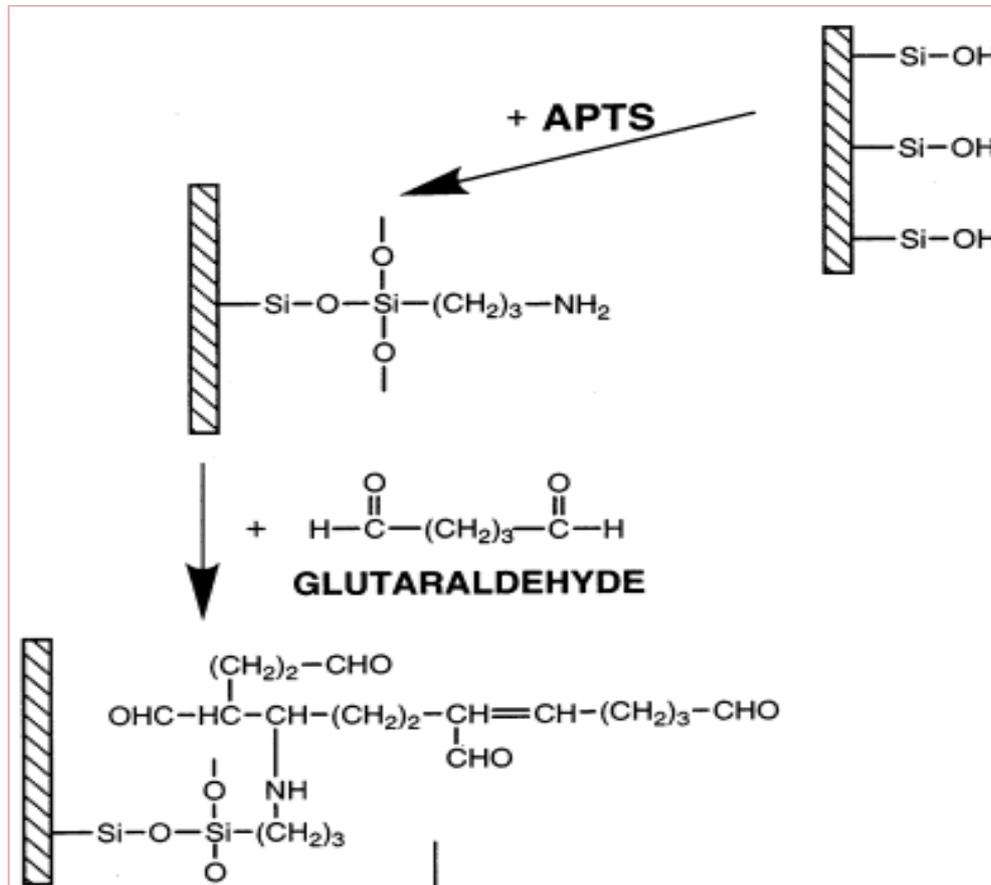


Figure 3.6 Mécanisme de réticulation par le glutaraldéhyde sur une surface silanisée par l'APTES [80].

b) Le glyoxal

Le glyoxal est un composé organique dont la formule chimique est OCHCHO . C'est le plus petit dialdéhyde (composé de deux groupes aldéhyde) [81]. Le glyoxal du commerce est préparé soit par oxydation en phase gazeuse d'éthylène glycol en présence d'un catalyseur d'argent ou de cuivre (procédé Laporte), soit par oxydation en phase liquide d'acétaldéhyde avec de l'acide nitrique [82]. La première source commerciale de glyoxal a été démarrée en 1960 à Lamotte, en France [83].

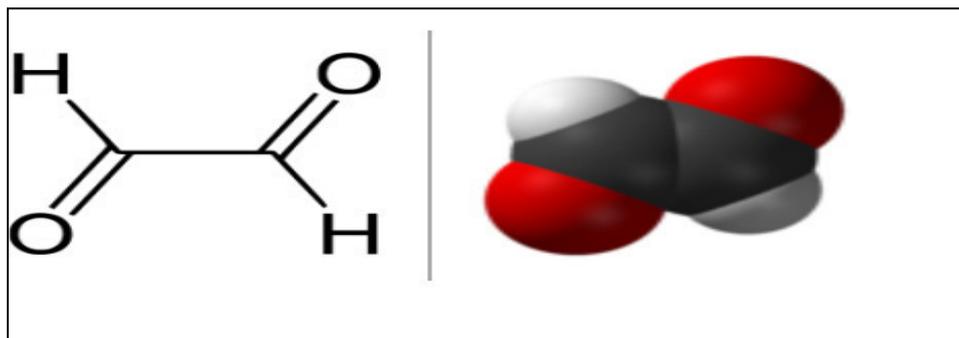


Figure 3.7 Formule développée de glyoxal [83].

c) Le glycoluril

Le glycoluril peut être synthétisé en faisant réagir deux équivalents d'urée avec du glyoxal. De même, en utilisant d'autres réactifs vicinaux carbonyle (ou carbonyle hydrate), on production obtient des dérivés comportant divers groupes fonctionnels à la place des atomes d'hydrogène sur la chaîne carbonée.

Le glycouril lui-même et ses dérivés sont utilisés comme monomères pour produire les polymères macrocycliques de cucurbituriles, qui servent d'hôtes à se lier à diverses espèces neutres et anioniques. Ils sont également utilisés dans plusieurs classes de structures non cycliques qui lient également une variété de structures [84].

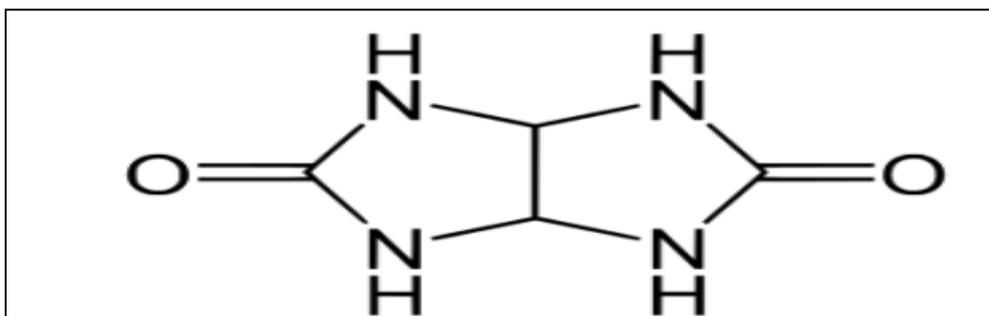


Figure 3.8 : Formule développée de glycoluril [84].

d) Le glycérol

Le **glycérol**, ou **glycérine**, est un composé chimique de formule HOH₂C-CHOH-CH₂OH. C'est un liquide incolore, visqueux et inodore au goût sucré et faiblement toxique, utilisé dans de nombreuses compositions pharmaceutiques. Sa molécule possède trois hydroxyles correspondant à trois fonctions alcool

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

responsables de sa solubilité dans l'eau et de sa nature hygroscopique. Un résidu glycérol constitue l'articulation centrale de tous les lipides de la classe des triglycérides et des phosphoglycérides [85].

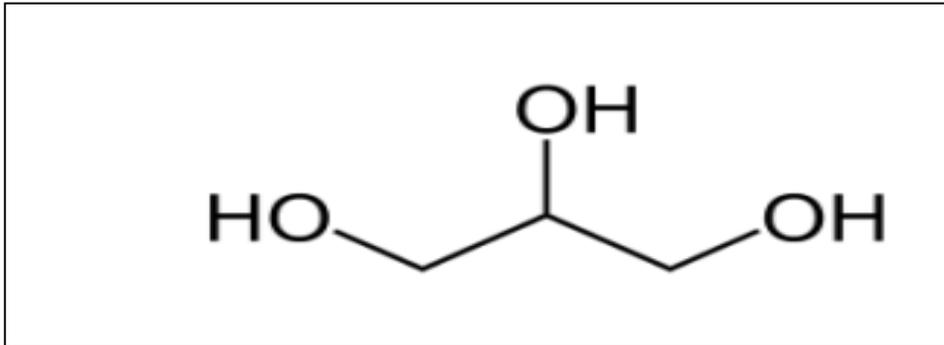


Figure 3.9 Formule développée de glycérol [85].

3.3.2 Validation de la phase de réticulation

Le spectre infrarouge (FTIR) a la capacité d'identifier des groupes fonctionnels tels que C=O, C=N et C-H etc... via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques. Comme l'indique la figure 3.10, une double liaison C=N est visible entre 2200 et 2300 cm^{-1} attestant de la liaison entre le groupement carboxyle du glutaraldehyde avec le groupement fonctionnel amine de l'APTES.

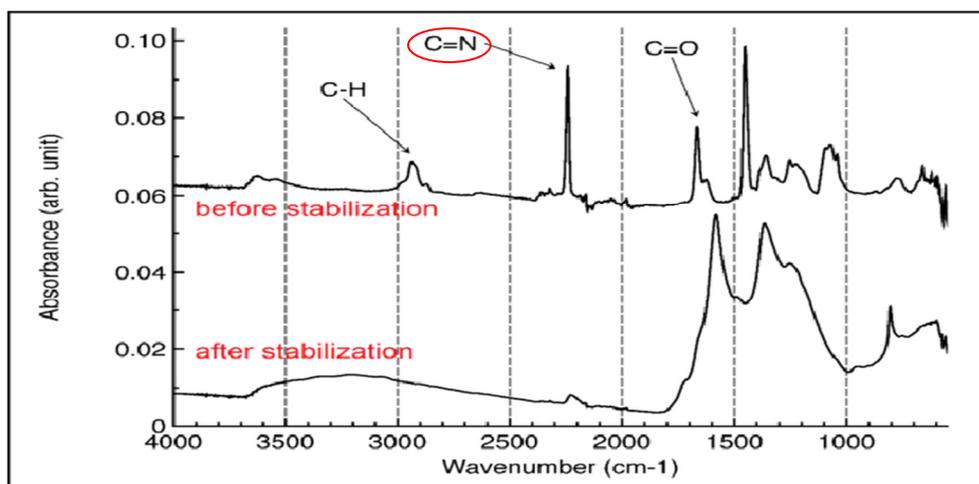


Figure 3.10 Spectre FTIR de la double liaison (C=N) entre l'APTES et le glutaraldehyde [86].

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

3.4 Immobilisation de la sonde

La fixation du biorécepteur repose généralement sur des interactions électrostatiques, des liaisons covalentes ou sur la grande affinité pouvant exister entre des entités chimiques telles que l'avidine et la biotine [87]. Il existe une variété de méthodes pour immobiliser des biomolécules aux interfaces (adsorption, liaison covalente etc...), permettant ainsi de modifier les propriétés de surface des matériaux. Pour pouvoir immobiliser une protéine à la surface du silicium, une phase intermédiaire de réticulation (crosslinking) est nécessaire donnant naissance à un groupement carboxyle. Ce dernier aura pour fonction de réagir avec les fonctions amines primaires et plus particulièrement avec les amines de la lysine des protéines. Parmi ces crosslinker, le glutaraldéhyde, couramment employé en biochimie, permet de réticuler les protéines tout en conservant leur activité.

Pour mieux comprendre les mécanismes de liaison glutaraldéhyde - protéine, l'équipe de Monsan et al. [88] a étudié les formes sous lesquelles peut se trouver le glutaraldéhyde commercial. Pour plus d'information, il est préférable de se référer à la référence [88].

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

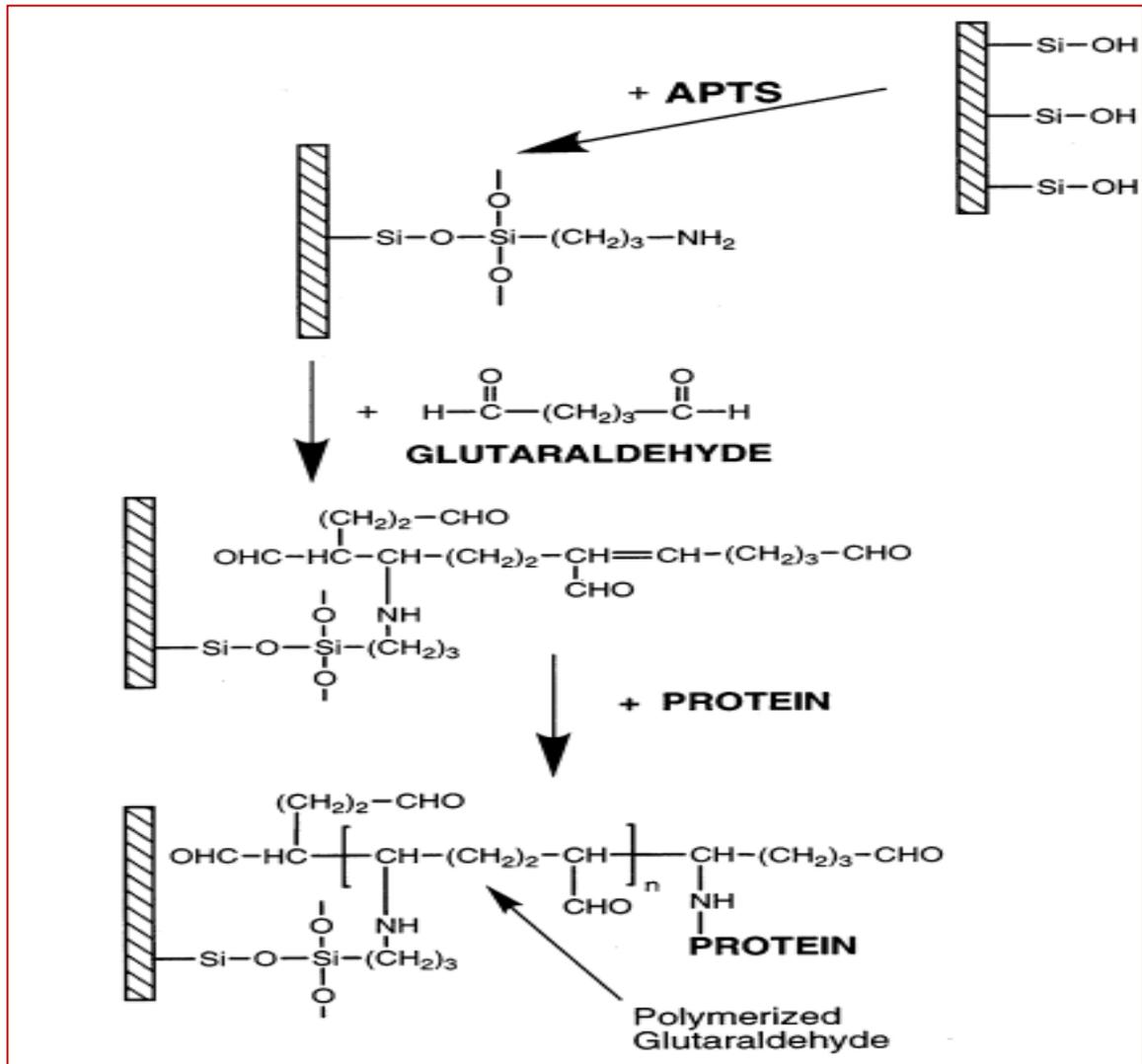


Figure 3.11 Mécanisme d'immobilisation d'une protéine sur la surface de silicium par l'intermédiaire de groupements amines greffés [80].

3.4.1 Validation de l'immobilisation de la sonde

❖ Analyse par AFM

L'AFM est une technique qui peut nous permettre de confirmer la liaison entre une protéine et le glutaraldéhyde. La Figure 3.12 visualise le phénomène d'immobilisation d'une protéine avidine sur une surface de silicium.

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

Les molécules d'avidine sont immobilisées de manière covalente sur la Surface de Si modifiée par COOH après la réaction. Le montant déposé de l'avidine est contrôlée par la concentration de solution d'avidine (5-160 nM). Les figures 3.12a et 3.12b montrent les images AFM de la surface COOH / Si après le dépôt de molécules d'avidine dans des solutions de 5 nM et 160 nM. Après que la surface soit trempée dans la solution d'avidine de 160 nM, la surface est presque entièrement recouverte avec les molécules d'avidine, et la couche moléculaire unique de l'avidine est fabriquée successivement [89].

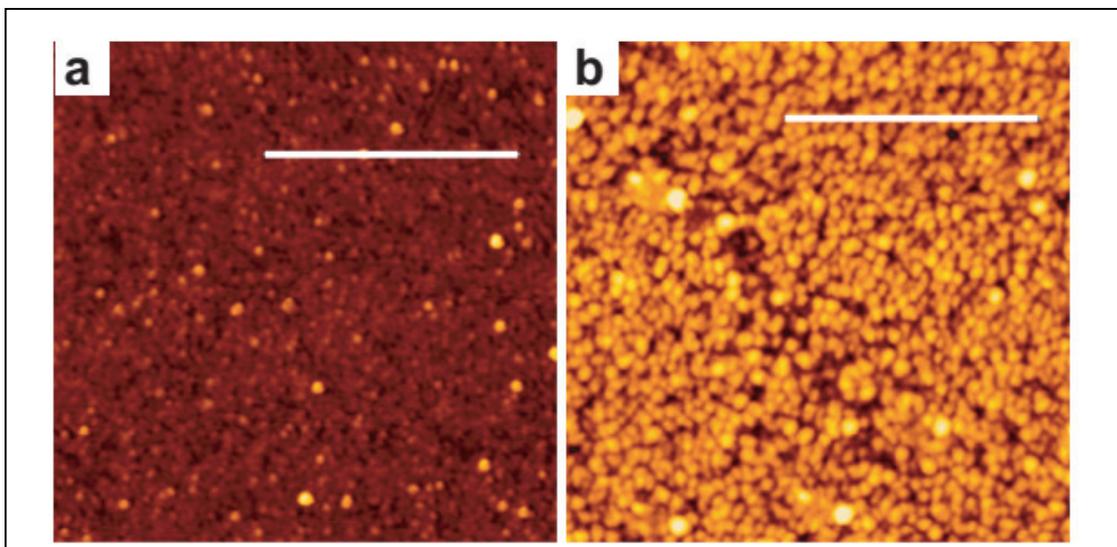


Figure 3.12 : Topographies AFM et profils linéaires des surfaces de SiO₂ à terminaison COOH après le dépôt d'avidine en **(a)** 5 nM et **(b)** Solution d'avidine à 160 nM. Toutes les images sont obtenues dans l'air [89].

3.5 Phase de détection

Après l'obtention de la plateforme sur silicium fonctionnalisé, celle-ci sera destinée directement à la détection des molécules cibles. Dans notre travail, il s'agit de la biotine. Pour se faire la plateforme est mise en contact direct avec de la biotine en solution aqueuse. Des considérations de pH et de température seront prises en compte lors de cette expérience. Nous n'entrerons pas dans ces détails, vu l'étendu de cette étude et de sa richesse, cette partie sera dédiée aux perspectives de ce travail. Le lecteur soucieux des détails, pourra toujours se référer à la littérature existante.

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

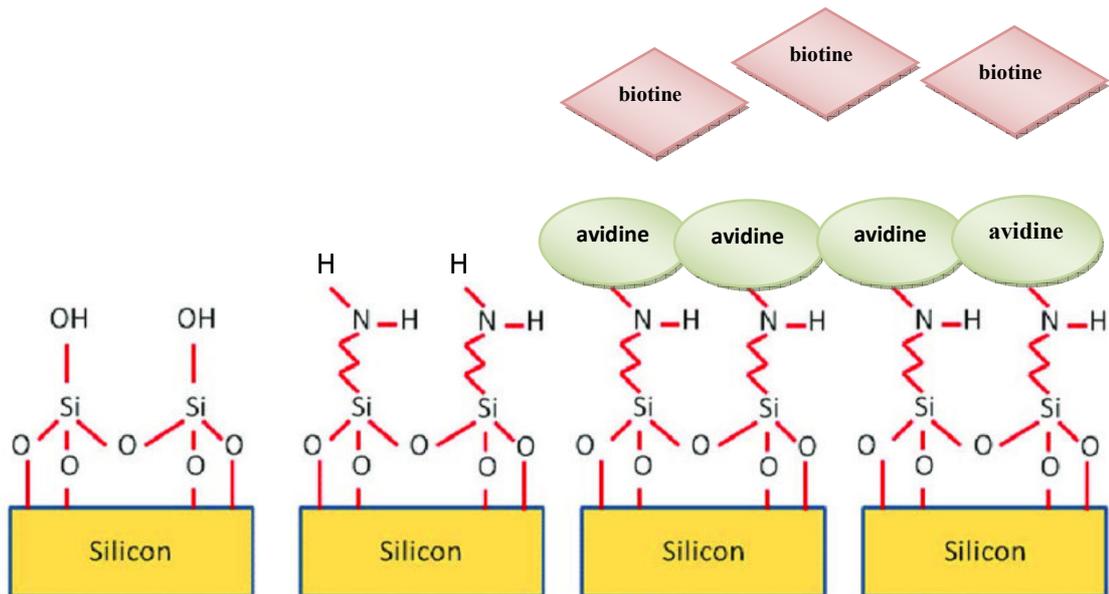


Figure 3.13 Reconnaissance biologique entre sonde et cible, respectivement, avidine et biotine.

3.6 Protocol

Après une étude approfondie de tout le processus de conception d'une plateforme sur silicium pour la biodétection, nous avons jugé utile de présenter un protocole qui nous a semblé intéressant. Nous nous sommes inspirés d'une littérature riche et intéressante dans le domaine.

- ✚ Nettoyage de la surface de silicium par la solution piranha (H_2O_2 30% et SO_4 90%) pendant 30 minutes [90].
- ✚ Greffage de l'APTES sur la surface de silicium hydroxylé, le substrat du silicium sera immergé dans une solution de 3% (v/v) d'APTES et 2% eau dans 95% (v/v) d'éthanol pendant 1h à température ambiante sous agitation. Observation : L'emploi de toluène anhydre (0.01%) comme solvant permet de s'affranchir de l'influence du PH et de la présence d'eau dans le milieu réactionnel [91].
- ✚ La réticulation se fera grâce au glutaraldehyde sur la surface de Si silanisée par l'APTES, le substrat de silicium sera immergé dans une solution de 10% (v/v) pendant 1h [92].

Chapitre 3 : Biofonctionnalisation de la surface de silicium : immobilisation de la molécule sonde

- ✚ L'immobilisation de la sonde à la surface du silicium se fera grâce à la liaison entre la fonction carboxyle du glutaraldehyde et la fonction amine de la molécule sonde. Ce phénomène aura lieu en trempant l'échantillon de silicium dans une solution d'avidine de 160 nM [89]. La surface sera entièrement recouverte avec les molécules d'avidine.
- ✚ Un rinçage approprié après chaque étape s'avère à chaque fois nécessaire.

3.7 Conclusion

Ce chapitre est consacré à la biofonctionnalisation de la surface de silicium. Il comporte deux parties. Une première partie destinée à la réticulation et au rôle qu'elle joue dans la réussite de l'immobilisation de la molécule sonde. La deuxième partie montre comment se fait l'immobilisation de la biomolécule sonde grâce à sa réaction avec les terminaisons apportées par le crosslinker utilisé. Dans ce travail, un choix de l'avidine a été jugé préférable à cause de sa grande affinité avec la biotine.

Conclusion générale

Conclusion générale

Pour conclure ce manuscrit, nous allons citer brièvement, toutes les étapes par lesquelles passe la fabrication d'une plateforme à base de silicium destinée à la biocapture.

La première étape primordiale nécessaire au bon fonctionnement du biocapteur est l'étape de décontamination et de décapage de la surface de silicium. L'objectif principal de ce traitement est d'éliminer toutes les contaminations que ce soit organiques, métalliques ou autres qui peuvent être présentes à la surface d'une plaquette de silicium. La présence de ces contaminants peut nuire au traitement prévu de la surface du substrat. Nous avons pu recenser plusieurs modes opératoires efficaces nécessaires au nettoyage des substrats. Leur efficacité a été prouvée dans les travaux que nous avons cités dans la bibliographie de ce manuscrit et que nous avons lu avec un grand intérêt.

Une phase de traitement également importante par laquelle doit passer la surface du substrat est l'opération de décapage. Cette phase permet la création de groupements hydroxyles (hydroxylation) qui conduisent à un meilleur greffage des couches organiques.

La deuxième étape de ce traitement est la phase importante de silanisation. Cette fonctionnalisation de surface permet le greffage de groupements fonctionnels (les amines NH_2) à la surface. Ces groupements vont favoriser l'accrochage de la molécule sonde. Une validation de cette étape est démontrée grâce à des techniques de caractérisation telle que l'angle de contact et la spectroscopie infrarouge. Les spectres Infrarouges ont montré l'apparition de bandes d'absorption relatives aux amines (NH_2) au niveau des fréquences 3360 et 3240cm^{-1} .

Une étape intermédiaire dans ce type de biofonctionnalisation est nécessaire. C'est la phase de réticulation (crosslinking). Le réactif bifonctionnel utilisé pour l'immobilisation des enzymes par réticulation chimique est le glutaraldéhyde qui est un agent réticulant utilisé très fréquemment. Nous avons constaté son importance dans le couplage efficace qu'il permet entre la surface et la biomolécule et qui peut également jouer le rôle d'espaceur en introduisant un espace contrôlé entre les deux entités, afin d'améliorer l'accessibilité de la biomolécule envers sa cible, ou bien afin de protéger une protéine d'une surface dénaturante.

La dernière étape pour permettre de finaliser la plateforme à base de silicium destinée à la biocapture est l'immobilisation de la biomolécule sonde. Cet accrochage est réalisé grâce à un pont covalent entre deux atomes d'azote (fonctions amines), l'un appartenant à l'APTES et l'autre à la protéine.

L'interaction entre la molécule de biotine et la protéine avidine est très souvent utilisée pour l'immobilisation de biomolécules. En effet, la très forte affinité entre ces deux partenaires ($K_D \sim 10^{-15}\text{mol.l}^{-1}$) génère une liaison quasiment irréversible, de stabilité presque comparable à celle d'une liaison covalente, qui n'est affectée ni par les valeurs de pH et de température, ni par les solvants organiques, ou autres agents

Conclusion générale

dénaturants. Dans ce travail nous avons opté pour l'avidine comme sonde et pour la biotine comme cible.

La caractérisation de la modification de surface par des biomolécules est essentielle dans le cadre de la fabrication de biocapteur. La préparation de constructions moléculaires complexes nécessite un suivi rigoureux afin de s'assurer du bon fonctionnement du biocapteur. Une telle caractérisation lance d'importants défis : d'abord, la taille des molécules employées varie de quelques nanomètres à quelques microns, mais de façon plus importante, on constate d'après la littérature que la densité surfacique de molécules présentes est très faible, variant de quelques picomoles à quelques micromoles par centimètre carré. L'usage de techniques très sensibles est requis. Diverses techniques sont utilisées afin de caractériser les étapes de fabrications du biocapteur. Chacune d'elles offrant des informations différentes, l'usage complémentaire de plusieurs techniques permet de s'assurer de l'exactitude de la modification chimique visée.

La principale technique de caractérisation citée lors de cette étude est la spectroscopie infrarouge. Cette technique permet de caractériser et de suivre les étapes de fonctionnalisation d'un substrat par l'identification des différentes bandes d'absorption ou de transmission, apparaissant dans les spectres infrarouges, dus aux éléments chimiques présents dans l'échantillon. Ensuite, une méthode de microscopie a été présentée. Avec l'AFM en mode d'imagerie, des informations topographiques sont obtenues. Ce mode permet donc d'observer l'évolution en termes de rugosité de substrats selon les traitements appliqués. Ceci permet de voir comment ses traitements affectent la rugosité. Ensuite, la méthode de mesure d'angle de contact a également été présentée. La modification chimique d'un substrat altère l'angle de contact. Il sera donc possible de caractériser et de suivre les étapes de fonctionnalisation d'un substrat par l'évolution de l'angle de contact mesuré.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- [1] Anne Faucheux, Nouvelles fonctionnalités de l'interface silicium/diélectrique pour la microélectronique, Matériaux. Ecole polytechnique X, 2005, page 27,22.
- [2] Zabardjade SAID BACAR, Élaboration et caractérisations du silicium polycristallin par cristallisation en phase liquide du silicium amorphe, universite paris sud, page 12.
- [3] P.H.Haumesser, « Elaboration par croissance Czochralski, caractérisation spectroscopique et propriétés laser de monocristaux dopés par l'Ytterbium », Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie curie.
- [4] Damien Aureau. Interface silicium/couche organique: Maitrise des propriétés et fonctionnalisation. Engineering Sciences [physics]. Ecole Polytechnique X, 2008, page 17, 38, 164.
- [5] Amal Nadri. Modélisation de la microstructure des grains dans le silicium multicristallin pour le photovoltaïque. Autre. Université de Grenoble, 2012, page 22, 23.
- [6] Amina Tandjaoui, Solidification dirigée du silicium multi-cristallin pour les applications photovoltaïques : caractérisation in situ et en temps réel par imagerie X synchrotron, Université d'Aix-Marseille, page 4 ,5.
- [7] K. Ladjali « Identification de l'orientation cristallographique des grains d'une plaquette de silicium multicristallin par attaque chimique », Thèse de magister, université .Tizi Ouzou , 2011. P 119.
- [8] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schematic_of_allotropic_forms_of_silicon_horizontal_plain.svg
- [9] Zahi Hjezi « Biocéramiques phosphocalciques fonctionnalisées : étude de la silanisation de surface », universite de limoges, page 32.
- [10] Kengne - Momo Rosine Pélagie, « Mise en œuvre des surfaces spécifiques en vue de la détection de bactéries pathogènes par diffusion Raman », Université du Maine. Page 20.
- [11] Matthieu Lépinay. Impact des chimies de nettoyage et des traitements plasma sur les matériaux diélectriques à basse permittivité des Matériaux. Université Montpellier 2, 2014. Page 28, 29.
- [12] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon, Journal of Bioscience and Bioengineering, 91 (2001) 233-244. Thèse doctorat 2015, université de Limoges.

Références bibliographiques

- [13] J. Ramier, « Structures fibreuses tridimensionnelles de biopolymères pour l'ingénierie tissulaire », Thèse de Doctorat, Université Paris-Est, (2012). Thèse doctorat 2015, université de Limoges.
- [14] S.B. Nimse, K. Song, M.D. Sonawane, D.R. Sayyed, T. Kim, Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications, *Sensors*. 14 (2014) 22208–22229, Université de Lyon, 2016 Français.
- [15] D. Dupont, Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire, F4010, Techniques de l'Ingénieur, Paris, 2005.
- [16] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech*. 3 (2013) 1–9, University de Lyon, 2016 Français.
- [17] J. Yang, A. Moraillon, A. Siriwardena, R. Boukherroub, F. Ozanam, A. C. Gouget-m Laemmel, and S. Szunerits. « Carbohydrate Microarray for the Detection of Glycan- Protein Interactions Using Metal-Enhanced Fluorescence » .*Analytical Chemistry*, 2015, 87.
- [18] J. M. Buriak. « Organometallic Chemistry on Silicon and Germanium Surfaces. Chemical », *Reviews*, 2002 ,102.
- [19] T. Nakagawa, K. Ogawa, T. Kurumizawa, and S. Ozaki. Discriminating Molecular Length of Chemically Adsorbed Molecules Using an Atomic Force Microscope Having a Tip Covered with Sensor Molecules (An Atomic Force Microscope Having Chemical Sensing Function).*Japanese Journal of Applied physics*, 1993, 32, L294.
- [20] M. R. Linford and C. E. D. Chidsey. Alkyl monolayers covalently bonded to silicon surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 1993, 115, 12631. These de Doctorat de l'Université Paris-Saclay 2016, page 18.
- [21] J. J. Gooding and S. Ciampi. The molecular level modification of surfaces: from self-assembled monolayers to complex molecular assemblies. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40, 2704. These de doctorat de l'université Paris-Saclay 2016, page 14.
- [22] N. D. Brault, C. Gao, H. Xue, M. Piliarik, J. Homola, S. Jiang, and Q. Yu. Ultra-low fouling and functionalizable zwitterionic coatings grafted onto SiO₂ via a biomimetic adhesive group for sensing and detection in complex media. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25, 2276. These de doctorat de l'université Paris-Saclay 2016, page 15.

Références bibliographiques

- [23] J. D. Le Grange, J. L. Markham, and C. R. Kurkjian. Effects of surface hydration on the deposition of silane monolayers on silica. *Langmuir*, 1993, 9, 1749. these de doctorat de l'universite Paris-Saclay 2016, page14.
- [24] Kai Wan, « Etude de différentes de biofonctionnalisation pour la réalisation de biocapteurs .Application a la détection de pesticides », Ecole Centrale de Lyon 1999, Page 13, 14, 07.
- [25] Raphaëlle Darne, etude photophysique des transferts parletaux, Ecole Nationale Supérieure des industries chimiques, page 62, 64, 65.
- [26] Siham Benhadi. « Greffage de cyclodextrines modifiées par traitement Corona sur matériaux cellulosiques ». These Présenté à l'Université Henri Poincaré Nancy 1. Page 43,44.
- [27] L. Stryer, *La Biochimie*, Flammarion, Paris, 3e éd. **1992**
- [28] A. M. Nowicka, A. Kowalczyk, Z. Stojek, M. Hepel, Nanogravimetric and voltammetric DNA-hybridization biosensors for studies of DNA damage by common toxicants and pollutants, *Biophys. Chem.* 146 (2010) 42–53, Université de Lyon, 2016 Français.
- [29] A. Killard, Antibodies: production, functions and applications in biosensors, *TrAC Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 257–266.
- [30] Briscoe,S.F., Cai, J., DuBow,M.S. (1996)Luminescent bacterial biosensors for the rapid detection of toxicants.Dans: *Microscale aquatic toxicology- advances, techniques and practice*, Wells,P.G., Lee, K., Blaise, C.; eds., CRC Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, Université de Metz,2001.P 25.
- [31] http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Average_prokaryote_cell-_fr.svg , Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2012. Français.P 32.
- [32] S.Marinescop, P. Pernot, Biocapteurs implantables in vivo, RE108, *Techniques de l'Ingénieur*, Paris, 2008.
- [33] D.Dupont, Applications des biocapteurs ; du contrôle des aliments à la recherche de viesur Mars, *Techniques de l'Ingénieur*, BIO7100, Paris, 2009.
- [34] Boukherroub , R., Chemical reactivity of hydrogen-terminated crystalline silicon surfaces. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2005. 9(1-2): p. 66-72
- [35] Buriak, J.M. Stewart, M.P. Geders, T.W. Allen, M.J. Choi, H.C. Smith, J. Raftery, D. and Canham, L.T. Lewis Acid Mediated Hydrosilylation on Porous Silicon Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 1999. 121(49): p. 11491-11502.

Références bibliographiques

- [36] Boukherroub, R., Morin, S., Bensebaa, F., and Wayner, D.D.M., New Synthetic Routes to Alkyl Monolayers on the Si(111) Surface. *Langmuir*, 1999. 15(11): p. 3831-3835.
- [37] M. R. Linford and C. E. D. Chidsey . « Alkyl monolayers covalently bonded to silicon surfaces. *Journal of the American Chemical Society* », 1993 ,115, 12631.
- [38] J. Terry, M. R. Linford, C. Wigren, R. Cao, P. Pianetta, C. E. D. Chidsey, *Appl. Phys. Lett.*, 1997, **71**, 1056μ.
- [39] F. Effenberger, G. Götz, B. Bidlingmaier, M. Wezstein, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, **37**, 2462.
- [40] https://perso.telecom-paristech./grillot/page%20web_fichiers/NettoyageSi.pdf.
- [41] David GROJO « Mécanismes d'enlèvement de particules par laser impulsif : application au nettoyage pour la microélectronique ». Docteur en Sciences de l'Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, Faculté des Sciences de Luminy soutenue le 27 novembre 2006 Page 6.
- [42] A. Baudrant, F. Tardif, and C. Wyon, *Caractérisation et nettoyage du silicium*. Hermes, Lavoisier, 2003.
- [43] F. Tardif, I. Constant, T. Lardin, O. Demolliens, M. Fayolle, Y. Gobil, J. Palleau, and J. Torres, "Cleaning after silicon oxide cmp," *Microelectronic Engineering*, vol. 37/38, p. 285, 1997.
- [44] OHMI T." Total Room Temperature Wet Cleaning for Si Substrate Surface", *J. Electrochem. Soc.* vol. 143,n°9, September 1996.
- [45] ADAMASON A. W, « Physical Chemistry of surfaces », 6 ème edition, Wiley-Interscience, 1997.
- [46] TARDIF. « Cleaning performances and effects on MOS gate oxides » , Third R3 Symposium on Clean Room Technology and Contamination Control, Helsinki, Finlande, 1999.
- [47] M. Wery, « Décapage chimique des surfaces métalliques », *Techniques de l'ingénieur, Traité Matériaux métalliques-1459*.

Références bibliographiques

- [48] H. Angermann, W. Henrion, A. Röseler, and M. Rebien, "Wet-chemical passivation of Si(111)-and Si(100)-substrates," *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 73, no. 1–3, pp. 178–183, avril 2000.
- [49] J. E. Northrup, "Structure of Si(100)H: Dependence on the H chemical potential," *Phys. Rev. B*, vol. 44, no. 3, pp. 1419–1422, juillet 1991.
- [50] Répertoire toxicologique de la CSST, tel que consulté le 19 juillet 2012; choisir l'option "Tout détailler" en haut à gauche pour voir toute l'information:
http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=570
http://www.reptox.csst.qc.ca/produit.asp?no_produit=9955
- [51] S. Audisio, U. Gillet, A. Galarie, H. Mazille, « Traitement de surface et protection contre la corrosion », Ecole d'été, Aussois, (1987).
- [52] AMER MEKKAOUI « Élaboration et Caractérisation des Revêtements de Nickel Déposés Par Voie Electrochimique » Université Mohamed Khider Biskra. page 37.
- [53] Alcohols, *Compendium of Chemical Terminology « Gold Book »*. IUPAC, 1997, version corrigée en ligne : (2006-), 2e éd.
- [54] Buddy D. Allan S. Hoffman, *Modification physico-chimique de surface de matériaux utilisés en médecine*.
- [55] E. P. Plueddemann, *Silane Coupling Agents*, book Plenum, New York, (1982).
- [56] Semence, Brian (mai 2001). "ANNEXE 3E Verrerie de silanisation". *Protocoles actuels en biologie cellulaire* : A.3E.1. doi: 10.1002 / 0471143030. cba03es08.
- [57] SIDS Initial Assessment Report, 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES), UNEP PUBLICATIONS, Arona, Italy, 11-14 November 2003 (2003).
- [58] MAHIEUXE B. 1995 « Capteurs à fibre optique pour le dosage des nitrates » Thèse INPL-ENSIC-DCPRIGRAPP, Nancy, Institut national polytechnique de lorraine. Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques, Thèse de Docteur de L'INPL par Raphaëlle Darne. Page 47.

Références bibliographiques

- [59] Wang, L. et al. Hierarchical Nanocomposites of Polyaniline Nanowire Arrays on Reduced Graphene Oxide Sheets for Supercapacitors. *Scientific Reports*, 2013. 3: p.3568
- [60] L.T. Zhuravlev, *Langmuir*, 1987, 3, p. 316. THÈSE Présentée à Faculte des Sciences – Departement de Physique Par Khaldi Khadidja 2016.
- [61] Engler, A. J., F. Rehfeldt, S. Sen et D. E. Discher. 2007. «Microtissue elasticity: measurements by atomic force microscopy and its influence on cell differentiation». *Methods Cell Biol*, vol. 83, p. 521-545.
- [62] Gyorgy, P., Rose, C. S., Hofmann, K., Melville, D. B. & du Vigneaud, V. (1940) Identity of vitamin H with biotin, *Science (Washington, DC, United States)*. 92-609.
- [63] Freitag, S., Le Trong, I., Klumb, L., Stayton, P. S. & Stenkamp, R. E. (1997) Structural studies of the streptavidin binding loop, *Protein Sci.* 6, 1157-66. Thèse de doctorat par Nicolas Humbert . Université de Neuchâtel
- [64] J. Korpela, « Avidin, a high affinity biotin-binding protein, as a tool and subject of biological research », *Medical Biology*, vol. 62, no 1, 1984, p. 5-26 .
- [65] M. Wilchek, E. A. Bayer, and O Livnah. Essentials of biorecognition : the (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. *Immun. Lett.*, 103(1) : 27–32, 2006 Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français.
- [66] Wayment, J. R.; Harris, J. M. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 336-342 ;these de doCTEUR préparé par Larbi Touahir. Ecole Polytechnique X, 2010. Français. <pastel-00529839>.
- [67] C.M. Yam, C.M. Pradier, M. Salmain, N. Fischer-Durand, and G. Jaouen. Molecular recognition of avidin on biotin-functionalized gold surfaces detected by firras and use of metal carbonyl probes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 245(1) :204–207, 2002. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie Spécialité : Chimie - Physique des matériaux présentée par Candice BLIN].

Références bibliographiques

- [68] K. Mosbach. *Methods in Enzymology: Immobilized Enzymes*. Academic Press New York (1976).
- [69] S. Kumaran and C. Tran Minh, *Electroanalysis*, 4 (1 992) pp 949-954.
- [70] J.Janata, R.J. Huber, *Ion selective Electrodes in Analytical Chemistry.*, vol 2, (1980), pp 107-174.
- [71] A. Bratov, N. Abramova, J. Munoz, C. Dominguez, S. Alegret, and J. Bartroli, *Anal, Chem.*(1 995), 67, pp3589-3595.
- [72] J.L. Besombes, Thèse de Doctorat de l'Université de Savoie, Spécialité Chimie (1994).
- [73] S.J. Updike, G.P. Hicks, *Nature*, 214 (1967) pp 986-988.
- [74] T. Tatsuma, H. Tsuzuki, Y. Okawa, S. Yoshida and T. Watanabe, *Thin Solid Films*, 202 (1991) pp 145-150.
- [75] K. Wan, J.M. Chovelon, N. Jaifrezic-Renault, C. Martelet, L.I. Netchiporouk, N.F. Shram, R. Cespuglio, *Journées d'Electrochimie 1999*, Toulouse, 1-4, Juin 1999. (Accepté pour la présentation orale).
- [76] X.Liu, W.Farmerie, Schuster et W.Tan. *Molecular Beacons for DNA Biosensors with Micrometer to Submicrometer Dimensions*. *Analytical Biochemistry*, vol .283, no. 1, pages 56-63, 2000.
- [77] KARI F.W. - *Studies of Glutaraldehyde administered by inhalation to F344/N rats and B6C3F1 mice*. Research Triangle Park (Etats-Unis), NTP Technical Report on Toxicity Lieu, 1993, 25, pp. 1-82.
- [78] BOURBONNAIS, R., C. LAFORTUNE, S. LEVERT. « Exposition au Divers Voir aussi glutaraldéhyde au service d'endoscopie », *Objectif prévention*, vol. 20, no 1, 1997, p. 34-35.
- [79] X.Liu, W.Farmerie, Schuster et W.Tan. *Molecular Beacons for DNA Biosensors with Micrometer to Submicrometer Dimensions*. *Analytical Biochemistry*, vol .283, no. 1, pages 56-63, 2000.

Références bibliographiques

- [80] Vandenberg, E. Elwing, H. Askendal, A. Lundstrom, I. 1991. Protein immobilization to 3-aminopropyltriethoxysilane: glutaraldehyde surfaces: characterization by detergent washing. *J. Colloid Interface Sci.* 143, 327–335.
- [81] O'Neil, MJ (2001): *Indice Merck*, 13e édition, page 803.
- [82] H. Debus (1857) "Sur l'action de l'acide nitrique sur l'alcool aux températures habituelles", " *Philosophical Magazine*", 4ème série, 13 : 39-49. À partir de p. 40: "Ce résidu est constitué presque entièrement d'aldéhyde d'acide glyoxylique; j'ai proposé de l'appeler Glyoxal, C₂H₄O₃."
- [83] Ronzio, AR; Waugh, TD (1944). "Bisulfite de glyoxal". *Synthèses organiques*. 24 : 61. Volume collectif, 3, p. 438.
- [84] Sijbesma, RP; Kentgens, APM; Lutz, ETG; van der Maas, JH; Nolte, RJM (1993). "Caractéristiques de liaison des clips moléculaires dérivés du diphénylglycoluril". *Confiture. Chem. Soc.* 115 (20): 8999 à 9005. doi: 10.1021 / ja00073a015 .
- [85] Peter M. Collins, *Dictionary of carbohydrates*, CRC Press, 2005, 1282 p. (ISBN 0-8493-3829-8), p. 584-986.
- [86] Ultra-Thin Electro-Spun PAN nanofiber membrane for High-efficient inhalable PM_{2.5} Particles filtration. Article (PDF Available) in *Journal of Nano Research* 46:73-81. March 2017 with 363 Reads. DOI : 10. 4028/www.scientific.net/JnanoR.
- [87] G. F. Weiller, G. Caraux et N. Sylvester. The modal distribution of protein isoelectric points reflects amino acid properties rather than sequence evolution. *PROTEOMICS*, vol. 4, no. 4, page 943-949, 2004.
- [88] P. Monsan, G. Puzo, H. Mazarguil. *Biochimie*, 57(1975) pp 160.
- [89] S.W. Schneider, J. Larmer, R.M. Henderson and H. Oberleithner, *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* 435, 362 (1998).
- [90] L. T. Zhuravlev, *Langmuir*, 1987, 3, P 316.
- [91] Vivet F. Bouchoule A. Boufendi L. *J. of App. Phys.* 1998, 83 (12), p. 7474.
- [92] Duncan, M.R., Lee, J.M., Warchol, M.P. 1995. Influence of surfactants upon protein: peptide adsorption to glass and polypropylene. *Int. J. Pharm.* 120, 179–188.

Résumé

Le domaine des biocapteurs a suscité un intérêt croissant lors de cette dernière décennie. Maintes études et expériences ont été réalisées dans ce domaine menant à des résultats spectaculaires dans le domaine de la biologie, la médecine, l'agroalimentaire etc... Les résultats obtenus dans ce domaine ont engendré une bibliographie très riche, nous encourageant à choisir ce domaine pour faire notre étude. Nous nous sommes inspirés de la littérature pour fonder un protocole final susceptible de mener à terme l'élaboration d'une plateforme capable de détecter des entités biologiques. Plusieurs matériaux intéressants ont contribué à la réalisation de ces plateformes dont le silicium, ce semi-conducteur qui nous a interpellés grâce à ses propriétés plus qu'intéressantes le rendant malléable lors d'un traitement chimique de sa surface. Une étude approfondie nous a permis de recenser toutes les étapes par lesquelles doit passer le traitement de la surface d'un substrat de silicium, partant d'une étape de décontamination, suivi d'une étape de fonctionnalisation par silanisation et arrivant à une étape d'immobilisation des molécules sonde jouant le rôle de biorécepteur. Des étapes intermédiaires peuvent s'avérer nécessaires au bon fonctionnement de la plateforme. Chacune de ces étapes nécessite une validation grâce à une technique appropriée. L'objectif final de ce travail est d'arriver à une compréhension approfondie du fonctionnement d'un biocapteur sur silicium à travers les arguments nécessaires trouvés dans la littérature.

Abstract

The field of biosensors has attracted increasing interest in the last decade. Many studies and experiments have been carried out in this field leading to spectacular results in the field of biology, medicine, agribusiness etc ... The results obtained in this area have generated a very rich bibliography, encouraging us to choose this area for do our study. We used the literature to build a final protocol that could lead to the development of a platform capable of detecting biological entities. Several interesting materials have contributed to the realization of these platforms including silicon, this semiconductor that has challenged us with its more than interesting properties making it malleable during a chemical treatment of its surface. An in-depth study allowed us to identify all the steps that must pass the treatment of the surface of a silicon substrate, from a decontamination step, followed by a step of functionalization by silanization and arriving at a step d immobilization of probe molecules acting as a bioreceptor. Intermediate steps may be necessary for the proper functioning of the platform. Each of these steps requires validation through an appropriate technique. The ultimate goal of this work is to arrive at a thorough understanding of the functioning of a silicon biosensor through the necessary arguments found in the literature.

ملخص

اجتذب مجال أجهزة الاستشعار الحيوية اهتمامًا متزايدًا في العقد الماضي. تم إجراء العديد من الدراسات والتجارب في هذا المجال مما أدى إلى نتائج مذهلة في مجال البيولوجيا والطب والأغذية الزراعية الخ ... النتائج التي تم الحصول عليها في هذا المجال قد ولدت ببليوغرافيا غنية للغاية ، شجعنا على اختيار هذا المجال للقيام دراستنا. استخدمنا المراجع لبناء بروتوكول نهائي يمكن أن يؤدي إلى تطوير منصة قادرة على اكتشاف الكيانات البيولوجية. لقد ساهمت العديد من المواد المثيرة للاهتمام في تحقيق هذه المنصات بما في ذلك السيليكون ، هذا أشباه الموصلات الذي تحدى لنا مع خصائصه أكثر من مثيرة للاهتمام مما يجعلها قابلة للطرق خلال المعالجة الكيميائية لسطحه. سمحت لنا دراسة متعمقة بتحديد جميع الخطوات التي يجب أن تجتاز معالجة سطح ركيزة من السيليكون ، من خطوة إزالة التلوث ، تليها خطوة الوظيفية عن طريق silanization والوصول إلى خطوة تجميد جزيئات التحقيق التي تعمل بمثابة مستقبل بيولوجي. قد تكون الخطوات المتوسطة ضرورية لتشغيل النظام الأساسي بشكل صحيح. كل خطوة من هذه الخطوات تتطلب التحقق من صحتها من خلال تقنية مناسبة. الهدف النهائي من هذا العمل هو التوصل إلى فهم شامل لأداء جهاز استشعار السيليكون من خلال الحجج اللازمة الموجودة في المراجع.