

Ref 1

N° D'ORDRE : 2001-24

Année 2001

THESE

Présentée devant

L'Ecole Centrale de Lyon

Pour obtenir le grade de DOCTEUR

Spécialité : **Electronique, Electrotechnique et Automatique**

CONTRIBUTION A L'ELABORATION ET A LA LECTURE DES PUCES A ADN

Par François BESSUEILLE

Soutenue le 26 Novembre 2001 devant la commission d'Examen :

Jury M.M. :

D. HAUDEN	Président
P. FABRY	Rapporteur
C. PIJOLAT	Rapporteur
M.L. VIRIOT	
E. SOUTEYRAND	
M. GARRIGUES	
J.R. MARTIN	

Laboratoire d'Ingénierie et de Fonctionnalisation des Surfaces

Ecole Centrale de Lyon T19-123
Ecole Centrale de Lyon
BIBLIOTHEQUE
36, avenue Guy de Collongue
F - 69134 ECULLY CEDEX

Je tiens à remercier, tout d'abord, les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail de thèse. J'ai beaucoup apprécié la richesse des observations formulées lors de la soutenance et l'implication de chacun dans la discussion.

Monsieur D. Hauden, professeur au LPMO (CNRS) de Besançon, m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Messieurs P. Fabry, professeur à l'ENSEEG de St Martin d'Hères et C. Pijolat, maître de recherche à l'ENSMST de St Etienne, ont accepté la lourde charge d'être rapporteurs de ces travaux de thèse.

Madame M.L. Viriot, professeur au DCPR-GRAPP de Nancy, a suivi dès le départ mon travail. Elle m'a fait profiter de ses connaissances dans les domaines de la fluorescence et de la photochimie, lors de nos rencontres dans le cadre du programme « Génome » du CNRS, et de ses conseils pour la rédaction de mon manuscrit.

Madame E. Souteyrand, directeur de recherche au Laboratoire IFoS de l'Ecole Centrale de Lyon, a eu la patience de tenter de me communiquer ses qualités d'organisation, la gentillesse de corriger mon manuscrit, et le mérite de parvenir à coordonner les divers travaux des laboratoires du projet « ROSA » du programme « Génome », pour les puces à ADN.

Monsieur M. Garrigues, Directeur de recherche au LEOM de l'Ecole Centrale de Lyon, m'a accueilli au sein de son laboratoire et m'a aidé à m'y intégrer. Il m'a initié aux subtilités de l'optique et aux possibilités de l'électronique et de ses technologies de fabrication.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à Monsieur Jean-René Martin, professeur à l'Ecole Centrale, mon directeur de thèse. Il m'a beaucoup apporté par la profondeur et la variété de ses connaissances ; son abord personnel des problèmes scientifiques et techniques, sa passion pour la recherche, sa patience et sa gentillesse. Je lui en exprime toute ma gratitude.

Je tiens à remercier Monsieur Francis Gallibert, coordinateur du programme CNRS Génome. Son soutien au projet ROSA et les compétences de tous les membres des équipes concernées ont créé une émulation scientifique pluridisciplinaire très enrichissante pour moi. Que tous en soient remerciés.

Je remercie particulièrement Monsieur Yves Chevalier du LMOPS de Vernaison qui m'a aidé par ses connaissances de la Chimie et m'a permis de réaliser des caractérisations RMN et IR au sein de son laboratoire.

J'ai également apprécié de collaborer étroitement avec le LEOM. La compétence et la disponibilité de Monsieur Jean-Louis Leclercq et de Madame Marie-Paule Besland m'ont permis de m'initier au travail de technologie en salle blanche ainsi qu'à la spectrométrie XPS.

Je tiens à remercier Viktor Vikulov de l'Université de Kiev, dont la collaboration m'a été précieuse pour l'élaboration du silicium poreux et l'initiation à la gastronomie ukrainienne.

J'adresse enfin tous mes remerciements aux membres du laboratoire de physicochimie des interfaces, dans lequel j'ai réalisé mon DEA et ma thèse dans une ambiance sympathique.

Merci à J.P. Chauvet, M.Cabrera, J.P. Cloarec, J. Broutin, M. Jabert de l'équipe Génome. Merci également aux stagiaires, thésards, techniciens et secrétaires qui m'ont apporté leur concours.

Je remercie enfin mes camarades thésards avec lesquels j'ai partagé ces quelques années : Antoine, Frida, Edouard, Dominique, Chichen, et surtout Marlène Bras, ma colocataire de bureau, Michel Provence, Vincent Dugas et Jean-François Damlencourt, trois montagnards dont le travail, les idées et l'amitié ont beaucoup apporté à ces travaux et à moi-même.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	1
Introduction	3
CHAPITRE I Principes et objectifs	5
1 DE L'ADN AUX PUCES A ADN	5
1.1 L'ADN	5
1.2 L'hybridation.....	5
1.3 Les puces à ADN.....	7
2 ELABORATION DE PUCES A ADN.....	9
2.1 Fonctionnalisation de substrats de type Si/SiO ₂	9
2.2 La synthèse d'ADN	10
2.3 Synthèse d'ADN et stratégies de synthèses localisées.....	11
2.4 La synthèse combinatoire et le séquençage	12
3 TYPES D'ADRESSAGE ENVISAGES	14
4 LECTURE DE PUCES A ADN	14
CHAPITRE II Mise au point et développements d'outils spécifiques.....	17
1 LE SILICIUM POREUX	17
1.1 Généralités.....	17
1.2 Protocoles opératoires	20
1.3 Conditions opératoires retenues.....	21
1.4 Caractérisation des échantillons obtenus après attaque électrochimique	21
1.4.1 Le type n.....	21
1.4.2 Le type p+	28
1.5 Etude gravimétrique	33
1.6 Oxydation du silicium poreux : Traitement thermique	34
1.7 Conclusion.....	40
2 LA SYNTHESE MACROSCOPIQUE.....	40
3 LECTURE DES PUCES	41
3.1 Principe de la méthode des mesures d'impédances électrochimiques et optoélectrochimiques	41
3.2 Utilisation des mesures d'impédances	47
3.2.1 Influence des modifications de surface.....	47
3.3 Impédance optoélectrochimique.....	49
3.4 Réalisation d'un montage de mesures optoélectrochimiques à l'échelle microscopique	53
3.4.1 Montage.....	53
3.4.1.1 Types de montages.....	53
3.4.1.2 Influence de la focalisation	56
3.4.1.3 Montage à deux électrodes.....	57
4 LE MICROTAMPONNAGE (MICRO-CONTACT PRINTING).....	60
4.1 Principe	60
4.1.1 Stratégies de multifonctionnalisation.....	61
4.2 Elaboration des tampons.....	62
4.2.1 Conception des masques.....	62
4.2.2 Lithographie	63
4.2.3 Gravures sèches et humides du silicium	63
4.2.3.1 Gravure humide	63
4.2.3.2 Gravure sèche	63
4.2.4 Modification chimique de surface	65

4.2.5	Obtention de tampons par moulage	66
4.3	Mise en œuvre et protocole de transfert	66
4.4	Caractérisations et résultats obtenus	66
5	LA MICROFLUIDIQUE : TECHNIQUE D'ADRESSAGE DE REACTIONS CHIMIQUES	73
6	OPTIMISATION DES STRUCTURES POUR LA LECTURE PAR FLUORESCENCE	79
7	ETUDE DE LA FAISABILITE DE L'ADRESSAGE PAR JET.....	80
CHAPITRE III Mise au point des protocoles de chimie de surface.....		83
1	LE PRETRAITEMENT DES SUBSTRATS	83
2	FONCTIONNALISATION DE SUBSTRATS Si/SiO ₂	87
2.1	La silanisation en milieu non anhydre	87
2.2	Les couches auto-assemblées	89
3	LE GPTS (Glycidoxypropyltriméthoxysilane).....	91
3	LE GPTS (Glycidoxypropyltriméthoxysilane).....	91
4	LE GPMS (Glycidoxypropyldiméthyléthoxysilane).....	94
5	LE CHLORODIMETHYLSILYLUNDECANOATE DE METHYLE (CDSUM)	100
6	MISE EN ŒUVRE D'UN AMINO-ESPACEUR.....	104
7	CONCLUSION	107
CHAPITRE IV Résultats expérimentaux : Caractérisation de l'hybridation et lecture des puces .		108
1	SPECTROMETRIE XPS	108
1.1	Introduction	108
1.2	Résultats expérimentaux.....	108
2	LES MESURES ELECTROCHIMIQUES.....	115
2.1	Sensibilité / reproductibilité / résolution.....	115
2.1.1	Le silicium poreux.....	121
2.1.2	Les différents silanes	122
2.1.3	Les dépôts d'ADN sur SiO ₂ + hybridation.....	125
2.1.4	Les dépôts d'ADN sur silane + espaceurs.....	132
3	LE SILICIUM POREUX : UTILISATION COMME SUPPORT POUR LES PUCES A ADN .	136
4	LECTURE DES PUCES A ADN PAR MESURES DE FLUORESCENCE	144
4.1	Etude sur les macropuces – Synthèse in-situ sur H ₂ N-POE	144
4.1.1	Reproductibilité : puce FVP1	144
4.1.2	Sélectivité : puce MM	147
4.1.3	Sensibilité : Puce S8.....	152
4.2	Optimisation des substrats	155
4.2.1	Puce mixte : optimisation optique de substrats – comparaison de la synthèse in situ et de l'immobilisation ex situ d'oligonucléotides.....	155
4.2.2	Puce Pointe : optimisation de la fluorescence par « effet d'antenne »	162
Conclusion		165
Bibliographie		167
ANNEXE 1 Mode opératoire et protocoles d'hybridation		175
ANNEXE 2 La cartographie de fluorescence.....		176
ANNEXE 3 Utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)		178
ANNEXE 4 Utilisation de la microscopie à force atomique.....		180
ANNEXE 5 Le mouillage.....		183
ANNEXE 6 Hydrolyse et activation des esters greffés		186
ANNEXE 7 Spectrométrie XPS		188
ANNEXE 8 Protocoles de synthèse pour synthétiseurs EXPEDITE		191

INTRODUCTION

En 1962, Watson, Wilkins et Crick ont reçu le prix Nobel de médecine et de physiologie pour leurs travaux sur la structure de l'ADN (acide désoxyribonucléique). Leur découverte est à l'origine de progrès constants dans le domaine de la biologie moléculaire.

De nombreuses techniques d'étude telles que les techniques de génotypage et de phénotypage, sont basées sur l'hybridation entre acides nucléiques de séquences complémentaires. Ces travaux permettent de connaître, entre autres, la relation gène/protéine, d'étudier l'expression des gènes ou leurs mutations et les effets de ces phénomènes. En raison de la lourdeur et du coût des techniques actuelles, seuls quelques laboratoires spécialisés les utilisent, ce qui limite considérablement leur application pour le diagnostic et les investigations scientifiques. Cette lacune révèle le besoin d'outils rapides, puissants, bon marché et diversifiés.

Dans ce contexte, les puces à ADN représentent une nouvelle approche pour la biologie moléculaire. Cet outil, qui sera produit à grande échelle, permet d'envisager une évolution rapide vers des systèmes moins complexes et peu coûteux, décuplant la recherche fondamentale et créant de nouveaux marchés pour l'industrie, par la multiplication des tests génétiques de routine. Ce dernier aspect suscite une activité de recherche autour du développement des puces. Beaucoup de capitaux privés ont été investis. Les états qui désirent avoir une autonomie d'investigation dans la lecture des codes génétiques ont financé de nombreux programmes de recherche publique. C'est ainsi que le programme GENOME a été initié par le CNRS en 1997. Différents projets ont été retenus, dont le projet R.O.S.A., coordonné par J.R. Martin et E. Souteyrand, au laboratoire IFoS de l'Ecole Centrale de Lyon. Son objectif est de développer une technologie pour la réalisation et la lecture de puces à ADN. C'est dans le cadre de cette recherche que s'inscrit mon travail de thèse, qui a été mené plus particulièrement en collaboration avec le LMOPS de Vernaison, le LEMS de l'Université Lyon I et le LEOM de l'Ecole Centrale de Lyon.

Le concept de la puce est simple : il associe le principe de l'hybridation moléculaire aux possibilités de miniaturisation et d'automatisation qu'offrent la microélectronique et la microtechnologie. L'élaboration des puces consiste à fixer de façon robuste (covalente si possible) des mono-brins d'ADN, ou à les synthétiser, sur un support solide. Cette opération ne doit pas entraver leur capacité de reconnaissance (hybridation) et doit permettre une répartition et une densité de brins bien contrôlées. De ces derniers paramètres dépendent les performances de la puce en terme de reproductibilité, sensibilité, quantification des réponses, possibilités de réutilisation.

Le fonctionnement de la puce à ADN est basé sur le principe de l'hybridation de deux brins d'ADN de séquences complémentaires. L'un, de séquence connue (sonde) est fixé sur la puce, l'autre (cible) provient d'une solution mise en contact avec la puce. La puce est constituée d'un grand nombre de sites de petites tailles surfaciques ; chaque site supporte un ensemble de brins d'ADN de séquence identique et connue ; l'ensemble des sites est formé de sondes de séquences différentes ; ce réseau constitue un multidétecteur. Lorsque les brins-cibles de la solution mise au contact présentent une séquence complémentaire à celle des brins-sondes portés par un site, l'hybridation a lieu sur ce site, permettant ainsi d'identifier une partie de la séquence de la cible.

Le titre de cette thèse : « Participation à l'élaboration et à la lecture de puces à ADN » ouvrait un vaste champ de recherches. Il invitait à s'intéresser à des domaines très différents, tels que la chimie, l'électrochimie, la microtechnologie, la spectrométrie... Les travaux réalisés et leurs résultats sont consignés dans ce mémoire. Après une description des puces à ADN et des options retenues pour leur élaboration et leur lecture, nous détaillons la mise au point et le développement d'outils spécifiques dans le deuxième chapitre. Le chapitre suivant est consacré à la fonctionnalisation des substrats. Dans une dernière partie, nous présentons les principaux résultats concernant les puces et leur caractérisation, ainsi que quelques extensions au-delà des objectifs initiaux.

CHAPITRE I

PRINCIPES ET OBJECTIFS

1 DE L'ADN AUX PUCES A ADN

1.1 L'ADN

A l'état naturel, à l'échelle moléculaire, l'ADN est constitué de deux chaînes polymériques accolées. Chaque chaîne est formée d'un squelette sucres-phosphates (liaison phosphodiester) et de quatre bases hétérocycliques différentes fixées sur les sucres : l'adénine (A), la guanine (G), la cytosine (C) et la thymine (T) -ou l'uracile (U) dans l'acide ribonucléique (ARN). Par convention une chaîne oligonucléotidique simple brin (structure primaire) est décrite du côté 5' vers 3' (position des alcools du sucre). Deux brins complémentaires forment une structure secondaire (double brin / duplex) hélicoïdale où les bases s'associent entre elles par des liaisons hydrogène. Dans cet appariement les deux brins sont antiparallèles : deux oligonucléotides complémentaires s'apparient 5'-3' et 3'-5'. Watson et Crick ont reçu le prix Nobel pour la découverte de cette structure ([3], [6]).

1.2 L'hybridation

L'hybridation moléculaire est l'association de deux acides nucléiques simples brins, de séquences complémentaires. Elle conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Cette association s'effectue par création de liaisons hydrogène entre les bases hétérocycliques de chaque brin. Ces liaisons sont spécifiques : deux liaisons entre l'adénine (A) et la thymine (T), et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G) (voir figure 1.2-1).

Les bases azotées s'apparient deux à deux, lors de l'hybridation, de façon spécifique, en fonction de leurs capacités à former des liaisons hydrogène.

Ces associations spécifiques et la succession des bases en séquences constituent le codage qui supporte l'information génétique.

A = T 2 liaisons Hydrogène
 G ≡ C 3 liaisons Hydrogène

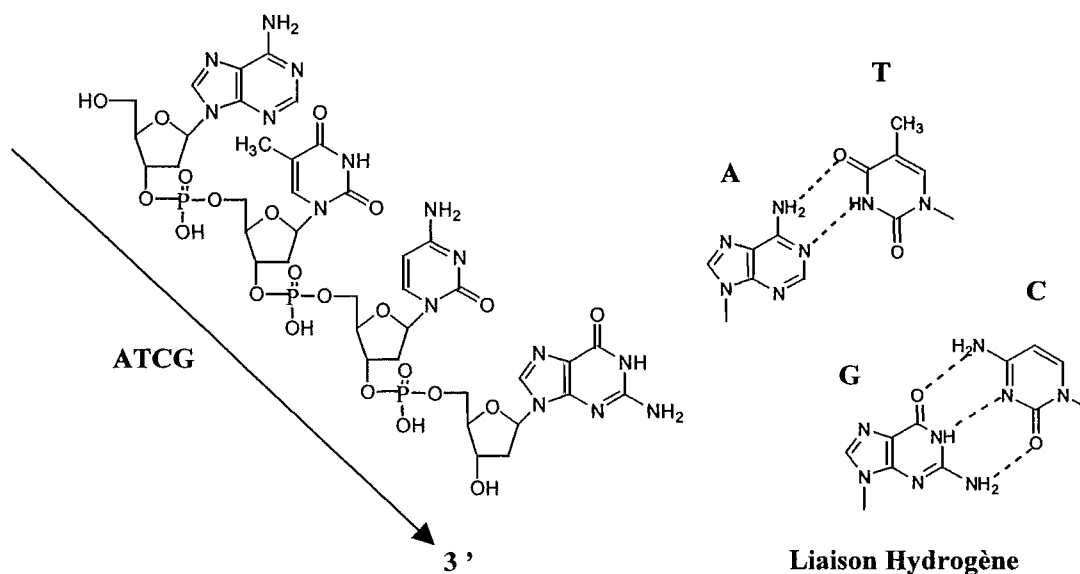


Figure 1.2-1 : Représentation d'un brin d'ADN et des liaisons hydrogène spécifiques entre bases azotées.

De nombreuses techniques de biologie moléculaire sont basées sur l'hybridation entre acides nucléiques de séquences complémentaires. Le brin, dont la séquence est connue, est appelé : sonde ; l'autre brin, inconnu, constitue la cible. Les puces à ADN sont constituées de nombreuses sondes (oligonucléotides, cADN...) immobilisées sur un support. Les zones d'intérêt de l'ADN à étudier sont amplifiées et le plus souvent marquées, avant d'être mises en présence de la puce, ceci afin d'autoriser les possibles hybridations. Après différents lavages, les zones où l'hybridation s'est produite peuvent être détectées (lecture de la puce), ce qui permet de déterminer la séquence des cibles, après traitement informatique. Par une seule opération rapide on obtient ainsi un grand nombre d'informations : recherche des mutations, typage complet des gènes, étude et comparaison de leur expression. On peut également envisager la détection de micro-organismes.

Les premières applications des puces à ADN couvrent de nombreux domaines : biologie moléculaire (Sohail 2000, Westin 2000, Khodursky 2000), agroalimentaire (Aharoni 2000), séquençage de génomes (Brown 1999, Chee 1996, Diehn 2000, Shalon 1998, Parinov 1996), recherche fondamentale (Drobyshev 1999, Fotin 1998, Mir 1999, Southern [1],[2]&[3] 1999, 1996&1994, Vainrub 2000, Stomakhin 2000), diagnostic médical et recherche thérapeutique, analyses de mutations et polymorphisme (Hacia [1]&[2] 1998&1999, Proudnikov 2000, Kurg 2000), pharmacie (Nau 2000, Vahey 1999), recherche génétique (Pinkel 1998, Pollack 1999), expression des gènes (Lipshutz 1999)...

1.3 Les puces à ADN

« Puce à ADN » est un nom générique donné à de nombreux dispositifs issus de la biotechnologie, dont la caractéristique commune est d'être un multi-détecteur d'hybridations moléculaires d'acides nucléiques (Le Toullec 1998, Libération, 28-29/10/2000). Les puces à ADN sont donc des supports d'hybridation de grande capacité dont les prédécesseurs étaient les membranes utilisées dans les tests de diagnostic basés sur la technique du « reverse dot-blot ». On distingue, parmi ces supports, deux catégories principales :

1. Les substrats passifs uniquement voués à la fixation des sondes. Les principaux substrats passifs sont :
 - les verres fonctionnalisés (polylysine, silanes hydroxylés, aminés, époxydés ...).
 - les polymères comme le polyacrylamide, le polypropylène aminé ou carboxylé comme les plaques de microtitration.
2. Les substrats actifs qui supportent les sondes et qui interviennent aussi dans la transduction du signal d'hybridation constituant la lecture de la puce. Les principaux substrats actifs sont :
 - Les surfaces métalliques (Au, Pt, Ag), métaux conducteurs pouvant servir d'électrodes, pour une transduction électrochimique, mais aussi pour les microbalances à quartz. Ces matériaux se retrouvent en couche fine (typiquement 60 nm) pour la transduction optique dans les techniques SPR sur prismes ou sur fibres.
 - Les surfaces d'oxyde de silicium, comme dans les fibres optiques, éléments de transduction de signaux de fluorescence, ou la silice thermique recouvrant la majorité des substrats de silicium issus des dispositifs d'électronique (FET, photodiode, CCD, EDS...).

La diversité de ces dispositifs, tant au niveau de leur constitution, leur capacité, leurs finalités que de leur conception, leur fabrication et leurs performances impose l'établissement d'une classification renseignant sur leurs caractéristiques. Les principaux critères sont :

- La capacité d'une puce, qui représente le nombre d'informations élémentaires (hybridations) que peut fournir la puce. Cette capacité dépend de la taille des puces et du nombre de plots de sondes de séquences différentes. On distingue en général trois catégories de puces :
 - Puces de basse intégration : jusqu'à quelques centaines de plots.
 - Puces de moyenne intégration : avec quelques milliers de plots.
 - Puces de haute intégration : au-delà de dix mille plots.
- La constitution des puces, qui est fonction des supports et des types de sondes. Le choix des supports est lié à leur mode de lecture (transduction / support actif / passif). Les sondes peuvent être des fragments naturels ou issus du génie biologique (transcrits, PCR, présynthétisés...) que l'on fixe sur le support ou des sondes issues de synthèses directes effectuées sur le support (oligonucléotides, PNA ...).
- La conception et la fabrication des puces. Deux caractéristiques sont à prendre en compte :
 - La chimie de surface, qui représente le mode de liaison entre support et sonde (Adsorption / Chimisorption).
 - Le type d'adressage des sondes, qui permet de former des plots individualisés. La localisation des réactions d'adsorption, d'accrochage ou de synthèse directe des sondes à la surface des supports dépend de la technologie utilisée (photochimie, fluïdique, jet, « spotter »...).

A l'heure actuelle, les biopuces, et plus particulièrement les puces à ADN, sont des systèmes en pleine émergence. Aucune technologie ne s'est encore imposée pour un véritable développement

industriel. De nombreuses pistes sont explorées (Wallraff 1997, @[3], Berney 2000, Moore 2001, Yang 1997, Kurian 1999, Hoheisel[1] 1997, Pease 1994, Livache[1],[2]&[3] 1998, 1998&1994, Steemers 2000, Crabtree 2000, Vasiliskov 1999, Heller 2000, Souteyrand [1]&[2] 2000&1997)). Le laboratoire IFoS participe à cette exploration technologique en essayant, par ses diverses recherches, de définir une filière fiable pour la fabrication et la lecture de puces à ADN.

Ce travail de thèse s'inscrit dans l'activité de l'équipe « Bio ingénierie et Reconnaissance Génétique » du laboratoire IFoS soutenue par le CNRS et la région Rhône-Alpes. Il est mené conjointement dans le cadre de deux thématiques qui ont trait, d'une part, à l'élaboration des puces (ROSA CNRS), et, d'autre part, à l'optimisation de leur lecture (Région).

Les trois principaux axes de travail de ces projets se situent dans les domaines suivants :

- Chimie de surface : fonctionnalisation.
- Technologies d'adressage : écriture des puces.
- Technologies de détection de l'hybridation : lecture des puces.

Ces projets visent à la réalisation, à l'utilisation, et à la lecture de puces de grande capacité (4096 plots sur 4 cm²).

Tout au long de ma thèse, j'ai dû essayer de répondre à deux objectifs, parfois difficilement conciliables, du projet :

1. Fournir rapidement des supports et des puces fonctionnelles, mais non encore optimisées, aux autres partenaires.
2. Effectuer des études plus spécifiques, échelonnées tout au long de la thèse, afin d'optimiser les solutions mises en œuvre, ou de proposer des alternatives originales.

Notre équipe se proposait de mettre au point la technique de lecture directe de l'hybridation par mesure opto-électronique, à travers des mesures d'impédances opto-électrochimiques sur des structures EDS (Electrolyte/Diélectrique/Solution) du type Si/SiO₂, ceci conjointement aux validations de nos travaux par les techniques de détection classiques de radio-marquage et de mesures de fluorescence.

Les structures EDS du type Si/SiO₂ ont donc été choisies comme supports de référence et point de départ pour mon travail.

Les objectifs découlant de ce choix sont :

- la fonctionnalisation des substrats de type Si/SiO₂.
- l'adressage des réactions chimiques de synthèse ou d'accrochage d'oligonucléotides sur les substrats préalablement fonctionnalisés.
- l'étude de la lecture opto-électrochimique à l'échelle microscopique.
- la caractérisation et l'optimisation des étapes d'élaboration, d'utilisation et de lecture des puces.

2 ELABORATION DE PUCES A ADN

2.1 Fonctionnalisation de substrats de type Si/SiO₂

Dans le cadre de la réalisation de puces à ADN, la fonctionnalisation des substrats peut être définie comme étant l'élaboration d'une couche intermédiaire entre la surface des substrats et les brins d'ADN, destinée à lier les sondes, d'une manière robuste, à la surface, tout en assurant leur entière fonctionnalité biologique (propriété d'hybridation).

Les substrats de type Si/SiO₂ sont fonctionnalisés de façon covalente par des dérivés du silane SiH₄, portant des groupements hydrolysables, substitués à l'hydrogène (alkoxy, chloro, diméthylamino) et une chaîne organique carbonée, greffée par hydrosilylation. Le choix du nombre de groupements hydrolysables définit la structure du film déposé. La nature du groupement hydrolysable définit la réactivité du silane lors de la silanisation du support. Les fonctions portées par la chaîne carbonée engendrent la réactivité de la surface après silanisation. Elles représentent l'extrémité réactive, à partir de laquelle la synthèse d'oligonucléotides peut être menée, ou bien le greffage chimique de brins présynthétisés. La reproductibilité des couches préparées implique la maîtrise de leur formation par le choix du type de silane et du protocole de silanisation. Les mesures d'impédance électrochimique, la maîtrise de l'adsorption non spécifique, la maximisation du signal ainsi que la stabilité de la couche vis-à-vis d'agressions externes nous orientent vers le choix de monocouches compactes de silanes qui permettent l'obtention d'une forte densité d'oligonucléotides. Il nous faut donc éviter la polymérisation du silane, qui entraîne des problèmes de contrôle de surface et d'adhésion ou de décohésion, liés à la condensation, ou à l'hydrolyse, a posteriori, des plots de silanes formant des couches du type polymère.

Des études antérieures, menées avant mon entrée dans le laboratoire, ont montré que les couches polymères, réalisées à partir de silanes trifonctionnels, tels que l'aminopropyltriméthoxysilane (APTS) ou le glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTS) ont une épaisseur de l'ordre de plusieurs nanomètres, sont irrégulières, et ont tendance à se desquamer sous l'effet d'agents chimiques, entraînant avec eux les brins d'ADN fixés. Ainsi ce type de couche d'accrochage ne permet guère la reproductibilité nécessaire pour l'étude du comportement biologique des structures réalisées. Cette absence de reproductibilité a été notamment mise en évidence lors de mesures d'impédances électrochimiques. L'équipe que j'ai rejointe maîtrisait déjà différents protocoles de greffage à chaud du GPTS dans le toluène, en atmosphère anhydre (travaux du LMOPS, thèse de J-P Cloarec). Ces méthodes permettaient d'éviter la polymérisation du silane tri-fonctionnel, tout en assurant un taux de greffage élevé, grâce à la température et à l'ajout de catalyseurs aminés. Les conditions d'anhydricité étant contraignantes et coûteuses, nous avons projeté d'utiliser un silane mono-fonctionnel, comme le GPMS commercial dont l'éventuelle condensation se limite à la formation de dimères ne pouvant pas réagir sur la silice.

D'autres types de silanes peuvent être intéressants et feront l'objet d'études. Différentes fonctions terminales et différentes longueurs de chaînes carbonées peuvent permettre d'optimiser la chimie de surface autant pour le greffage avec utilisation des propriétés des SAM's (couches auto-assemblées) que pour les propriétés physicochimiques de surface, ou pour la réactivité chimique postérieure à la silanisation ([8]).

Ces étapes de fonctionnalisation de la silice thermique seront suivies et caractérisées par des moyens physicochimiques (mouillage), ou spectrométriques (spectrométrie infrarouge (IR), résonance magnétique nucléaire (RMN), spectrométrie de photo-électrons (XPS)), ou électrochimiques (mesures d'impédance (EDS)), ou encore par microscopie optique ou par champs proches (AFM).

2.2 La synthèse d'ADN

La synthèse chimique de l'ADN découle de travaux qui ont permis de mettre au point des protocoles de synthèse efficaces des points de vue cinétique et rendement de couplage ([6]). Certains de ces protocoles sont maintenant utilisés en routine dans des appareils automatiques. Ils font intervenir un cycle de réactions successives, dont la plupart nécessite un milieu parfaitement anhydre. Ils sont basés sur la condensation de phosphoramidites (voir figure 2.2-1) constituées d'un maillon phosphato-désoxyribose supportant une des quatre bases azotées. Les phosphoramidites comportent en 3' du sucre, le groupement amidite très réactif. Afin d'éviter l'auto-condensation spontanée des phosphoramidites, le groupement alcool 5' du sucre est protégé par un groupement diméthoxytrityl (DMT). Par ailleurs, pour empêcher toute réaction parasite, les amines des bases hétérocycliques sont également protégées.

La synthèse de l'ADN sur support solide nécessite, à la surface du substrat, des fonctions amines ou alcools, pour s'initier (Pon 1988). La chimie employée dans nos synthèses est la chimie, qui met en jeu les phosphoramidites. Sa mise en œuvre intervient par l'intermédiaire d'un synthétiseur d'ADN automatisé, couplé à un dispositif permettant la synthèse à la surface de la puce. La synthèse s'effectue dans le sens 3' vers 5' en raison de la réactivité accrue de la fonction alcool primaire 5' par rapport à la fonction alcool secondaire en 3' du sucre. Cette chimie est généralement utilisée dans les synthétiseurs sur des colonnes de synthèse « fonctionnalisées amine » et portant déjà un premier nucléotide protégé par un groupement trityl (DMT) à son extrémité 5'.

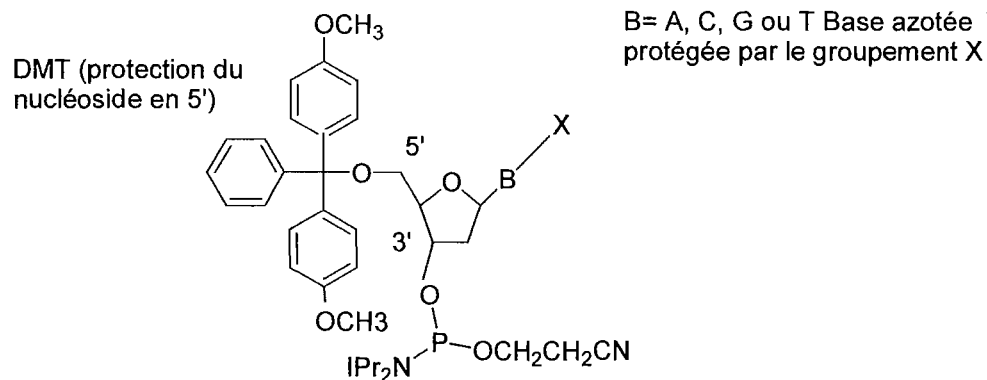


Figure 2.2-1 : Représentation d'une phosphoramidite utilisée pour la synthèse chimique de l'ADN.

Le cycle de synthèse se décompose en quatre étapes ([6]) : il commence par une phase de déprotection des alcools 5' des nucléotides précédemment fixés (cette première étape est inutile pour initier la synthèse de la première base sur nos substrats). Dans la deuxième étape, la puce est mise au contact de la nouvelle phosphoramidite et de l'activateur : c'est l'étape de couplage de la nouvelle base. La troisième étape est une passivation des alcools 5' des précédentes bases, n'ayant pas réagi lors de la phase de couplage. Cette phase est nommée « capping » et se concrétise par l'estérification de tous les OH 5' libres par l'acide trichloroacétique. La quatrième étape est l'oxydation des phosphores du degré d'oxydation III au degré V par l'iode, en créant ainsi la liaison phosphodiester très robuste. Ces quatre étapes, entrecoupées de lavages avec le solvant de synthèse, en l'occurrence, l'acétonitrile, sont répétées pour chaque base que l'on veut ajouter au nucléotide. La structure chimique finale des oligonucléotides est obtenue en déprotégeant toutes les bases par un traitement prolongé dans l'ammoniaque concentrée.

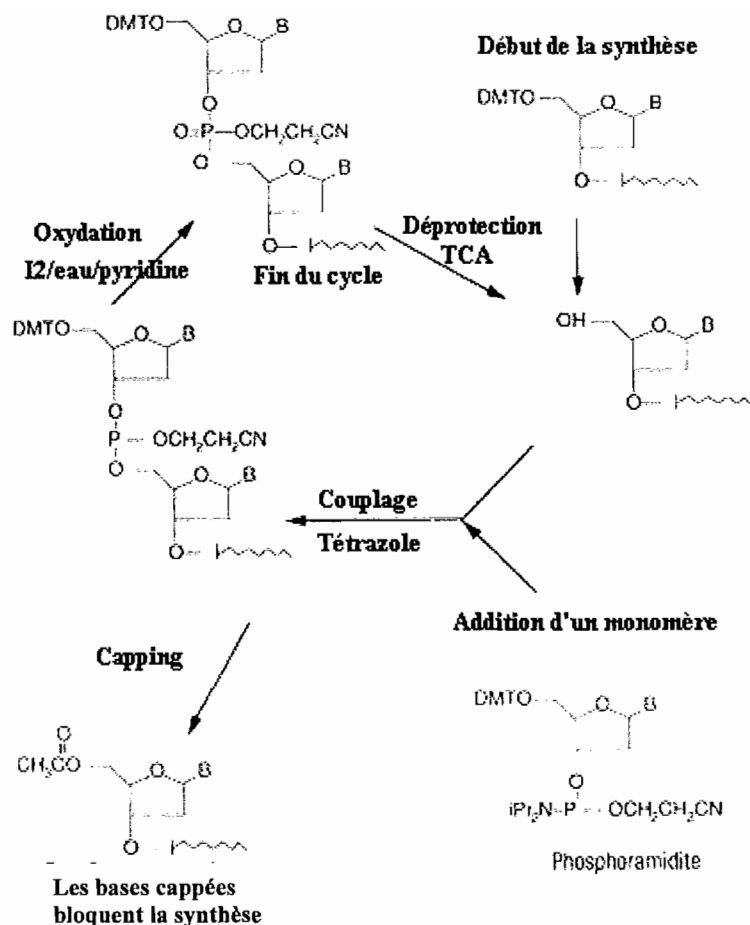


Figure 2.2-2 – Cycle de synthèse d'acides nucléiques sur support solide par la chimie des phosphoramidites

2.3 Synthèse d'ADN et stratégies de synthèses localisées

La première étape, la déprotection, est une hydrolyse acide de la fonction ODMT 5' en alcool par l'acide trichloroacétique (TCA). Cette étape peut être mise à profit pour l'adressage des réactions de synthèse d'ADN, ce que fait la société américaine AFFYMETRIX, leader mondial pour la fabrication de puces à ADN. En effet, on remplace le TCA par une solution contenant des précurseurs d'acides photolabiles. Une insolation, par des systèmes lithographiques (masques) au niveau de la surface de la puce, génère l'acide, et ainsi, une déprotection localisée des zones éclairées. Les 3 étapes suivantes de la synthèse peuvent être réalisées de façon collective, sur l'ensemble des sites de la puce, seuls les sites insolés et, donc, déprotégés réagiront.

Des groupements protecteurs autres que le DMT (diméthyltrityl) sont utilisés, notamment les groupements photolabiles comme le MeNPOC (Berroy 2001). Là encore, c'est à travers cette première étape de déprotection, que l'adressage des réactions de synthèse s'effectue à la surface des puces, par des procédés lithographiques. On peut noter une possibilité d'adressage par jets de TCA. Les zones atteintes par le TCA se trouvent déprotégées et permettent ainsi la suite de la synthèse.

La deuxième étape consiste à apporter les nouvelles phosphoramidites sur la puce pour la réaction de couplage, en les activant au dernier moment avec du tétrazol. Lors de ce couplage, on fait appel à la chimie du phosphore trivalent, plus réactif que le phosphore pentavalent. Si la déprotection de tous les plots de la puce est réalisée lors de la première étape, il est possible lors de cette étape de couplage, d'adresser les phosphoramidites sur les différents plots de synthèse, par projection par jet.

La troisième étape, dite de « capping », est une estérification des OH 5' des nucléotides qui ont été déprotégés lors de la première étape, mais qui n'ont pas réagi lors du couplage (deuxième étape). Le « capping » stoppe définitivement la synthèse sur ces nucléotides. Ceci évite les erreurs de séquences mais entraîne la présence d'oligonucléotides, qui ne sont que des fragments de la séquence souhaitée. Sans purification, la présence de ces chaînes, plus courtes, entraîne une augmentation du bruit de fond lors des étapes d'hybridation, car la température de fusion du duplex dépend du nombre de bases participant à l'hybridation. Le « capping » peut cependant être supprimé lors des synthèses, mais c'est au détriment de la pureté des séquences synthétisées.

La quatrième étape a pour objet l'oxydation du phosphore trivalent en phosphore pentavalent par l'iode en solution pyridine/eau. Cette réaction achève la formation du squelette de l'ADN, c'est-à-dire, l'enchaînement sucre-phosphate par des liaisons phosphodiester. On peut envisager de ne réaliser cette étape d'oxydation qu'une seule fois, pour toutes les bases, en fin de synthèse, afin de gagner du temps ou de limiter le temps de contact de la puce avec la solution oxydante.

Après les cycles de synthèse d'ADN, les phosphates et les bases hétérocycliques doivent être déprotégés par l'ammoniaque concentrée, pour obtenir des oligonucléotides fonctionnels.

De nouveaux groupements protecteurs (fast-deprotection) permettent de réduire le temps du traitement corrosif à l'ammoniaque concentrée de 12 à 2 heures, ce qui limite la détérioration des surfaces fonctionnalisées.

On peut noter que c'est lors de la déprotection du groupement phosphate (hydrolyse du cyanoéthyle) que les charges négatives portées par le squelette de l'ADN apparaissent. Cette étape pourrait être intéressante à analyser, par mesure d'impédance, pour caractériser les variations de charge liées à la synthèse de l'ADN. Ceci présentera peut-être aussi l'intérêt d'étalonner les mesures d'impédance en vue de mesures quantitatives. Les progrès de la chimie des synthèses d'ADN ont été très importants ces dernières années. Les rendements de couplage sont de plus en plus proches de 100%.

Hormis les étapes d'oxydation et de déprotection, toutes les autres étapes sont réalisées dans des conditions d'anhydricité très strictes, qui sont en relation étroite avec le rendement des étapes de synthèse. Le solvant généralement utilisé est l'acétonitrile (CH_3CN), qui présente les propriétés d'être obtenu et conservé très anhydre, d'être un bon solvant des phosphoramidites. Il possède, en outre, deux propriétés difficilement conciliables avec la synthèse localisée sur support solide : un grand pouvoir mouillant et une grande volatilité. Nous verrons ultérieurement les inconvénients liés à ces caractéristiques et les solutions que nous avons envisagées pour limiter leurs effets.

2.4 La synthèse combinatoire et le séquençage

La synthèse combinatoire permet d'élaborer des puces, en particulier pour le séquençage. Le séquençage par hybridation d'un brin d'ADN, tel qu'un gène, est en théorie possible. Il nécessite que toutes les séquences hybridées sur la puce se chevauchent, en étant décalées, chacune, d'une base par rapport à la précédente. Ceci implique l'utilisation d'une puce disposant de toutes les séquences combinatoires pour un nombre de nucléotides donné, c'est-à-dire la combinaison de tous les arrangements possibles des quatre bases constituant l'ADN.

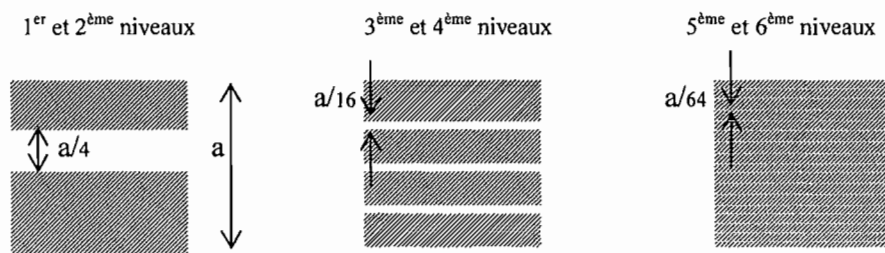
Le séquençage par ce procédé n'est possible que si, dans le brin d'ADN inconnu, il n'existe pas de répétition de séquences de longueurs égales ou supérieures à la longueur des séquences sondes. Si tel n'est pas le cas, il y a indétermination.

L'analyse probabiliste montre que la probabilité de rencontrer, dans un gène, deux fois la même séquence de douze nucléotides est très faible. Le séquençage d'un gène serait donc possible avec une puce à dodécamères. Mais le nombre de séquences nécessaires : 4^{12} , soit environ 16 millions, est actuellement irréalisable sur une seule puce. Pour l'instant, l'utilisation de ce type de puces, dont l'intégration n'atteint que quelques centaines de milliers de séquences, ne peut être envisagée que pour le reséquençage :

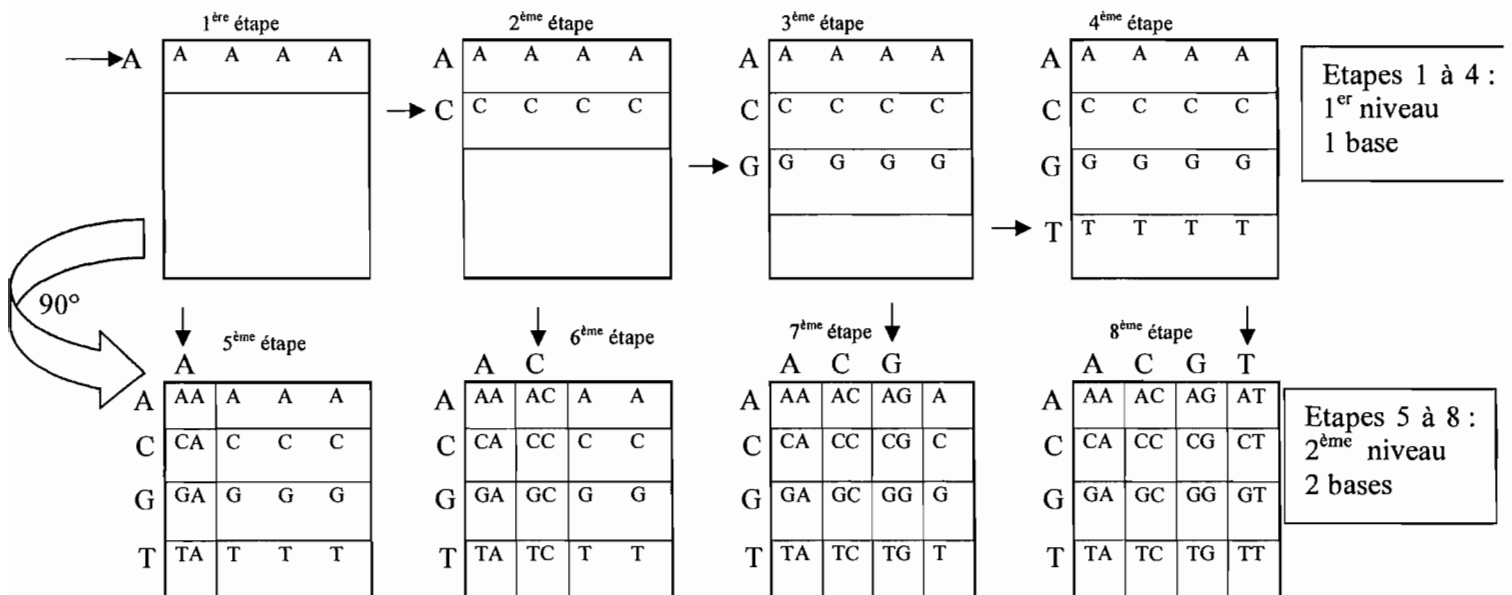
La sélectivité de l'hybridation étant bonne jusqu'à 25 mers (voir Chap IV 4.1.2), le traitement informatique nécessaire au recoupement des séquences sondes hybridées, pour la détermination de la séquence cible, est facilitée par l'utilisation de sondes les plus longues possibles. Par contre, plus la longueur des sondes est importante, plus le nombre de séquences différentes est important : pour des sondes de n bases de longueur, on obtient 4^n séquences différentes de cette longueur. La synthèse combinatoire est une solution à ce problème. Elle consiste à réaliser $4n$ étapes de synthèses successives sur la puce.

La photochimie et la microfluidique (Weiler 1996) sont deux techniques d'adressage, grâce auxquelles on peut réaliser des synthèses combinatoires. Le principe repose sur la localisation des synthèses, base par base, sur des bandes de surface de la puce. La synthèse localisée dans les bandes est réalisée par adressage des liquides, à travers un masque micro-usiné pour la microfluidique, ou par déprotection de groupements photolabiles localisée par des masques lithographiques pour la synthèse photochimique.

Masques :



Tous les deux niveaux de synthèse (ajout de deux nouvelles bases sur l'ensemble de la puce) la largeur des bandes précédentes est divisée par 4 et leur nombre est multiplié par 4. Entre chaque niveau de synthèse, l'axe des bandes de synthèse pivote de 90° .



En pratique les puces à séquencer gagneront en intérêt quand on pourra avoir toutes les possibilités sur 10 à 12 bases de longueur (puces haute intégration), soit quelques millions de plots. Une des principales difficultés liées à l'utilisation de ce type de puces est la variabilité des conditions d'hybridation intrinsèques à chaque séquence (Dockety 1995, Hoheisel[2] 1996). En effet, il arrive que les brins sondes présentent des structures secondaires (en « tête d'épingle ») qui modifient beaucoup leur capacité d'hybridation. Cette variabilité des conditions d'hybridation s'estompe avec la longueur croissante des séquences sondes. Il serait possible de remédier à ces écarts en procédant à

plusieurs lectures de la puce après des lavages de stringence différente et/ou en faisant varier la température.

3 TYPES D'ADRESSAGE ENVISAGES

La réalisation des puces à ADN requiert des procédés d'adressage de réactions chimiques, dans des zones définies, en taille et en position, à l'échelle microscopique.

Dans le cadre du projet « Génome », la conception, la réalisation et la mise en œuvre d'un système d'adressage par la lumière ont été prévues pour réaliser des puces par des procédés photochimiques de déprotection des phosphoramidites lors de la synthèse d'ADN in situ. Un photomasqueur par projection a donc été réalisé. Il sert à insoler les puces placées dans une cellule de synthèse dont la fluidique est couplée à un synthétiseur d'ADN automatisé. Cette technique permet d'effectuer des synthèses photochimiques combinatoires. La conception du photomasqueur est assurée par l'équipe du LEOM de l'ECL. La fabrication et la mise en œuvre des phosphoramidites modifiées sont faites par P. Berroy (Thèse SNPL 2001) et par l'Institut Pasteur de Paris.

Notre équipe réalise les connections et la mise au point du système. Par ailleurs, nous étudions la faisabilité d'une autre voie d'adressage, adaptée à la synthèse in situ et à l'accrochage de brins pré-synthétisés. Des dispositifs à jets, analogues à ceux des imprimantes à jet d'encre, seront utilisés pour l'adressage, à l'échelle microscopique, des réactifs. La maîtrise de l'environnement sera impérative pour la synthèse de l'ADN (anhydricité). Il faudra également veiller à la saturation de l'atmosphère pour éviter l'évaporation des gouttes projetées, dans lesquelles se produisent les réactions chimiques de couplage de phosphoramidites, ces gouttes étant de très faibles volumes.

La microfluidique est une autre technique d'adressage qui a été évaluée au cours de ce travail. Son principe repose sur des synthèses chimiques classiques, localisées par des masques micro-usinés, plaqués sur la puce.

4 LECTURE DE PUCES A ADN

Lire une puce à ADN, c'est obtenir un signal qui traduit la présence d'un processus d'hybridation dans une zone localisée de la puce.

Pour y parvenir, on peut recourir à différentes stratégies : les plus courantes consistent à marquer les acides nucléiques (cibles) à analyser : le marquage est réalisé en fixant préalablement sur le brin cible un groupement fluorophore ou un marqueur radioactif. Lors du processus d'hybridation de la cible sur la sonde greffée sur la puce, la cible apporte avec elle le marqueur et permet ainsi d'identifier le plot, donc la séquence où s'est effectuée l'hybridation. D'autres techniques, comme la détection électronique, mettent à profit les phénomènes physiques liés à l'hybridation moléculaire : variation de constante diélectrique, effet de champ, ou encore variation de masse comme pour la détection par microbalance à quartz.

La lecture « électronique » des puces à ADN par cartographie de mesure d'impédance optoélectrochimique sur des structures EDS du type Si/SiO₂ a été développée au sein de notre équipe et a été présentée en 1998 par C. Chen (thèse 1998), lors de sa soutenance de thèse à l'Ecole Centrale de Lyon. Ces travaux prouvaient la sensibilité des structures EDS aux variations de la modification de charges électriques qui peuvent être engendrées par l'hybridation moléculaire d'acides nucléiques au voisinage de la surface des structures.

La cartographie d'impédance optoélectrochimique est le plus simple des systèmes de détection électronique. Il n'implique aucun adressage in situ (sur la puce) du signal ; les différents plots de la puce sont « lus » de façon sélective par adressage externe (laser) d'un flux lumineux, à la différence des multidétecteurs tels que les électrodes (NICAM ou GENFET), qui nécessitent une connectique intégrée pour chaque plot.

C'est à la suite de ces travaux que nous avons réalisé un banc de mesures optoélectrochimiques adapté à la cartographie de puces à ADN à l'échelle microscopique. Dans un cadre plus large encore, il

a été établi l'intérêt des caractérisations et du suivi de l'évolution des structures dans chaque étape de leur élaboration par les mesures d'impédance électrochimique et optoélectrochimique.

Nous avons pu accéder à deux autres moyens de lecture des puces à l'Université Lyon I et au LEOM : la détection par radio-imageur (phosphore-imageur) et la cartographie de fluorescence sur un banc dérivé du type PL-Scan de Scantech.

De façon plus générale, les différentes méthodes de lecture des puces constituent une part importante des moyens de caractérisation pour l'élaboration, l'utilisation et la validation de nos structures.

Enfin la lecture et le traitement des données conditionnent le cahier des charges de l'élaboration des puces à ADN. En effet, une lecture directe et simplifiée des puces à basse densité implique un certain « design ». La lisibilité à l'échelle microscopique dépend de la qualité de l'adressage (définition spatiale des plots) et de l'homogénéité des surfaces, ce qui est capital pour la haute intégration.

CHAPITRE II

MISE AU POINT ET DEVELOPPEMENTS D'OUTILS SPECIFIQUES

1 LE SILICIUM POREUX

1.1 Généralités

La miniaturisation et le travail sur les surfaces (2D) ont souvent été un handicap pour la caractérisation des étapes d'élaboration de puces à ADN. Le manque de sensibilité des méthodes de caractérisation vis-à-vis de la petite quantité de matière soumise à analyse, nous a fait envisager l'élaboration de nouveaux substrats, développant une grande surface, à partir des structures Si/SiO₂.

Le silicium poreux est employé comme support, à grande surface spécifique, pour l'immobilisation de nombreuses « biomolécules » comme les enzymes, les anticorps, les fragments d'ADN. De plus, il a été montré que les propriétés électroniques ou optiques du silicium poreux, le rendent apte à servir de transducteur dans des capteurs d'interaction biologique (Janshoff 1998, Min 2000, Bayliss 1995, Schöning 2000, Thust 1996).

A l'origine, ce matériau a été utilisé, après oxydation, comme diélectrique en microélectronique. Ses propriétés de photoluminescence ont été découvertes ensuite, si bien qu'il est surtout étudié pour ses applications optoélectroniques potentielles. La plupart des travaux réalisés à ce jour visent à l'optimisation de ces propriétés. D'autres applications se développent, par exemple dans le domaine de la chimie, comme après dépôt de métal pour la catalyse, ou pour la microtechnologie (Jesket 1995, Lehmann 1990).

Deux principales voies d'élaboration ont été étudiées pour ce matériau : les dissolutions chimiques et électrochimiques. La caractéristique commune à ces techniques est l'utilisation de solutions à base d'acide fluorhydrique (HF). Le mode de préparation le plus reproductible et offrant les plus grandes possibilités d'adaptation est la dissolution électrochimique (Cullis 1997, Theiss 1997).

La mise en présence de silicium et d'acide fluorhydrique n'entraîne pas d'attaque spontanée du silicium. Si on fait passer un courant à l'interface silicium / solution (HF), générant des porteurs de charges positives dans le silicium (trou+), il y a possibilité de dissolution de ce silicium. C'est le cas lorsque le silicium constitue l'anode d'un montage électrochimique : on procède alors à l'oxydation du silicium, aussi appelée anodisation.

La caractéristique principale à contrôler pour les applications de fonctionnalisations chimiques et biologiques du silicium poreux est la taille des pores. Il est possible de maîtriser ce paramètre par les conditions d'anodisation et par le choix des caractéristiques du substrat de départ (Rönnebeck 1999, [1] Berger (chap 18)). La taille des pores doit permettre une libre circulation (diffusion) des (bio)molécules dans la couche poreuse, tout en autorisant une densité d'immobilisation maximale de ces biomolécules. De plus, il est nécessaire que le matériau support soit stable, mécaniquement et chimiquement, face à tous les traitements liés à la fabrication et à l'utilisation de capteurs (Cullis 1997). On procède donc à un recuit à 500°C.

En ce qui nous concerne, seule la surface spécifique accessible du silicium poreux nous intéresse, et nous avons mis en œuvre toutes les techniques dont nous disposons, au laboratoire, pour l'étudier :

- Observation au Microscope Electronique à Balayage (MEB)
- Observation au Microscope à Force Atomique (AFM)
- Tests de résistance chimique (ammoniaque concentrée, solution piranha)
- Détermination de porosité par pesées
- Caractérisation infrarouge
- Tests physico-chimiques (mouillage)

Le silicium poreux résulte d'une attaque électrochimique du silicium monocristallin en milieu acide fluorhydrique concentré. La polarisation est appliquée entre l'électrode de silicium (anode) et une contre-électrode (cathode) inattaquable, en métal noble (platine) ou, éventuellement, en carbone. La formation du silicium poreux se réalise, en général, en imposant une intensité constante dans le circuit à potentiel libre, c'est-à-dire une densité de courant contrôlée.

Les facteurs contrôlant la formation du silicium poreux, sa structure, sa morphologie, sa porosité et son épaisseur sont :

- l'orientation cristallographique du substrat de départ (100)
- la densité de courant
- les concentrations en acide fluorhydrique et en alcool de la solution électrolytique
- la nature et le niveau de dopage du silicium, l'influence de l'éclairement
- le temps d'anodisation

Lorsque l'attaque électrochimique du silicium a lieu à forte densité de courant, la dissolution du silicium est contrôlée par la diffusion des ions F^- (depuis la solution vers la surface du silicium) qui est le facteur limitant : les parties saillantes de la surface, plus proches du cœur de la solution, sont attaquées de préférence au fond des pores : c'est la technique de l'électropolissage (figure 1.1-1).

Inversement, à faible densité de courant, le facteur limitant est la diffusion des trous. Le champ électrique concentre les charges dans les cavités, où la dissolution s'opère, les transformant en pores : ainsi se forme le silicium poreux (figure 1.1-1).

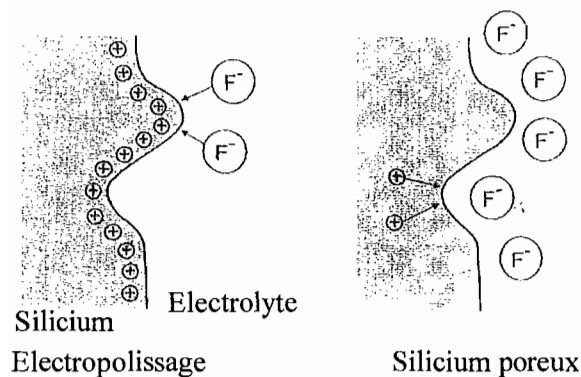


Figure 1.1-1 : Schéma d'attaque du silicium, à forte intensité ou faible concentration en HF, à gauche, et à faible intensité ou forte concentration en HF, à droite.

a- L'orientation cristallographique du substrat de départ

Dans le cas de formation de silicium poreux de façon anisotropique, la direction de propagation des pores est déterminée par la nature de l'orientation cristallographique de la surface du substrat. L'anisotropie de dissolution provient de différences de cinétiques d'oxydation entre les différents plans cristallins ([1]Morazzani (chap16), [1]Amato (chap11), Rönnebeck 1999, [1] Berger (chap18), Janshoff 1998).

Les pores se propagent donc à l'intérieur du matériau suivant certains axes privilégiés.

b- La densité de courant

La densité de courant détermine le régime de dissolution du silicium. Pour des conditions identiques de formation, et pour tous les niveaux de dopage, plus la densité de courant est forte, plus la porosité et la vitesse d'attaque sont importantes, jusqu'à ce qu'on atteigne le seuil d'électropolissage (Grosman, Thèse 1995, [1] Berger (chap 18)).

c- Les concentrations en acide fluorhydrique et en alcool dans l'électrolyte

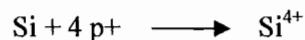
La solution électrochimique doit répondre à deux impératifs : le premier est d'alimenter l'interface silicium / électrolyte en ions fluorure, le deuxième est de permettre à la solution de pénétrer dans les pores et de solubiliser l'hydrogène qui se forme durant la réaction électrochimique. On atteint ce second objectif en ajoutant de l'éthanol à la solution, ce qui diminue sa tension superficielle. Par

ailleurs, les variations de la concentration en HF permettent de faire varier les caractéristiques de la dissolution : à densité de courant fixe, une augmentation de la concentration provoque une diminution de la porosité du silicium. Par contre, l'augmentation de la concentration en HF élève le seuil d'électropolissage, ce qui permet d'effectuer des dissolutions à plus grande densité de courant ([1] Berger (chap18), [1] Lang (chap19), Grosman thèse 1995, Theiβ 1997).

En ce qui concerne le silicium poreux de type p, une diminution de la concentration en HF entraîne une augmentation de la taille des pores pouvant conduire à l'obtention de pores larges et cylindriques, à grande densité de courant, proche de l'électropolissage (Janshoff 1998).

d- La nature et le niveau de dopage du silicium, l'influence de l'éclairement

L'attaque électrochimique du silicium nécessite la présence de trous à l'interface électrolyte/solide, selon la réaction :



Dans le silicium dopé p, la polarisation anodique du silicium p par rapport à l'électrolyte correspond à une polarisation directe de la jonction silicium/électrolyte. Les trous étant la population majoritaire, l'attaque peut être réalisée directement. Pour le type n, la polarisation est indirecte, il faut polariser le silicium de façon plus importante, pour que, près de l'interface silicium / électrolyte, dans la zone de charge d'espace du semi-conducteur, on se retrouve en situation d'inversion de population. On peut également assister la formation du silicium poreux par l'éclairement du substrat. La lumière, par photogénération de paires électron/trou, fournira les trous nécessaires à l'attaque électrochimique (Grosman thèse 1995).

En ce qui concerne le silicium poreux de type p, une augmentation de la concentration du dopant entraîne une augmentation de la taille des pores, pour les mêmes conditions d'anodisation (Janshoff 1998). Ainsi, il est possible de passer, pour des dopages p de $10^{15} - 10^{16}$ atomes dopants/cm³, d'une morphologie de type « sponge-like » à une morphologie anisotropique constituée de longs pores parallèles à la direction (100) pour des dopages p de $10^{18} - 10^{19}$ atomes dopants/cm³ ([1] Grosman (chap 11)).

De façon plus générale, l'augmentation du dopage des semi-conducteurs a pour effet d'accroître la diffusion des porteurs de charges. Or, dans la formation du silicium poreux, le facteur limitant étant la diffusion des trous, toute variation de ce facteur entraîne des modifications de structure ([1] Lang (chap 19)).

La lumière crée des paires électron/trou par photogénération. Ce phénomène est présent dans tout le silicium, mais de façon non homogène, l'intensité lumineuse diminuant avec la pénétration dans la matière. On peut considérer qu'il y a un gradient de porosité pour les fortes épaisseurs (Cullis 1997). D'autre part, l'illumination des substrats provoque l'amincissement des murs de silicium pendant toute la durée du processus, tout du moins, jusqu'à ce que la largeur de la bande interdite du silicium formant les murs soit supérieure à l'énergie des photons incidents (Theiβ 1997). En conclusion, l'attaque photoélectrochimique (PEC) permet aussi d'obtenir des structures poreuses aux caractéristiques spécifiques et contrôlées.

e- Le temps d'anodisation

Ce dernier élément est fonction des épaisseurs que l'on désire obtenir. En effet, pour des conditions d'attaque fixées, et pour un type de substrat donné, le temps et l'épaisseur sont reliés par le facteur de vitesse suivant (Berger [chap 18]):

$$R \text{ (cm/s)} = (J \cdot M_a) / (P \cdot n \cdot p \cdot e \cdot N_a)$$

J : la densité de courant (A/cm²).

M_a : la masse atomique du silicium 28,08 g/mol.

P : la porosité du silicium (%).

n : le nombre d'électrons nécessaires à la dissolution d'un atome de silicium.

p : la densité du silicium 2,33 g/cm³.

e : la charge d'un électron (C).

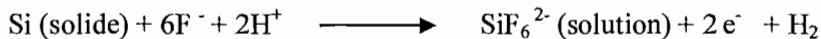
N_a : le nombre d'Avogadro (6.022.10²³ mol⁻¹).

La dissolution anodique du silicium conduit à la formation de l'acide hexafluorosilicique H_2SiF_6 . Selon les conditions (% HF, dopage, densité de courant), on distingue deux différents régimes de dissolution du silicium :

- à faible concentration en HF et forte densité de courant : l'électropolissage, où le silicium est dissous dans les parties sommitales de l'échantillon ; ceci entraîne le polissage de l'échantillon et non la formation de pores.



- à forte concentration en HF et faible à moyenne densité de courant : formation de couches poreuses. Seulement deux charges sont consommées par atome de silicium dissous :



Cette réaction se caractérise par un dégagement d'hydrogène. De nombreux mécanismes intermédiaires sont proposés, mais ils sont tous décrits par cette équation globale.

Dans la réalité, le nombre de charges nécessaires à la dissolution d'un atome de silicium varie entre deux et quatre, en fonction des conditions et du dopage du silicium.

Le silicium poreux obtenu par anodisation est très réactif et évolue dans le temps ; une passivation par oxydation thermique permet de le stabiliser. Juste après la préparation, la surface de la couche poreuse est terminée par des liaisons de type Si-Hx (x = 1, 2 ou 3) qui peuvent être caractérisées par des pics dans la région des 2050-2150 cm^{-1} en infrarouge. Cette passivation de la surface du silicium par l'hydrogène n'est pas stable. Au cours du temps, l'aire de ces pics diminue et des pics à 2200-2250 cm^{-1} apparaissent, caractéristiques de vibrations O-Si-H, qui dénotent une oxydation des liaisons arrières du silicium (Theiss 1997, [1] Morazzani (chap16), Janshoff 1998). Le traitement thermique en atmosphère oxydante permet de faire désorber l'hydrogène dès que la température atteint 350°C. On assiste alors à la formation de silice (vibration Si-O-Si à 1110 cm^{-1}). Cependant pour des températures supérieures à 500°C, on est confronté à une instabilité thermique du silicium poreux, qui peut entraîner des changements morphologiques, pouvant aller jusqu'à la coalescence pour des températures supérieures à 700°C : ce phénomène proviendrait de la diffusion des atomes de silicium le long des pores ([1] Morazzani [chap16]).

De plus, l'oxydation du silicium poreux permet d'obtenir une réactivité surfacique proche de celle des échantillons d'origine (silice thermique), la croissance d'oxydes se faisant à partir du même silicium. Cette similitude constitue l'intérêt de notre travail, puisqu'elle nous permet de transposer les résultats obtenus sur silicium poreux à nos substrats initiaux. Nous avons pu, avec la technique infrarouge, réaliser des suivis de toutes les réactions de formation du silicium poreux, et de fonctionnalisation de la silice, ainsi que les transformations chimiques des couches fonctionnelles, comme la réduction des silanes en alcools, les réactions d'hydrolyse des esters ou encore d'activation des acides et de greffage d'amino-espaces.

1.2 Protocoles opératoires

Pour la fabrication du silicium poreux, nous avons utilisé une structure Si/SiO₂ prévue initialement pour les mesures d'impédance. Il s'agit d'une base de silicium taillé (100), oxydé thermiquement, d'une épaisseur de 15 nm de silice, pourvu d'un contact ohmique en or sur alliage titane-chrome. L'approvisionnement en petites quantités de substrats, est toujours un problème. Nous avons dû travailler avec des lots fournis par différentes sociétés, du type n (10^{15} atomes / cm^3) au type p+ (10^{19} atomes / cm^3). Ceci nous a amenés à fabriquer, à caractériser et à optimiser de nombreux types de silicium poreux.

Le silicium poreux s'obtient par attaque chimique ou électrochimique. Les premières expériences ont été réalisées sur du silicium de type n. La cellule utilisée est en téflon et présente une surface en laiton au contact ohmique du silicium. Il n'y a pas de système de confinement de la face arrière de l'échantillon vis-à-vis de la solution, ce qui implique la réalisation de l'étanchéité par dépôt de résine,

au pinceau, sur les bords de l'échantillon. Cette étape est indispensable pour ne pas court-circuiter le silicium. Cependant, le temps nécessaire à la préparation de l'échantillon, à son collage et au séchage de la résine est un facteur limitant pour la préparation de séries d'échantillons. Cette option nous a également restreints, dans la gamme des intensités de courant, aux faibles valeurs, la résine ne résistant pas aux fortes intensités.

Nous avons réalisé de nombreux échantillons en faisant varier l'intensité et le temps d'anodisation. Nous les avons testés et avons déterminé, par observation des rapports trityl (voir chap I 2.2), lesquels étaient les plus aptes à maximiser la quantité de brins synthétisés par unité de surface. Cette étude a été réalisée sur les échantillons de type n ; par la suite nous avons cherché à reproduire sur les substrats p+ la taille des pores que nous avons optimisée sur le type n. La taille des pores nous a semblé être le critère le plus important à reproduire pour obtenir une accessibilité comparable (capacité de diffusion des solutions et des solutés dans la couche poreuse).

1.3 Conditions opératoires retenues

Tous les échantillons subissent un prétraitement à la solution piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$, 3/1, v/v * 10 min) suivi d'un rinçage abondant à l'eau bi-distillée. Ce traitement a pour but de nettoyer l'échantillon en éliminant les souillures organiques.

Pour les échantillons de type n (Phosphore : 10^{15} atomes/cm³), on applique une intensité de 20 mA/cm², dans une solution HF (49%)/EtOH, 1/1 (v/v), pendant 6 minutes.

Pour les échantillons de type p+ (Bore : 10^{19} atomes/cm³), on applique une intensité de 20 mA/cm², dans une solution HF (49%)/EtOH, 1/2 (v/v), pendant 2 minutes.

Les échantillons ont été préparés sous éclairage d'une lampe à filament de tungstène de 60 W, placée à trente centimètres de leur surface. Après l'évacuation de la solution d'anodisation, les échantillons sont longuement rincés à l'eau bi-distillée, puis séchés sous flux d'azote.

1.4 Caractérisation des échantillons obtenus après attaque électrochimique

1.4.1 Le type n

Notre objectif étant d'obtenir un maximum de molécules fixées par unité de surface, nous avons testé l'efficacité de nos substrats, dans le cadre de leur application, en recueillant les données fournies par le synthétiseur automatisé lors de la synthèse d'ADN. Lors de chaque étape de déprotection des bases au TCA, le cation trityl (DMT) est libéré. On peut alors quantifier le rendement de synthèse par dosage de la solution en fin de déprotection.

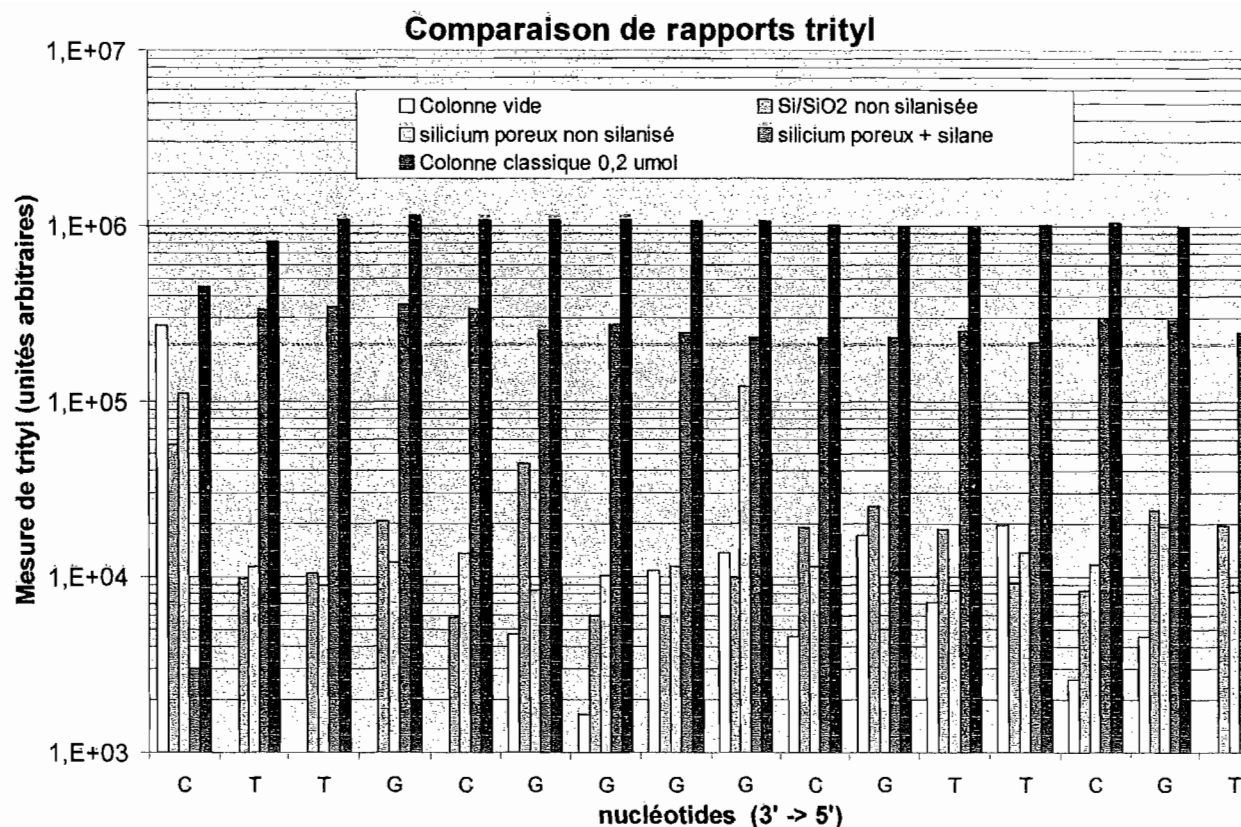


Figure 1.4.1-1 : Comparaison de rapports trityl, en échelle logarithmique, délivrés par le synthétiseur d'ADN Expedite.

La figure 1.4.1-1 présente les valeurs relatives des signaux de détection colorimétrique du groupement DMT après l'opération de déprotection, obtenus lors d'une synthèse classique sur colonne de 0,2µm (segment violet), comparés à ceux obtenus lors de la synthèse réalisée dans une colonne de synthèse sur un échantillon de silicium poreux de 1 cm² de surface (segment rouge).

Les rapports trityl (Kaufman 1993) prouvent l'efficacité et la régularité de la synthèse sur silicium poreux de type n silanisé (voir caractérisation AFM, fig (D.2.2-1)). Pour une surface de 1 cm² le silicium poreux fonctionnalisé présente un rapport inférieur à cinq par rapport à celui d'une colonne classique de 0.2 µmol constituée de poudre de silice aminée.

Le silicium poreux a ainsi rendu possible la caractérisation puis la validation de la synthèse directe d'oligonucléotides sur des substrats solides fonctionnalisés selon les protocoles établis lors de nos travaux.

Caractérisation topographique des échantillons par AFM

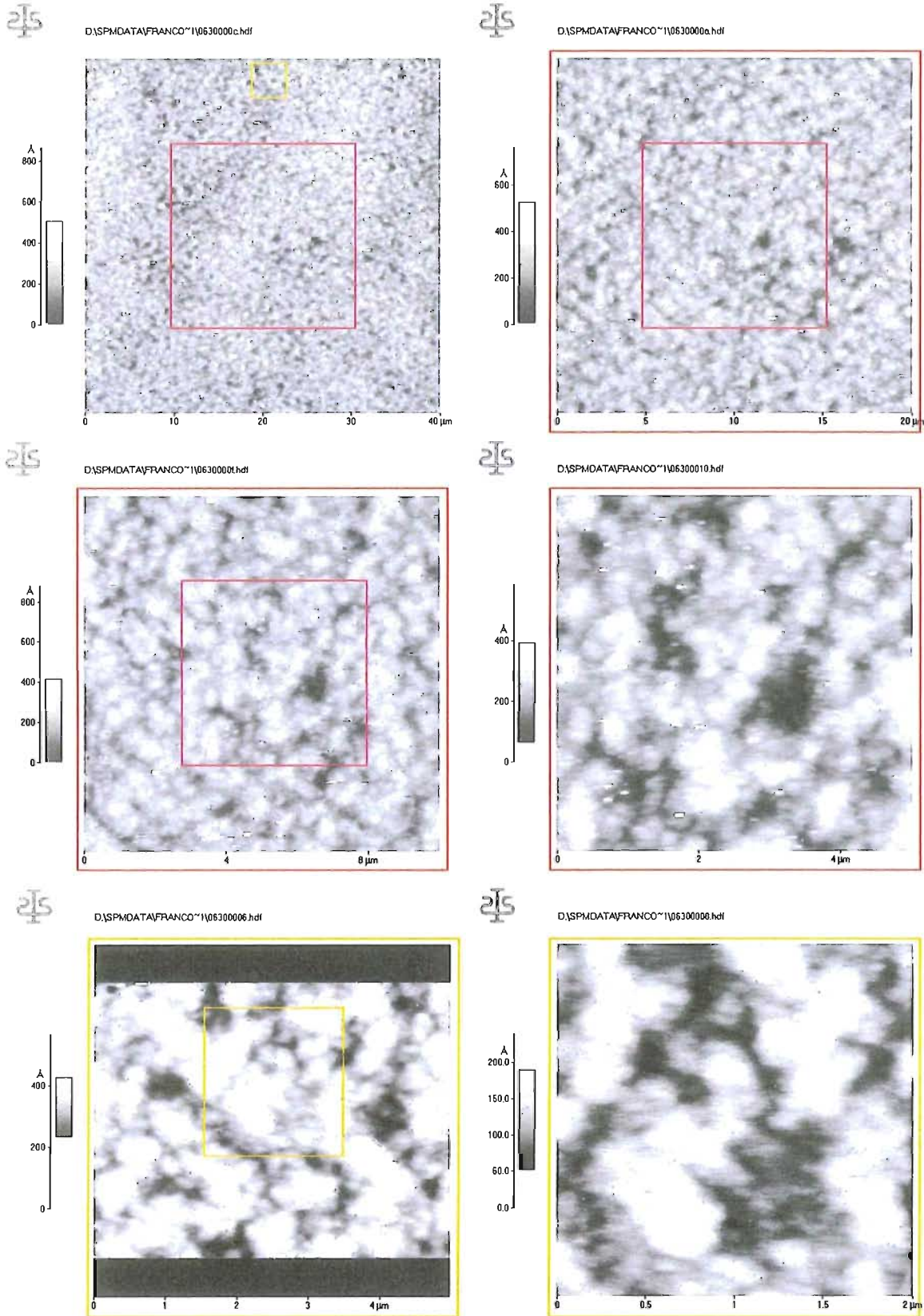


Figure 1.4.1-2 : Image AFM de 40 μm de silicium poreux de type n ($20 \text{ mA/cm}^2 * 6 \text{ min}$) brut, et deux séries d'agrandissements zoomés sur la première image:

- En rouge : 20, 10 et 5 μm.
- En jaune : 5 et 2 μm.

Nous avons caractérisé les échantillons à différentes échelles afin d'observer les détails des structures (fort grossissement) et de vérifier l'homogénéité des surfaces (faible grossissement).

La couche poreuse est constituée de pores dont le diamètre interne varie de 20 à 2000 nm. La pointe AFM parvient à mesurer dans ces pores des profondeurs n'excédant pas 30 nm. Une analyse de surface nous fournit une rugosité RMS (voir Annexe 4) entre 57Å (images de 40 à 5 µm) et 20 Å (image de 1 µm).

Caractérisation par microscopie à balayage électronique des échantillons :

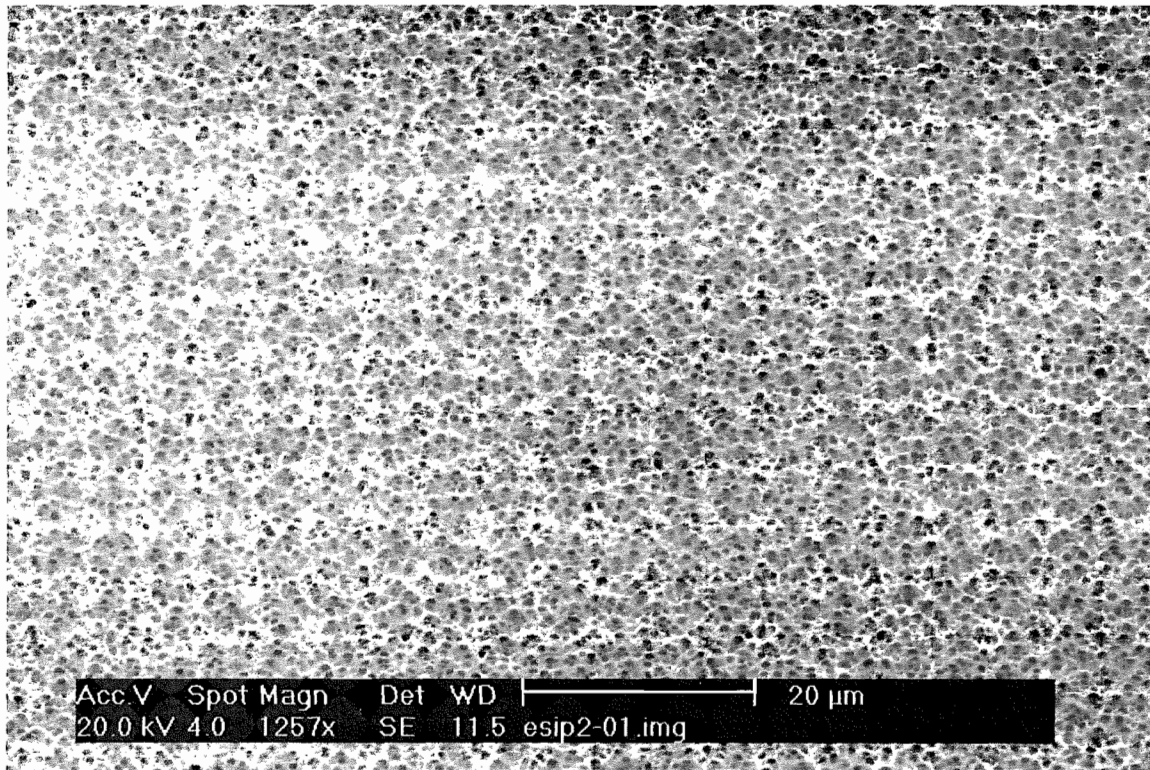


Figure 1.4.1-3

Image MEB de silicium poreux de type n (20mA * 6 min : HF/EtOH = 1/1 v/v) avant oxydation thermique.

Le silicium poreux obtenu paraît macroscopiquement homogène. A fort grossissement, la répartition en taille, en forme et en profondeur semble plus chaotique.

La taille des pores observés est comprise entre 200 nm et 1 µm

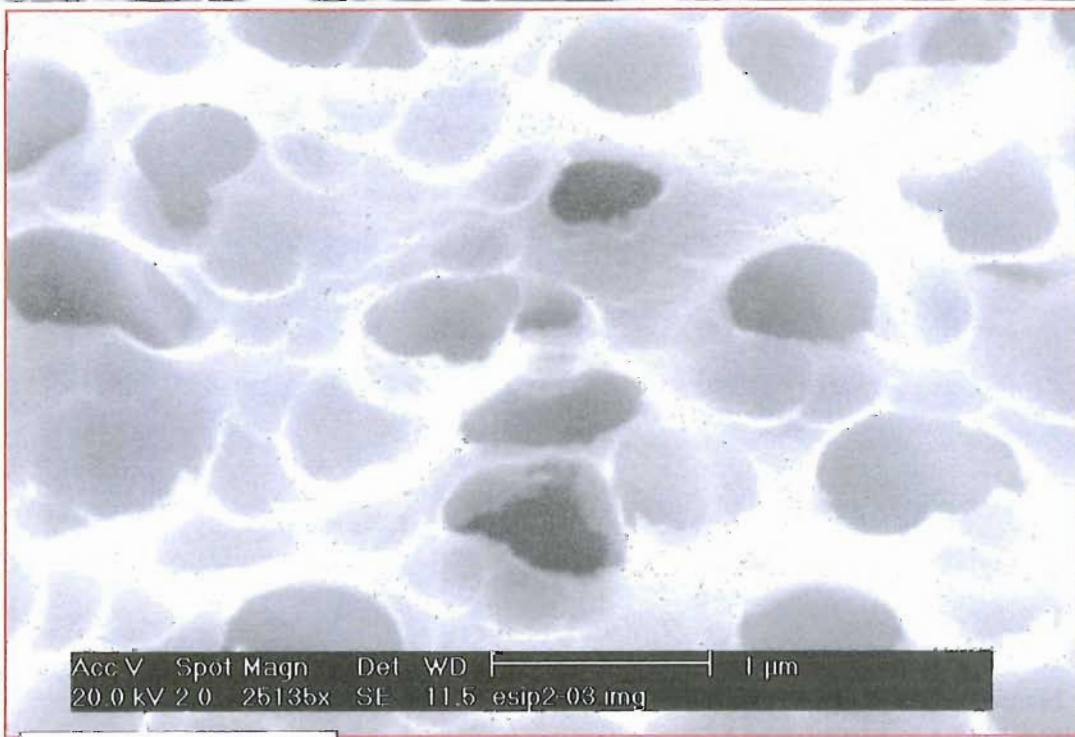
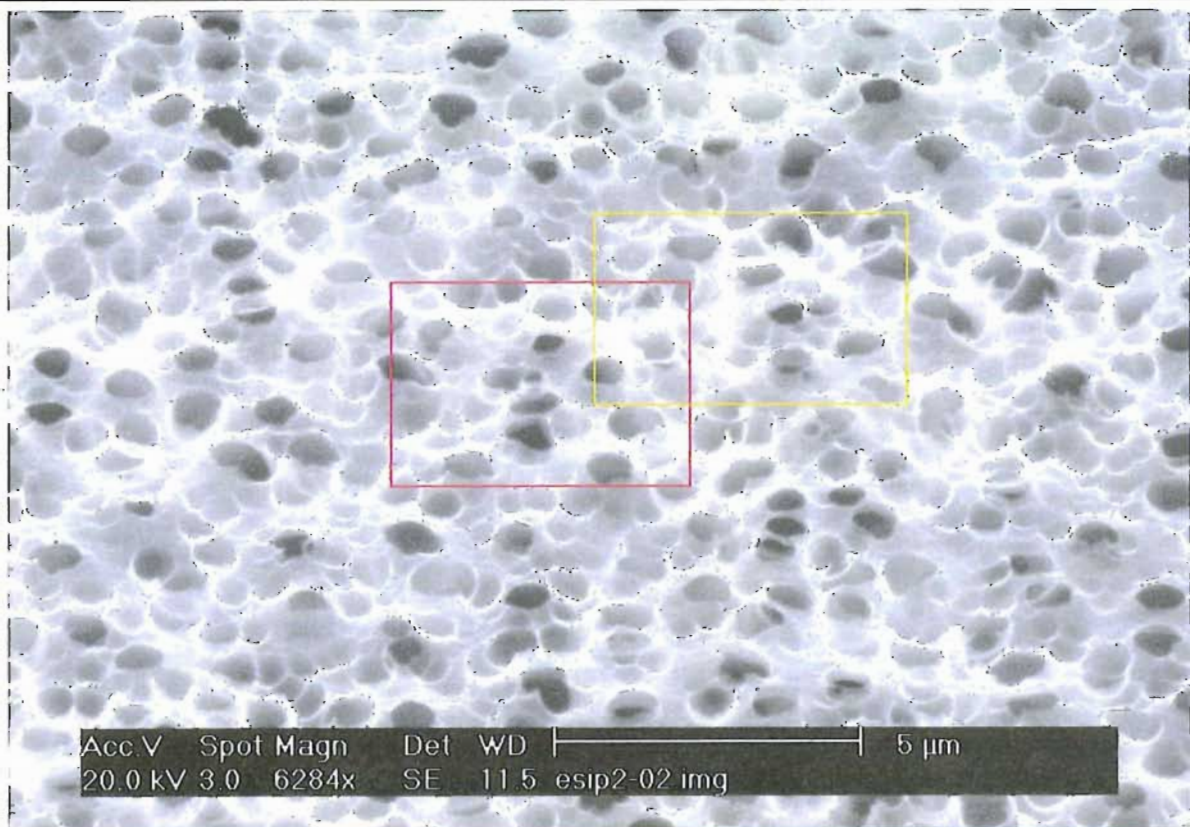


Figure 1.4.1-4

Images MEB de silicium poreux de type n (20 mA * 6 min ; HF / H₂O 1/1 v/v) avant traitement thermique

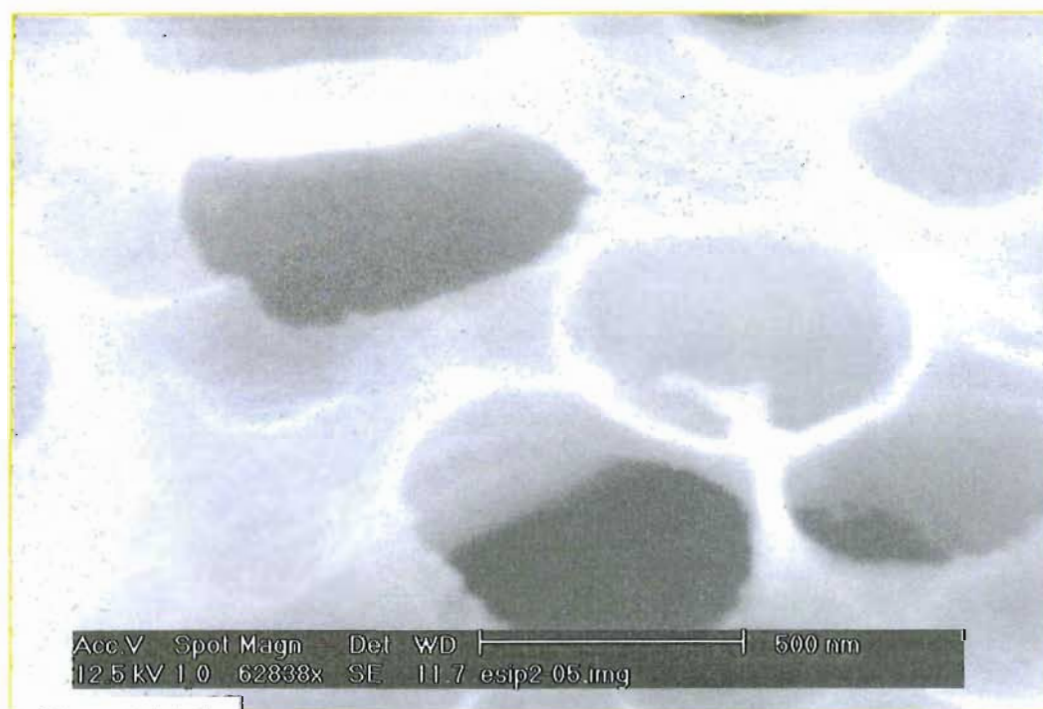
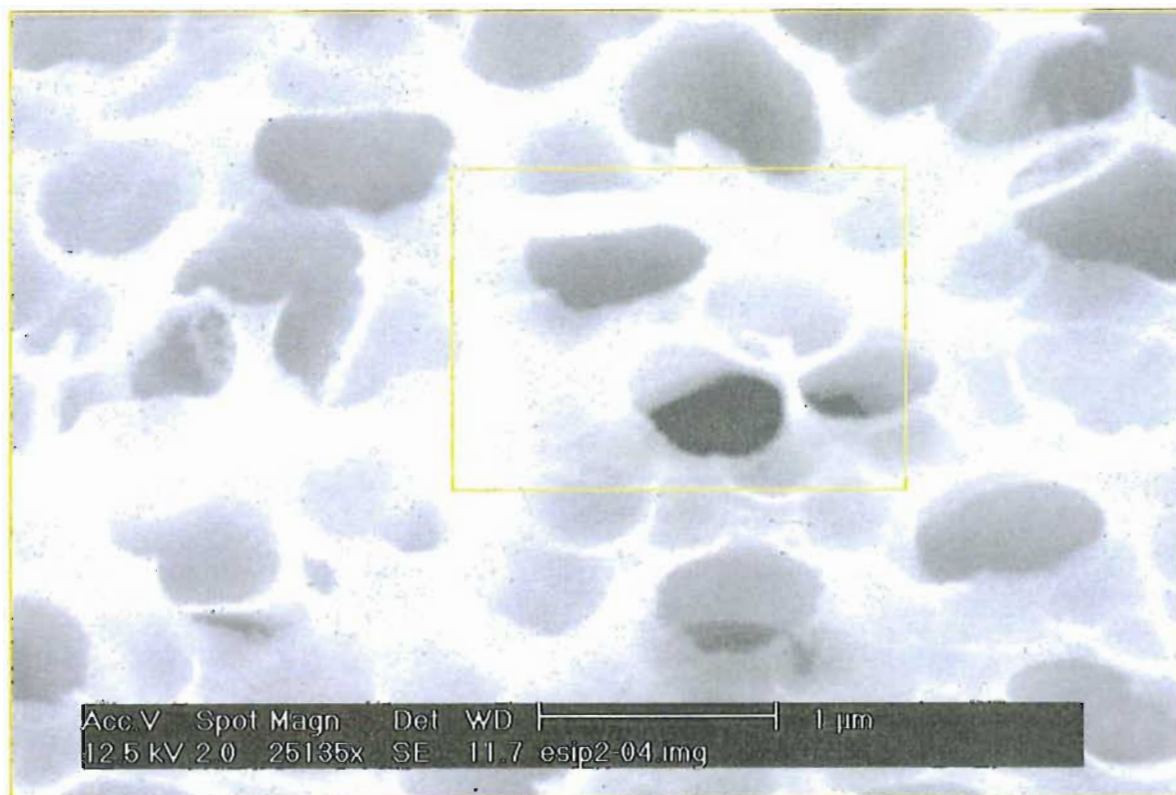


Figure 1.4.1-5
Images MEB de silicium poreux de type n (20 mA * 6 min ; HF /EtOH 1/1 v/v) avant traitement thermique

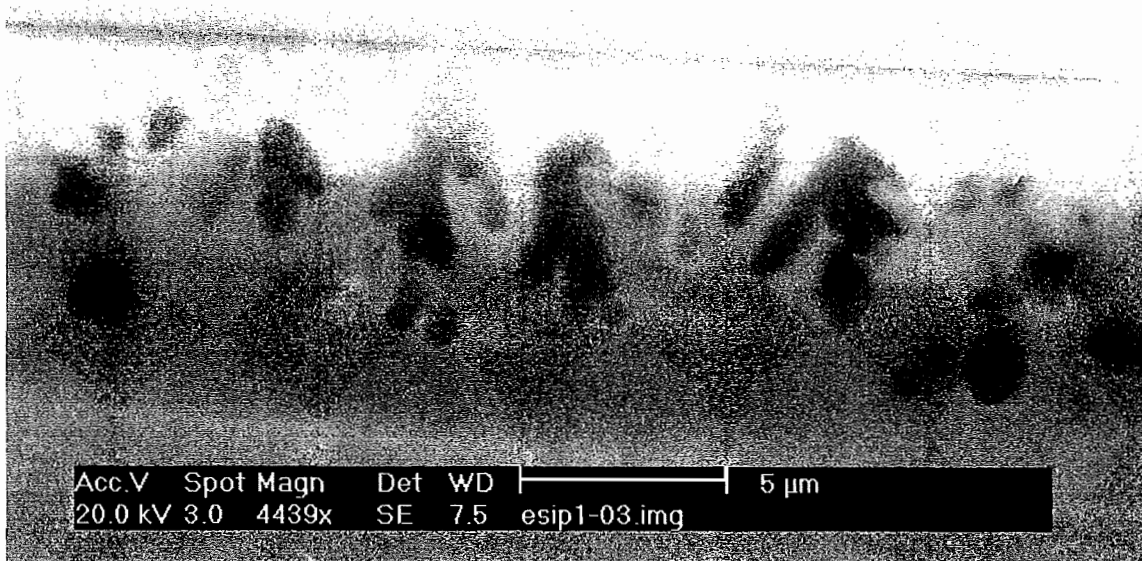
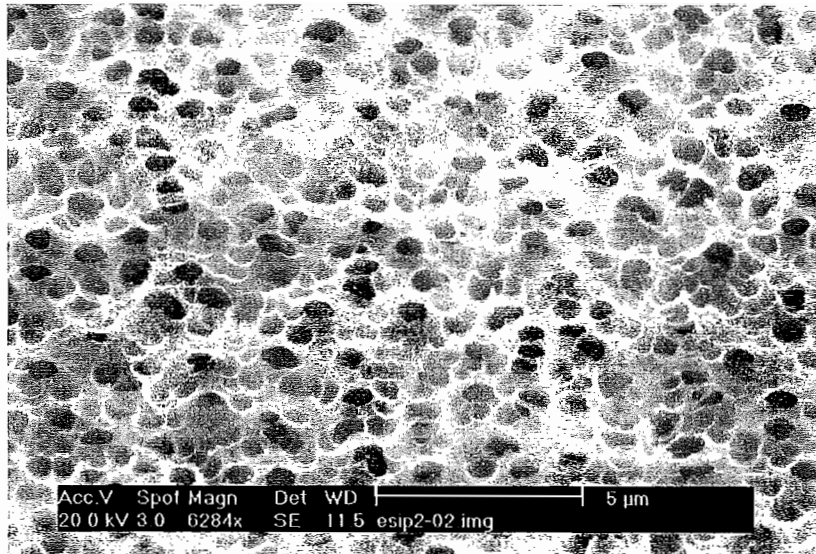


Figure 1.4.1-6

Images de la surface d'un échantillon de silicium poreux de type n (20mA* 6 min. : HF/EtOH = 1/1 v/v) et de sa coupe transversale avant oxydation thermique. Les deux images ont été ramenées à une échelle commune pour faciliter une visualisation en trois dimensions.

L'observation au MEB de la tranche de l'échantillon, obtenue par clivage, montre des cavités interconnectées se propageant dans toutes les directions, vers l'intérieur de l'échantillon. Ces cavités se révèlent de plus grande taille que leur ouverture en surface ne le laisserait supposer.

Une ligne nette, plus claire, est sensiblement parallèle à la surface. Elle pourrait correspondre à l'interface entre le silicium poreux et le substrat. En se basant sur cette remarque, on peut estimer l'épaisseur de la couche à 9 μm

La surface des échantillons est creusée d'amorces de pores hémisphériques plus ou moins profonds. Seules certaines de ces amorces d'attaque semblent s'être propagées vers le cœur de l'échantillon. En surface les parois des pores forment des arêtes aiguës.

En conclusion, les échantillons préparés à partir de substrats de type n présentent des couches relativement homogènes, à grande échelle.

A plus fort grossissement, la taille des pores observés, de l'ordre de 500 nm de diamètre, semble suffisante pour une bonne diffusion des réactifs, en particulier des oligonucléotides.

1.4.2 Le type p+

Pour l'élaboration d'une couche de silicium poreux à partir du matériau p+, le temps d'anodisation retenu, est nettement inférieur à celui du type n. Ce paramètre réduit l'épaisseur de la couche poreuse et donc sa surface développée. Ce paramètre de temps d'anodisation nous est imposé par la transformation de la structure de la couche poreuse pour des temps supérieurs. En effet, on peut observer l'apparition de failles profondes ($> 1 \mu\text{m}$) à la surface de l'échantillon.

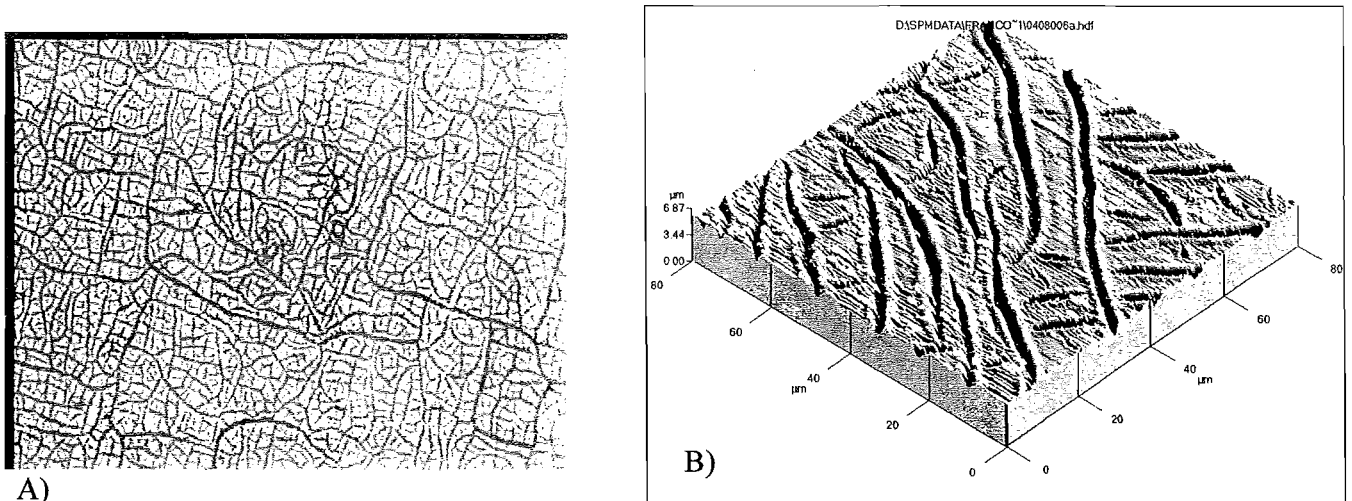


Fig 1.4.2-1 : Images d'un substrat p+ après dissolution anodique dans HF / EtOH (1/2 v/v) à 20 mA/cm^2 pendant 10 minutes. Image A) : microscopie optique (obj X 10). Image B) : AFM taille de balayage $80 \times 80 \mu\text{m}$, magnification 10 en Z.

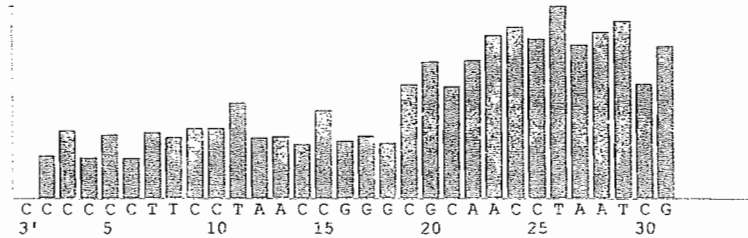
Ce phénomène fragilise grandement la couche poreuse. Nous avons donc limité la durée de la dissolution anodique à 2 minutes, pour ne pas risquer de provoquer cette dégradation. La dissolution de la couche poreuse est certainement due à l'illumination du substrat qui génère des porteurs de charges tout au long de l'attaque électrochimique.

CCCCCcADN_Agt-L185 on Column 1

Estimated scale: Low
Maximum value: 1.57E5

Raw integrated values (read 3'-5' left to right):

-1.-91E4	3.40E4	5.49E4	3.25E4	5.16E4	3.24E4	5.36E4	4.95E4
5.70E4	5.68E4	7.81E4	4.91E4	4.99E4	4.39E4	7.16E4	4.66E4
5.06E4	4.44E4	9.33E4	1.12E5	9.15E4	1.12E5	1.33E5	1.40E5
1.30E5	1.57E5	1.25E5	1.36E5	1.45E5	9.38E4	1.24E5	

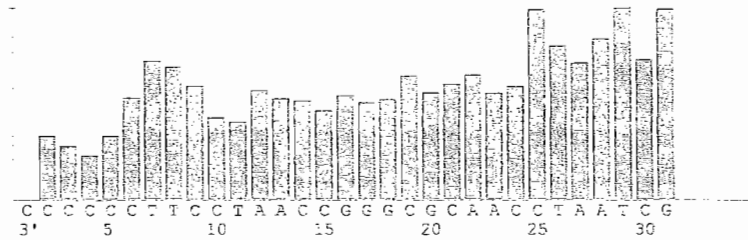


CCCCCcADN_Agt-L185 on Column 2

Estimated scale: Low
Maximum value: 1.55E5

Raw integrated values (read 3'-5' left to right):

-2.-45E4	5.10E4	4.26E4	3.82E4	5.11E4	5.23E4	1.12E5	1.07E5
9.20E4	6.63E4	6.29E4	8.83E4	6.16E4	7.99E4	7.21E4	8.42E4
7.84E4	8.09E4	1.00E5	8.66E4	9.34E4	1.00E5	8.61E4	9.18E4
1.54E5	1.24E5	1.10E5	1.30E5	1.55E5	1.13E5	1.54E5	



CCCCCcADN_Agt-L185 on Column 1

Estimated scale: Low
Maximum value: 1.51E5

Raw integrated values (read 3'-5' left to right):

-9.-28E3	1.12E5	9.61E4	9.62E4	8.87E4	9.20E4	1.16E5	1.36E5
1.01E5	1.07E5	1.51E5	1.20E5	1.21E5	1.28E5	1.43E5	1.19E5
1.21E5	1.09E5	1.35E5	1.21E5	1.42E5	1.17E5	1.31E5	1.25E5
1.31E5	1.51E5	1.08E5	1.11E5	1.38E5	1.12E5	1.07E5	

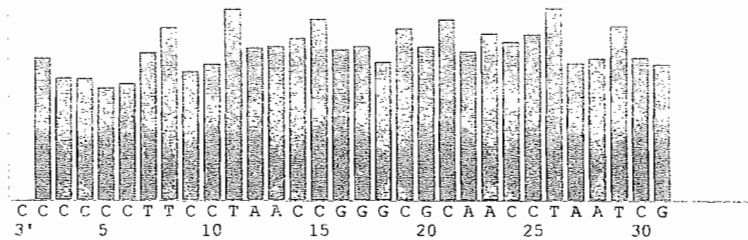


Figure 1.4.2-2 : Rapports trityl obtenus sur silicium poreux p+ attaqué à 20 mA/cm².

Sur la figure 1.4.2-2 le premier graphique correspond à une attaque de 1 minute, le deuxième à une attaque de 1.5 minutes et le troisième à une attaque de 2 minutes. Ces attaques sont réalisées sur silicium poreux p+, avec une intensité de 20 mA/cm².

Les valeurs obtenues sont environ deux fois inférieures à celles obtenues avec le silicium poreux de type n : 6 minutes à 20 mA/cm². L'allure du rapport du troisième échantillon est plus régulière que celle des deux autres, c'est pourquoi nous avons opté pour ces conditions de préparation. Caractérisation des échantillons par microscopie à balayage électronique.

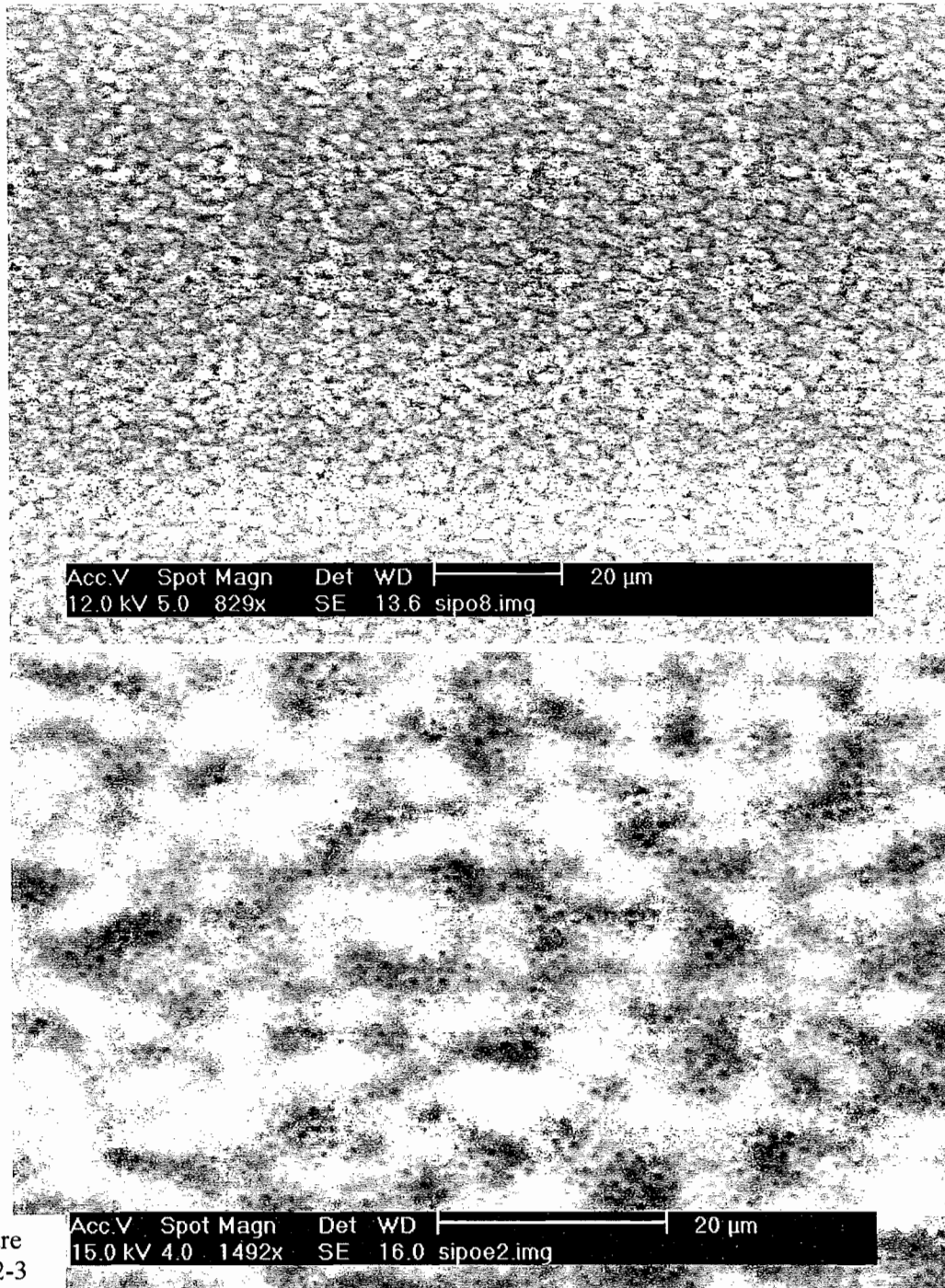


Image MEB de silicium poreux de type p+ (20mA * 2 min : HF/EtOH = 1/2 v/v) avant oxydation thermique.

Le silicium poreux obtenu semble macroscopiquement homogène. A fort grossissement, la répartition en taille, en forme et en profondeur paraît plus chaotique.

La taille des pores observés est comprise entre 200 nm et 1 μm

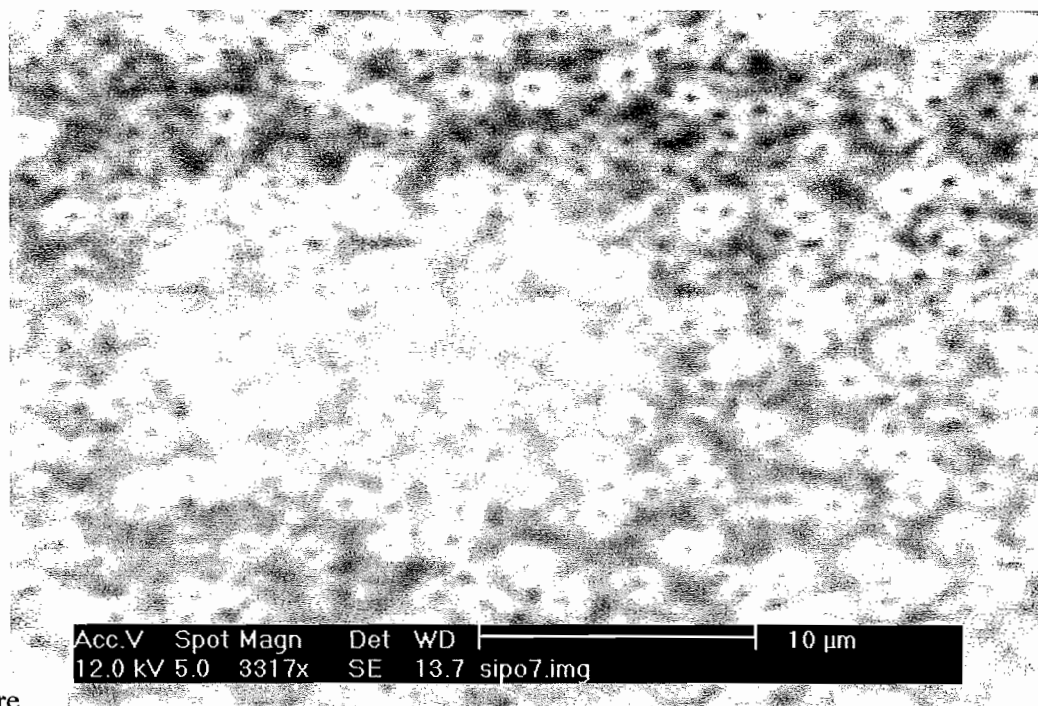
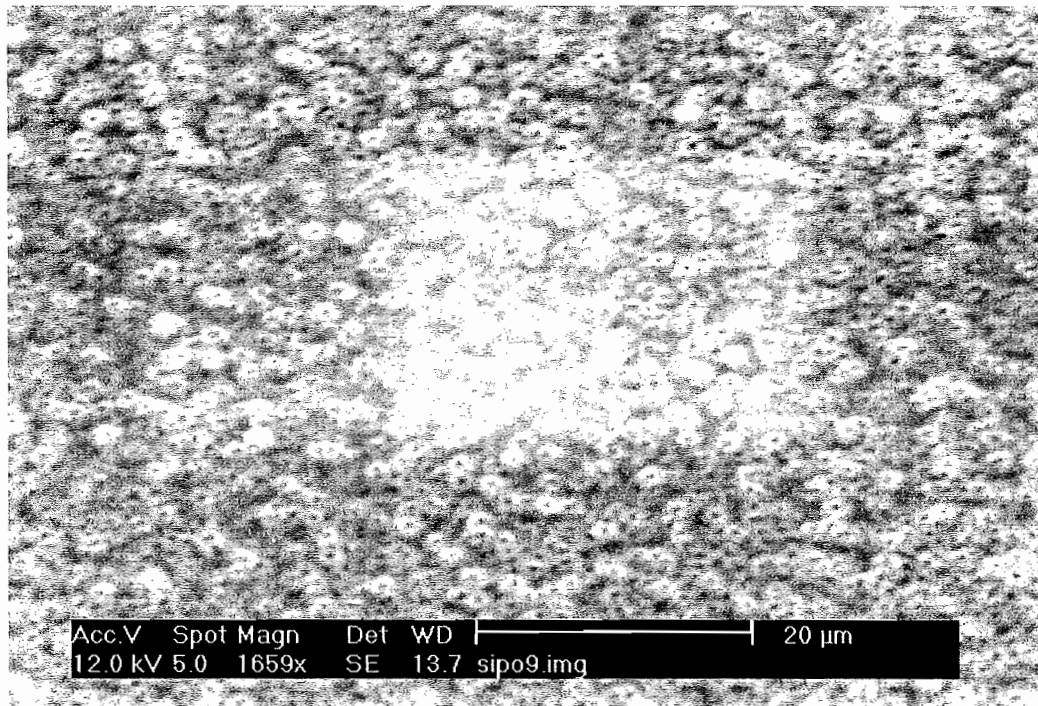
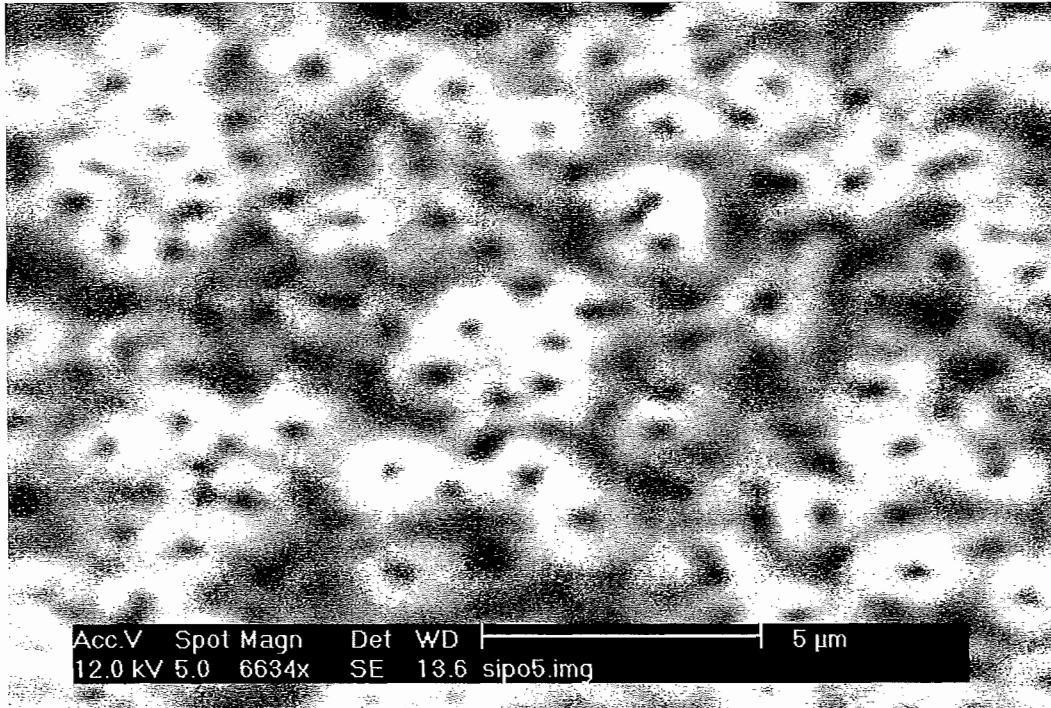


Figure
1.4.2-4

Images MEB de silicium poreux de type p+ (20 mA * 2 min ; HF / EtOH 1/2 v/v) avant traitement thermique



Images MEB de silicium poreux de type n (20 mA * 2 min ; HF /EtOH 1/2 v/v) avant traitement thermique

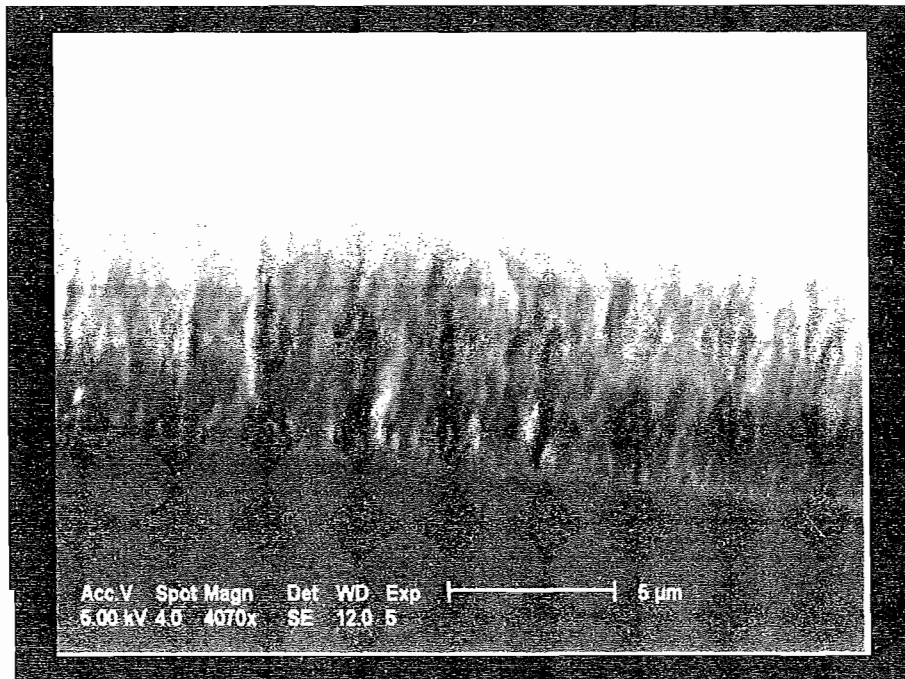


Figure 1.4.2-5

Coupe transversale d'un échantillon p+ (20 mA * 10 min ; HF /EtOH 1/2 v/v). La tranche de l'échantillon a été obtenue par clivage. L'épaisseur de la couche observée est de 6.4 μm. Les cavités semblent avoir sensiblement le même diamètre que les pores en surface. Elles se propagent toutes perpendiculairement à la surface et définissent une interface très nette avec le substrat.

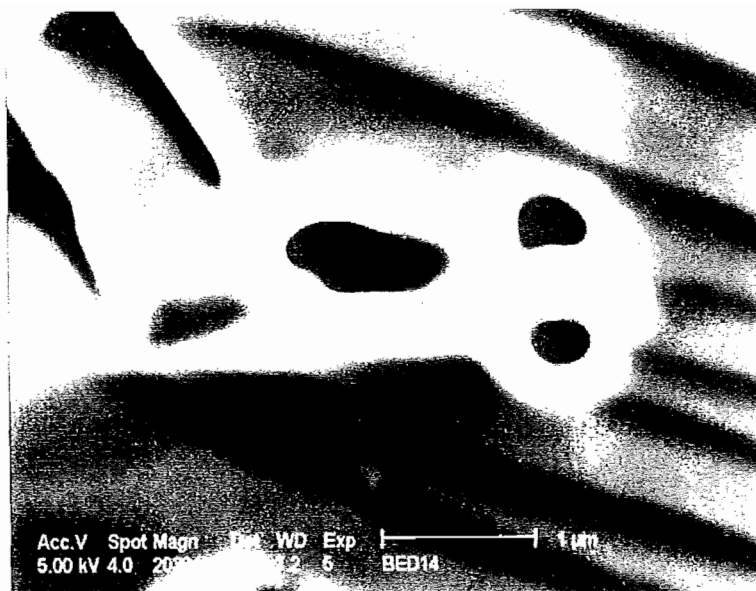


Figure 1.4.2-6 : Image MEB d'un détail de la coupe transversale où l'on observe une taille de pores comprise entre 200 nm et 1 µm.

La taille des pores obtenus sur le silicium p+ est comparable à celle obtenue en 6 minutes sur le silicium de type n. C'était l'objectif que nous nous étions fixé. Il semble, cependant, qu'en profondeur, la structure des pores diffère : le type n présente une structure de pores larges, en arborescence, le type p+ présente une structure de pores plus tubulaire, sans élargissement dans toute l'épaisseur de la couche.

Pour les macropores (diamètre ≥ 100 nm), les mesures AFM posent le problème des artefacts liés à l'emploi des pointes : l'image est le résultat d'une convolution de la forme de la pointe avec le profil de la structure de l'échantillon. Lors de l'acquisition de l'image se pose le problème de perte de contact dans les pores. En général, la taille des pores observés en AFM est plus petite que dans la réalité. Les murs des macropores sont arrondis à cause des interactions dominantes entre les murs des pores et les côtés de la pointe (Janshoff 1998).

Pour les observations MEB, nous sommes confrontés à différents problèmes. Sur la plupart des images présentées, on remarque des zones claires traduisant un fort effet de charge, ce qui nous fait craindre une altération de l'échantillon de silicium poreux de type p+, sous le faisceau d'électrons. De plus, l'évolution de l'échantillon pendant les acquisitions complique l'observation et l'obtention d'images de bonne qualité.

Malgré tout, les observations MEB et AFM sont cohérentes.

1.5 Etude gravimétrique

Pour le type p+ nous avons procédé à une analyse gravimétrique afin de déterminer la porosité et l'épaisseur de la couche de silicium poreux. (Grosman thèse 1995 et [1] Berger (chap 18)). Le silicium poreux est beaucoup moins stable chimiquement que le silicium massif. Il est donc possible de le dissoudre sélectivement, vis-à-vis du silicium massif, par attaque à la soude.

La détermination se fait en trois pesées. On pèse successivement (balance de précision 0,01mg) :

- Le substrat brut après prétraitement : M1
- Le substrat après formation de la couche poreuse : M2
- Le substrat après dissolution de la couche poreuse par de la soude concentrée (1-10 N) : M3

La porosité est donnée par la formule : $p = (M1 - M2) / (M1 - M3)$

Ici :

$$(M1 - M2) = 1,27 \text{ mg}$$

$$(M1 - M3) = 1,91 \text{ mg}$$

D'où $p = 66 \%$

L'épaisseur de la couche poreuse est donnée par la formule : $e = (M1 - M3) / (S * \rho_{Si})$

ρ_{Si} : masse volumique du silicium.

Ici :

$$S = 4 \text{ cm}^2$$

$$\rho_{Si} = 2,32 \text{ g / cm}^3$$

D'où $e = 2 \mu\text{m}$

Lors de l'anodisation, la charge par unité de surface est de :

$$(\text{courant} = 20 \text{ mA / cm}^2) * (\text{temps} = 120 \text{ s}) = 2,4 \text{ C / cm}^2$$

Le Faraday représente la charge d'une mole d'électrons : $F = 9,65 \cdot 10^4 \text{ C / mol}$

Donc $2,4 \text{ C} / 9,65 \cdot 10^4 \text{ C / mol} = 2,49 \cdot 10^{-5}$ moles d'électrons échangés par centimètre carré.

La quantité de silicium dissoute par centimètre carré lors de l'anodisation est $(M1 - M2) / S$.

Soit $0,3175 \text{ mg}$, ou $0,3175 \cdot 10^{-3} / 28 = 1,134 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$ par centimètre carré

Le nombre d'électrons par atome de silicium dissous est de :

$$2,49 \cdot 10^{-5} / 1,134 \cdot 10^{-5} = \underline{2,2 \text{ e}^- / \text{atomes dissous}}$$

Ce dernier résultat est en accord avec le bilan électrochimique, qui prévoit entre 2 et 4 électrons, lors de la dissolution anodique du silicium. Avec une valeur de 2,2, il est proche du schéma théorique (2 e^-) correspondant à la formation de couches poreuses.

Cette méthode gravimétrique nous fournit des valeurs moyennes. Or, par observation visuelle de la propagation de franges d'interférences sur l'échantillon lors de sa formation, et par mesures de fluorescence (voir chap IV.3) on peut supposer que l'épaisseur de la couche poreuse n'est pas uniforme entre le centre et les bords des échantillons préparés dans notre cellule.

1.6 Oxydation du silicium poreux : Traitement thermique

La surface de la couche poreuse fraîchement préparée, est terminée par des liaisons Si-H (hydrure), qui lui confèrent un caractère hydrophobe. Elle ne présente aucune résistance aux solutions alcalines telles que l'ammoniaque concentrée ; de vives réactions de dissolution sont même fréquentes. Ce type de surface doit être passivé pour acquérir une stabilité accrue et pouvoir résister aux protocoles de prétraitement, de silanisation, d'activation, de greffage, de synthèse et de déblocage d'oligonucléotides.

Pour générer de l'oxyde de silicium, les deux principales méthodes d'oxydation sont des méthodes électrochimiques ou thermiques. Dans le cadre de notre étude, nous avons cherché à obtenir une couche poreuse qui aurait les propriétés les plus proches des substrats plans. Nous avons donc procédé à une oxydation thermique (Morita 1990, [2]). L'oxydation des échantillons bruts se réalise en général sous oxygène (humide pour les fortes épaisseurs), à des températures supérieures à 800°C . Pour le silicium poreux, nous avons retenu une température d'oxydation de 500°C , sous air synthétique (O_2 / N_2 : 20 / 80 v/v) (Arita 1976). Cette température est suffisante pour l'oxydation du silicium poreux (voir caractérisation IR), sans pour autant détruire la morphologie de la couche poreuse qui est nettement plus fragile que le silicium massique.

Une autre méthode de passivation et de fonctionnalisation du silicium poreux par hydrosilylation avec des alcènes peut également être envisagée (Buriak [1]&[2] 1999&1998, Bateman 1998,

Boukherroub [2] 1999, Gurtner 1999, Strother 2000) . Nous ne l'avons pas retenue, car notre objectif est de caractériser nos protocoles de fonctionnalisation de la silice dans des conditions identiques à celles de l'élaboration des substrats Si/SiO₂ plans.

Un suivi IR (voir fig 1.6-1) nous a permis de vérifier qu'un temps d'oxydation de deux heures à 500°C était suffisant à la disparition des bandes centrées sur 2118 cm⁻¹ (caractéristiques des bandes de vibration des Si-H (Si-H, Si-H2 et Si-H3) (Gole 1997, Gurtner 1999, Kato (1989)), et à l'apparition de la bande caractéristique OH à 3600-3800 cm⁻¹. Cette dernière bande révèle la présence de fonctions silanols (Si-OH) nécessaires à la silanisation.

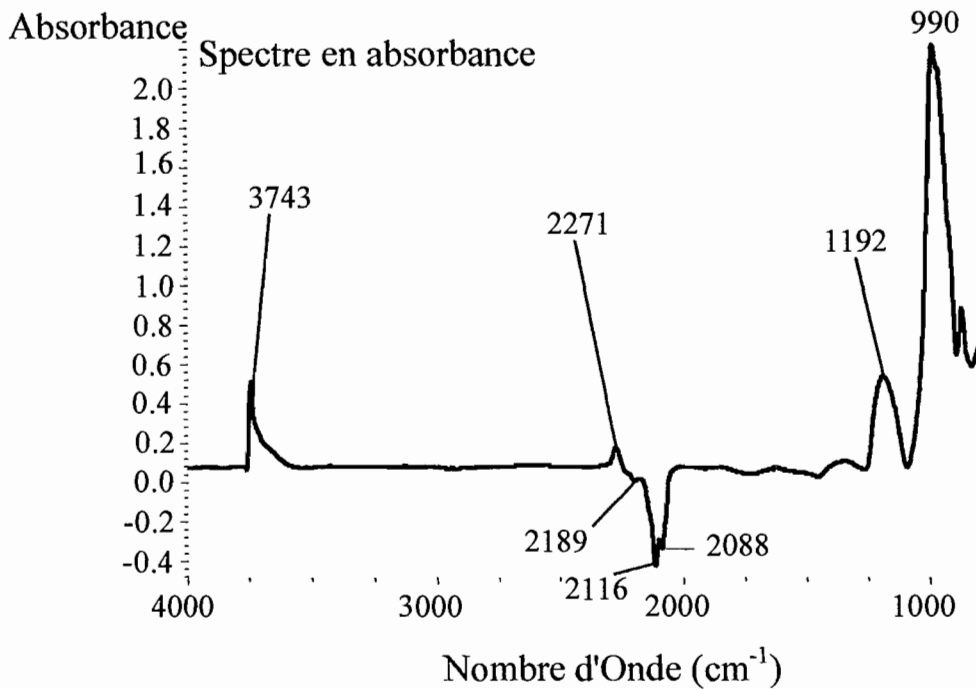


Figure 1.6-1 : Spectre infrarouge différentiel en absorbance de silicium poreux p+ : effet du recuit à 500°C pendant 2 heures. Les bandes d'absorption apparues lors du traitement thermique engendrent une absorbance positive, inversement les bandes d'absorption ayant disparu lors du traitement thermique se traduisent par une absorbance négative.

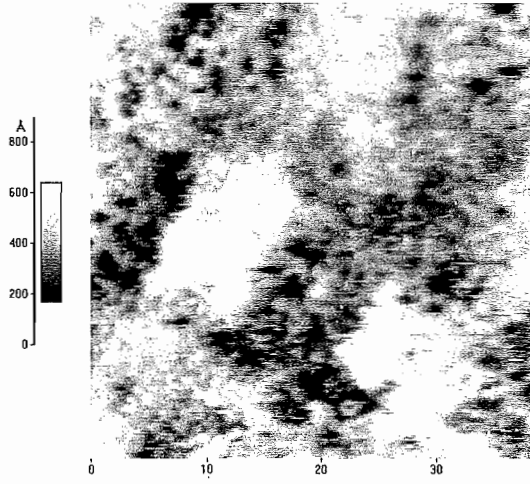
Les échantillons oxydés, ainsi préparés, sont résistants aux solutions d'ammoniaque concentrée et aux solutions oxydantes de prétraitement, comme la solution piranha.

La caractérisation des structures oxydées, par les techniques de microscopie MEB et AFM, est très délicate :

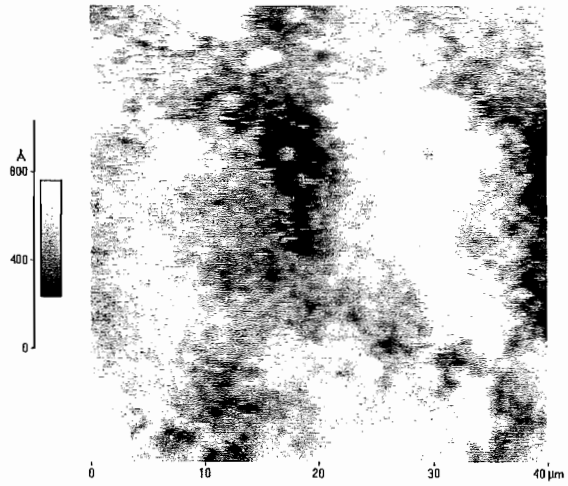
- Pour le MEB : l'oxyde généré est un diélectrique qui ne permet pas d'évacuer les charges apportées à la surface par le faisceau d'électrons. Cette accumulation de charges rend les observations très difficiles (répulsion électrostatique) et limite les tensions d'accélération aux faibles valeurs, diminuant implicitement la résolution de l'appareillage.
- Pour l'AFM : l'oxydation de la surface génère des groupements silanols hydrophiles. Cette technique de microscopie de champs proches est basée sur les interactions entre une pointe (Si₃N₄ en général) et la surface. Le nitrure de silicium possède à sa surface des terminaisons du type N-H susceptibles d'interagir avec les groupements silanols de la surface poreuse (liaisons hydrogène). De plus, L. Odoni *et al.* (Odoni L., Thèse 1999) ont mis en évidence une augmentation des forces de frottement entre pointe et échantillon quand il s'agit d'un contact hydrophile / hydrophile plutôt que d'un contact hydrophile / hydrophobe. Une trop grande affinité pointe – échantillon, liée à une topométrie très marquée, rend les observations presque impossibles : les pointes se dégradent, en général, très rapidement.



D:\SPM DATA\FRANCO~1\07030004.hdf



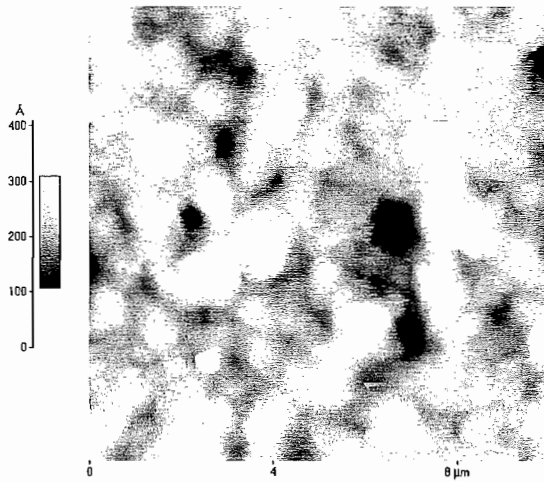
D:\SPM DATA\FRANCO~1\07030007.hdf



Images de silicium poreux type n après traitement thermique (500°C / 1 h). Mode contact intermittent. Amplitude 30 Å. Images de 40μm de côté.



D:\SPM DATA\FRANCO~1\0703000d.hdf



D:\SPM DATA\FRANCO~1\07030009.hdf

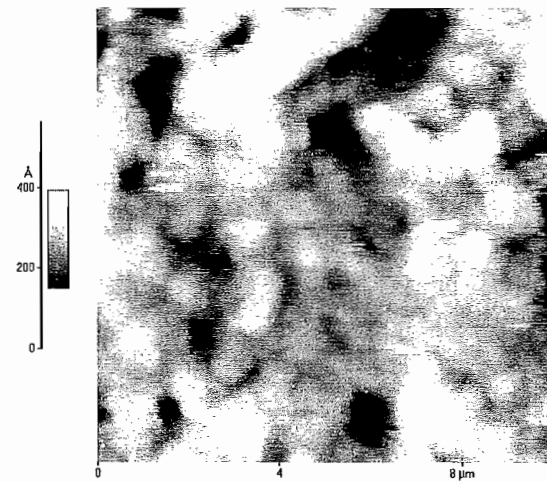


Figure 1.6-2

Images de silicium poreux type n après traitement thermique (500°C / 1 h). Mode contact intermittent. Amplitude 30 Å. Images de 10μm de côté.

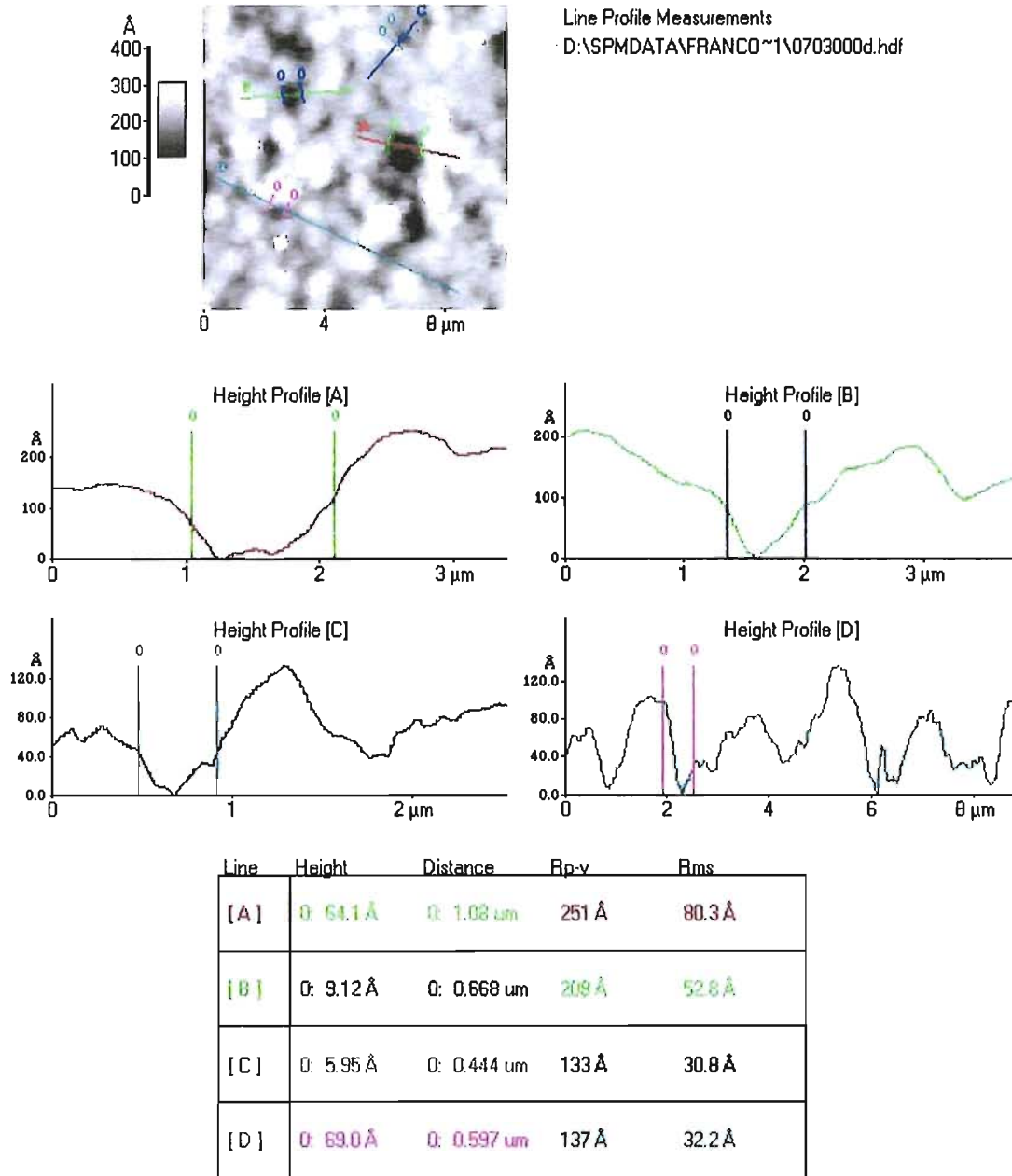


Figure 1.6-3 : Analyse de profils de pores sur une image AFM de 10 μm de côté.

Les figures 1.6-2 et 1.6-3 montrent que la taille des pores est comprise entre 400 nm et 1 μm.

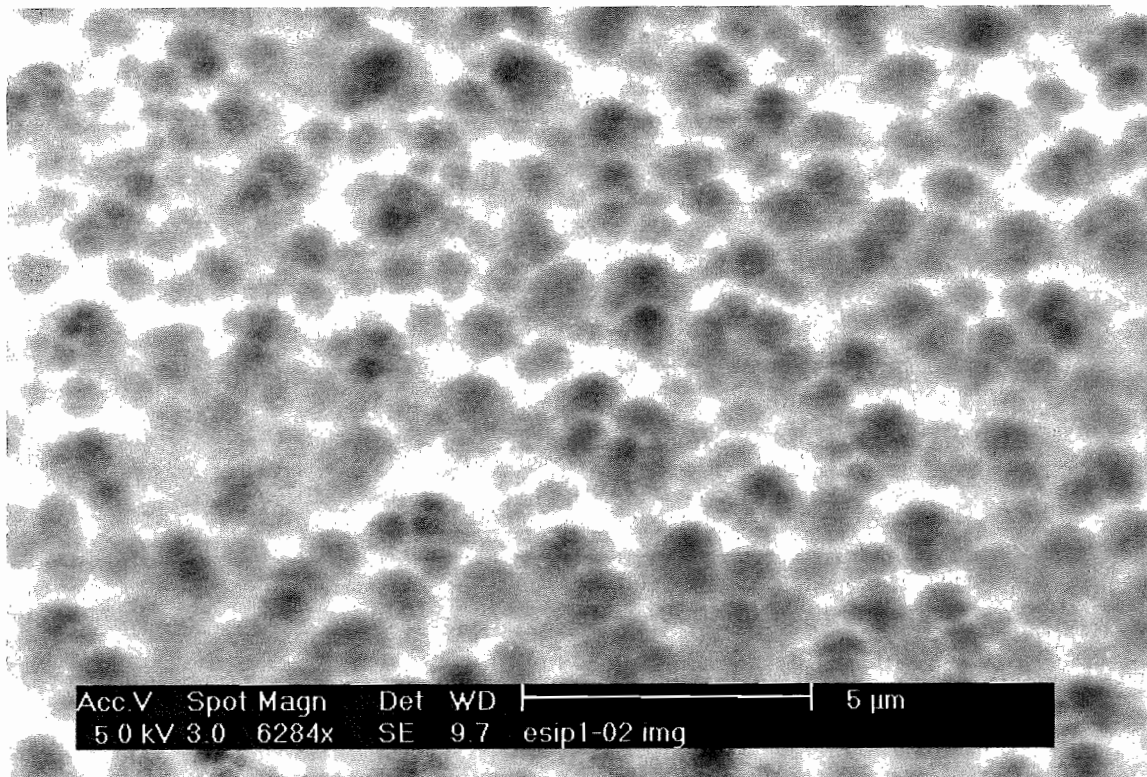
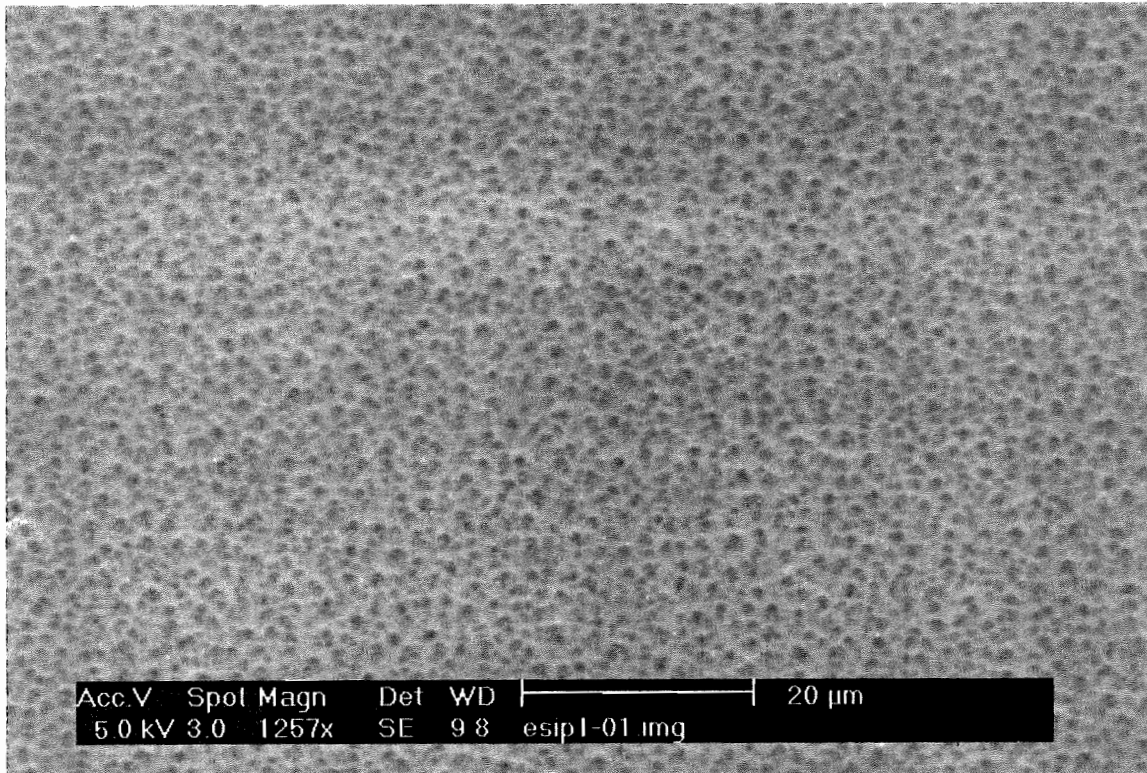


Figure 1.6-4 : Images MEB de silicium poreux de type n ($20 \text{ mA/cm}^2 * 6 \text{ min}$; HF / H_2O 1/1 ; oxydé à $500^\circ\text{C} * 2 \text{ h}$).

Les figures 1.6-2, 1.6-3 et 1.6-4 montrent que la taille des pores observables avec l'AFM ou le MEB est comprise entre 400 nm et 1 μm.

Si l'on compare les images avant et après recuit, on ne constate pas de modification morphologique importante. Cependant le recuit entraînant l'oxydation des substrats, la qualité des caractérisations microscopiques est bien moindre.

Concernant les propriétés physico-chimiques observables macroscopiquement, le changement le plus notable apparaît dans la mouillabilité de la surface vis-à-vis de l'eau. L'angle de mouillage sur le silicium poreux fraîchement préparé est de 107,8 °. Après oxydation l'hydrophilie de la surface se caractérise par une grande mouillabilité par l'eau (5,6 °).

Nom du fichier: C:\francois2\Nouveau dossier\Manip.esu
 Nom de l'opérateur: BESSUEILLE
 Date: 31/05/99
 N° de série: Silanes
 N° de lot: Si/Sipo

N°	Liquide	Substrat	Moyen	Nb. Mes.	Ecart type
1	Eau	SP	107.8	6	0.73
2	Diiodométhane	SP	11.4	6	0.57
3	Formamide	SP	30.9	6	1.34

EQUATION D'OWENS-WENDT

Energie totale:69.3 mJ/m²

Composante dispersive:67.1 mJ/m²

Composante polaire:2.1 mJ/m²

Nom du fichier: C:\francois2\Nouveau dossier\Manip.esu
 Nom de l'opérateur: BESSUEILLE
 Date: 31/05/99
 N° de série: Silanes
 N° de lot: Si/Sipo

N°	Liquide	Substrat	Moyen	Nb. Mes.	Ecart type
1	Eau	SPtth	5.6	5	0.44
2	Diiodométhane	SPtth	8.2	6	2.26
3	Formamide	SPtth	8.0	6	0.58

EQUATION D'OWENS-WENDT

Energie totale:71.4 mJ/m²

Composante dispersive:31.6 mJ/m²

Composante polaire:39.8 mJ/m²

Fig 1.6-5 : Angle de contact du silicium poreux avant et après traitement thermique avec l'eau, le diiodométhane et la formamide, avant et après traitement d'oxydation thermique.

La figure 1.6-5 nous donne les caractéristiques de mouillage de deux échantillons de silicium poreux, l'un brut, l'autre ayant subi un traitement d'oxydation thermique et les calculs relatifs aux énergies de surface selon les équations d'Owens-Wendt. Ces deux échantillons ont une énergie de surface totale similaire et importante. Il faut noter qu'en théorie, les hypothèses d'Owens-Wendt ne s'appliquent qu'aux surfaces planes, ce qui n'est pas le cas de nos échantillons. Pourtant ces calculs nous montrent que pour les surfaces brutes hydrophobes, essentiellement composées de groupements Si-H, l'énergie totale est voisine de sa composante dispersive, alors que, pour les surfaces ayant subi un traitement thermique, la composante polaire représente plus de la moitié de l'énergie totale, ce qui est dû aux groupements Si-OH générés par le traitement thermique.

1.7 Conclusion

Les substrats de silicium poreux nous ont donné le moyen d'obtenir des caractérisations des étapes d'élaboration de puces à ADN (voir chap IV.3). De leur grande surface spécifique découle une grande concentration surfacique. Nous avons pu obtenir des rapports trityl lors des synthèses délivrées par le synthétiseur d'ADN ou réaliser des caractérisations infrarouge des différentes étapes de fonctionnalisation de ces supports. Ces caractérisations nous ont permis la mise au point des greffages puis leur contrôle en routine lors de la fabrication des différents lots de substrats. Il serait également possible d'envisager la réalisation d'un suivi de la formation des couches de fonctionnalisation par infrarouge en modifiant le montage de mesures, comme cela a été fait en ATR (Azzopardi 1994).

Par ailleurs ces substrats présentent un grand intérêt comme support pour puces à ADN ou comme élément de dispositifs « Lab-on-chip ».

2 LA SYNTHÈSE MACROSCOPIQUE

Une des premières approches, pour la réalisation des puces a été de vérifier si il était possible de réaliser la synthèse directe d'oligonucléotides sur les supports solides fonctionnalisés. Ainsi, nous avons tenté de réaliser la synthèse chimique des oligonucléotides par la voie de synthèse des phosphoramidites de façon macroscopique sur des supports plans, et en particulier, sur des supports de silicium poreux oxydés et fonctionnalisés. Pour ce faire, Nous avons couplé un synthétiseur d'ADN automatisé commercial (Expedite), à une cellule de synthèse qui nous permet d'adresser macroscopiquement les réactions de synthèse (voir figure 2-1). Ce dispositif remplace les colonnes de synthèse de l'appareillage automatisé classique et nous permet de réaliser des synthèses sur des surfaces planes. Les plots de synthèse obtenus ont un diamètre de 5 ou 6 mm, selon le type de joint utilisé. Les caractérisations des plots obtenus révèlent une bonne aptitude du système à la synthèse d'ADN, mais elles font apparaître un défaut dû à l'écoulement laminaire dans la cellule engendrant une mauvaise répartition des fluides / et conduisant à des réponses à l'hybridation qui traduisent l'hétérogénéité de la surface du plot après synthèse.

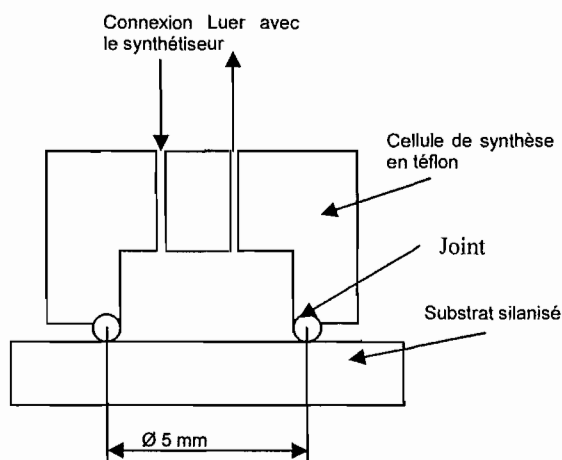


Figure 2-1 Schéma de la cellule de synthèse.

Dans la suite de ces travaux, ce dispositif d'adressage des réactions de synthèse d'oligonucléotides sera appelé « dispositif macro ».

3 LECTURE DES PUCES

Lire une puce à ADN, c'est obtenir un signal qui traduit la présence d'un processus d'hybridation dans une zone localisée de la puce. Les techniques les plus utilisées actuellement sont des techniques indirectes qui font appel à un marquage du brin cible, préalable ou postérieur au processus d'hybridation sur la puce. Ce marquage est réalisé soit par un groupement fluorescent fixé chimiquement ou biologiquement sur le brin cible, soit par un atome radioactif incorporé dans la structure du brins (phosphore 32, par exemple) ou fixé biologiquement, postérieurement à l'hybridation.

Pour y parvenir, la détection électronique, met à profit les phénomènes physiques liés à l'hybridation moléculaire : variation de constante diélectrique, effet de champ.

La cartographie d'impédance optoélectrochimique est le plus simple des systèmes de détection électronique. Il n'implique aucun adressage in situ (sur la puce) du signal ; les différents plots de la puce sont « lus » de façon sélective par adressage externe (laser) d'un flux lumineux.

Nous avons réalisé un banc de mesures optoélectrochimiques automatisé, permettant de faire des cartographies d'impédance à haute résolution (20 μm). Dans un premier temps, les tests ont été effectués sur le banc de mesures macroscopiques existant, afin de simplifier le montage. Le banc se compose de trois éléments principaux :

- La cellule de mesures
- Le système de déplacement
- L'électronique de détection, d'acquisition et de pilotage

L'un des facteurs importants pour la cellule de mesures est la maîtrise des volumes et de la répartition des fluides. En effet, les volumes des solutions biologiques d'hybridation doivent être les plus faibles possibles pour une question de concentration et de coût. La conception de la fluidique doit permettre l'homogénéité de l'écoulement dans la cellule. Cette contrainte s'ajoute à la réalisation d'un système électrochimique fonctionnant sur la base d'un montage à trois électrodes. Le principal problème est celui de l'électrode de référence qui nécessite des membranes poreuses et des liquides internes.

Nous avons validé le dispositif à l'aide de substrats ayant subi des modifications contrôlées. Enfin, nous avons étudié les effets entraînés par la présence d'oligonucléotides sur les puces réalisées.

3.1 Principe de la méthode des mesures d'impédances électrochimiques et optoélectrochimiques

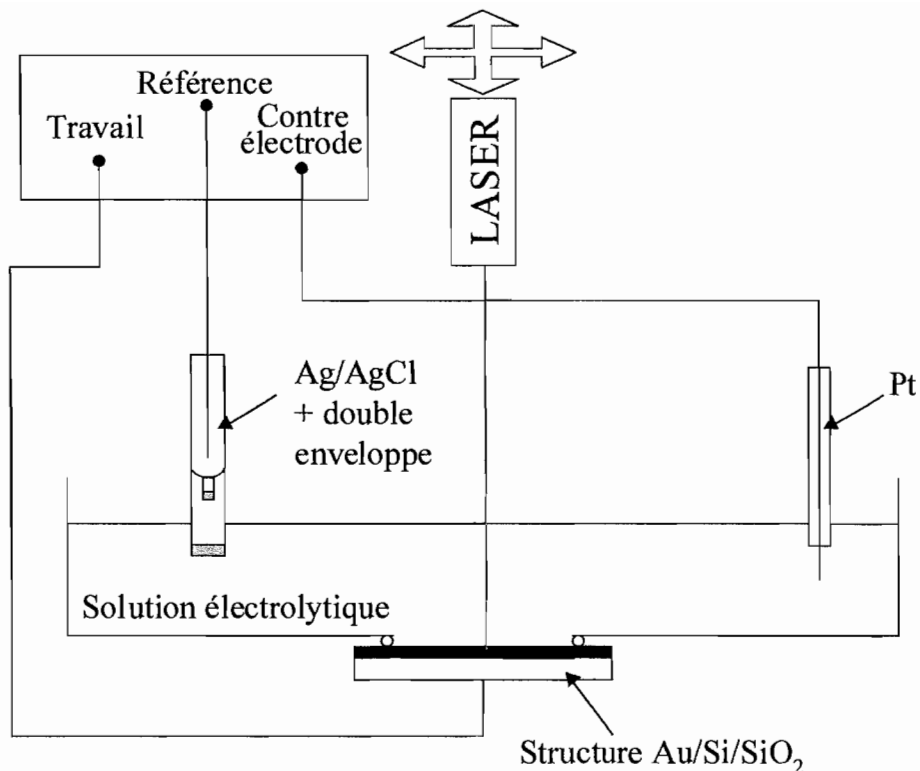


Figure 3.1-1 Schéma du montage de mesures optoélectrochimiques.

Les mesures sont effectuées sur des bancs de mesures pilotés par des ordinateurs par l'intermédiaire d'une interface GPIB. Des détecteurs synchrones fournissent des mesures d'intensité et de potentiel. L'ordinateur gère aussi les déplacements du laser pour les cartographies, par asservissement de moteurs, pas à pas.

Les grandeurs électriques mesurées autour de la structure EDS répondent à la loi d'Ohm complexe :

$$\tilde{u} = \tilde{z} \tilde{i}$$

La détermination de l'impédance complexe implique la mesure des courants et des tensions aux bornes de la structure. Pour réaliser des mesures d'impédance sur une structure EDS, nous devons polariser la structure, c'est-à-dire, appliquer un potentiel entre le niveau de Fermi du semi-conducteur et celui de la solution. Le montage potentiostatique à trois électrodes permet, grâce à l'utilisation d'une électrode de référence, de s'affranchir de la chute de potentiel à l'interface contre-électrode/ solution. Cependant, du fait que la structure a un comportement bloquant, cette chute de potentiel devrait être faible et relativement constante puisqu'il n'existe pas de phénomènes faradiques ; elle ne devrait pas ou peu influencer sur les mesures. Il devrait donc être possible de réaliser les mesures avec un montage à deux électrodes, c'est ce que nous nous proposons de vérifier au cours des contrôles préliminaires

Ces mesures sont effectuées en imposant une polarisation continue entre le semi-conducteur et la solution par l'intermédiaire d'une contre-électrode. Cette polarisation n'entraîne aucun courant dans la structure, à cause de la couche isolante de silice située entre le silicium et la solution (couche bloquante).

Pour réaliser les mesures d'impédance électrochimique, on surimpose une tension alternative de faible amplitude à la tension continue de polarisation et on mesure le courant induit.

La caractérisation de la structure est obtenue par un balayage de sa polarisation du domaine cathodique au domaine anodique par incrément défini. (Stricot Thèse 1986, Chen Thèse 1998, Cloarec Thèse 1997).

A chaque nouvelle polarisation, les mesures en phase et en quadrature des courants et de la tension alternative sont effectuées à l'aide de la détection synchrone pilotée par la tension de modulation.

Le développement de la loi d'Ohm nous permet d'obtenir les termes d'impédance en phase et en quadrature avec :

$$\begin{aligned}\check{Z} &= Z_p + j Z_q \\ \check{U} &= U_p + j U_q \\ \check{I} &= I_p + j I_q\end{aligned}$$

$$Z_p = \frac{U_p I_p + U_q I_q}{I_p^2 + I_q^2}$$

$$Z_q = \frac{U_q I_p - U_p I_q}{I_p^2 + I_q^2}$$

A haute fréquence, l'impédance en phase Z_p est essentiellement caractéristique du comportement résistif de la structure EDS, alors que l'impédance en quadrature Z_q est essentiellement relative au comportement capacitif de la structure EDS (voir figure 3.1-2).

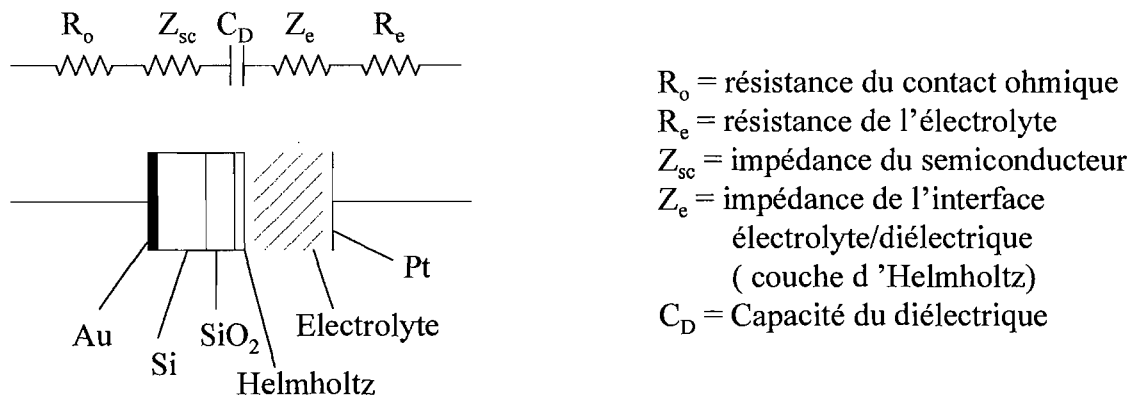
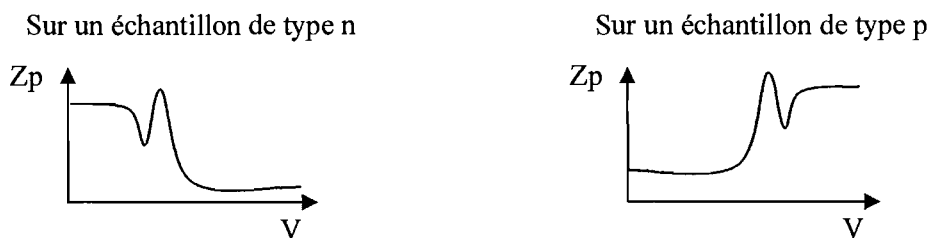


Figure 3.1-2 Structure et schéma équivalent d'une structure EDS.

La corrélation entre modèles et mesures expérimentales, sur les structure EDS, implique la prise en compte des caractéristiques et des nombreux défauts présents dans les structures EDS réelles, tels que :

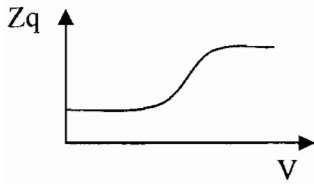
- les polluants métalliques, incorporés dans la silice, qui sont des porteurs de charges
- les charges fixes, comme les liaisons pendantes, situées à l'interface Si/SiO₂ et dans la silice
- les centres de défauts structuraux de la silice, qui peuvent piéger des charges (la silice thermique n'est pas un oxyde stoechiométrique)
- les défauts cristallins du silicium qui génèrent des niveaux d'énergie dans la bande interdite

Les caractéristiques $Z_p = f(V)$ obtenues pour une fréquence donnée, dans le domaine des hautes fréquences ont l'allure suivante :

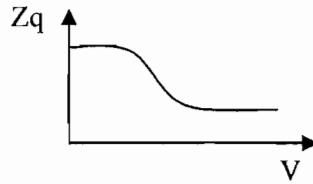


On obtient une caractéristique $Z_q = f(V)$ à une fréquence donnée

Sur un échantillon de type n



Sur un échantillon de type p



Le pic observé sur la caractéristique $Z_p = f(V)$ est lié à des défauts à l'interface Si/SiO₂ qui constituent des états électroniques dans la bande interdite du silicium. La hauteur du pic est liée à la densité des états. Les valeurs des impédances Z_p qui caractérisent le pic, sommet et largeur, ainsi que la valeur de la polarisation où il se situe, sont fonction de la répartition énergétique des états dans la bande interdite, à l'interface Si/SiO₂.

Les courbes $Z = f(V)$ comportent trois parties : deux régions où l'impédance est constante, séparées par une région dans laquelle l'impédance varie fortement en fonction de la polarisation. Ces différentes parties sont caractéristiques du comportement du semi-conducteur soumis à différentes polarisations (accumulation / désertion / inversion).

L'établissement du schéma électrique équivalent du semi-conducteur consiste à analyser l'impédance complexe du semi-conducteur Z_{sc} , notamment en terme de capacité, qui varie selon le régime de polarisation du semi-conducteur et suivant la fréquence de modulation (voir tableaux 3.1.1-3 et 3.1.1-4).

Dans le cas général la capacité du semi-conducteur C_{sc} peut s'écrire sous la forme:

$$C_{sc} = C_a(\varphi_s) + C_{zce}(\varphi_s) + C_{inv}(\varphi_s)$$



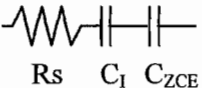
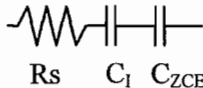
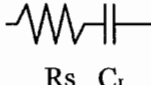
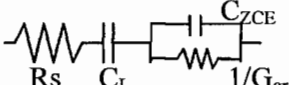
Schéma équivalent de la structure EDS idéale	Basse fréquence	Haute fréquence
Accumulation		
Désertion / Faible inversion		
Forte inversion		

Tableau 3.1.1-3 : Schéma équivalent de la structure EDS idéale qui subit une modulation de basse fréquence ou de haute fréquence pour des polarisations correspondant au régime d'accumulation, de désertion / faible inversion et de forte inversion.

Z_{sc}	Basse fréquence	Haute fréquence
Accumulation	$C_a(\varphi_s)$	$C_a(\varphi_s)$
Désertion / Faible inversion	$C_{ZCE}(\varphi_s)$	$C_{ZCE}(\varphi_s)$
Forte inversion	$C_{inv}(\varphi_s)$	$C_{ZCE}(2 \varphi_b)$ et $1/G_{gr}$ mises en parallèle

Tableau 3.1.1-4 : Impédance complexe du semi-conducteur Z_{sc} en fonction de la polarisation continue et de la fréquence de modulation.

C_a : capacité en accumulation du semi-conducteur

C_{ZCE} : capacité de la zone de charge d'espace du semi-conducteur

C_{inv} : capacité de la couche d'inversion du semi-conducteur

G_{gr} : conductance liée à la génération-recombinaison des porteurs minoritaires

La raison pour laquelle la fréquence de modulation intervient dans l'allure de $C(V)$ en forte inversion est liée au temps de réponse des porteurs de charge. En accumulation, on module la couche de porteurs majoritaires en forte densité. En désertion et en faible inversion, on module la frontière de la ZCE pour apporter ou drainer des porteurs majoritaires, selon l'alternance positive ou négative du signal. Ce sont eux qui assurent la variation de charges et c'est leur temps de réponse à l'excitation qui intervient. Du fait de leur grande densité, leur temps de réponse est faible, ce qui leur permet de suivre une fréquence de modulation de valeur élevée. En revanche, en forte inversion (pour un substrat de type p, par exemple), la concentration en électrons dépasse la concentration en trous en surface. Ainsi le niveau de Fermi, en surface passe au-dessus du niveau intrinsèque; le comportement du semi-conducteur, en surface est alors inversé. La densité des porteurs minoritaires (les électrons) devient supérieure à celle des porteurs majoritaires. Dans ce cas, la charge d'espace est constituée de la couche de porteurs minoritaires. Ceux-ci ne sont disponibles, dans le volume du semi-conducteur, qu'en très faible quantité. Leur temps de réponse dépend du processus de génération / recombinaison se produisant au milieu de la bande interdite du semi-conducteur. Electriquement, ce phénomène est représenté par la conductance G_{gr} , placée entre la bande de valence et la bande de conduction. Le

temps de réponse important des porteurs minoritaires ne leur permet de suivre le signal qu'en basse fréquence.

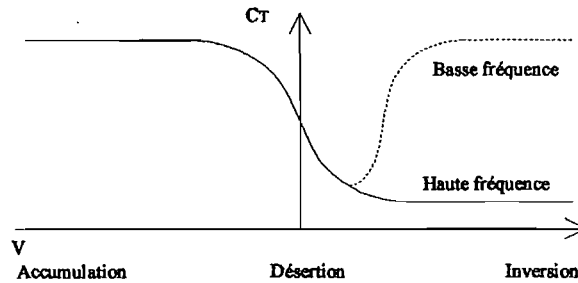


Figure 3.1.1-5 : Caractéristiques $C(V)$ d'une structure EDS (type n) idéale à haute fréquence et basse fréquence.

La méthode de caractérisation de la structure EDS, utilisée tout au long de nos travaux expérimentaux, est la mesure d'impédances électrochimiques. Les mesures d'impédances électrochimiques consistent à surimposer à la tension de polarisation continue V , une faible modulation sinusoïdale » (de l'ordre de 10 mV), sur une gamme de fréquences de 10 Hz à 100 kHz et à mesurer le courant sinusoïdal traversant la structure. La fonction entre le potentiel U et le courant I est l'impédance Z de la structure.

3.2 Utilisation des mesures d'impédances

3.2.1 Influence des modifications de surface

➤ Mesure d'épaisseurs : variation de capacité de la couche diélectrique

Pour une structure EDS, en s'appuyant sur le modèle du condensateur plan, on considère qu'une variation de l'épaisseur du diélectrique entraîne une variation de sa capacité. La relation entre la capacité et l'épaisseur du diélectrique est :

$$C_D = \epsilon_0 \epsilon_S S / e$$

Formule 3.2.1-1 avec
 C_D capacité équivalente du diélectrique,
 S surface du diélectrique,
 e épaisseur,
 ϵ_0 permittivité du vide,
 ϵ_S permittivité relative du diélectrique.

La capacité du diélectrique est inversement proportionnelle à l'impédance en quadrature, mesurée en régime d'accumulation, à une fréquence f (cf schémas électriques équivalents), selon la relation :

$$C_D = 1 / (Z_q \omega)$$

Formule 3.2.1-2 avec
 Z_q impédance en quadrature mesurée,
 ω pulsation,
 C_D capacité du diélectrique

La combinaison des formules 3.2.1-1 et 3.2.1-2 nous donne :

$$e = \epsilon_0 \epsilon_S \cdot S \cdot Z_q \cdot \omega$$

Formule 3.2.1-3 avec $\omega = 2\pi f$

➤ Mesure de charge de surface : variation de potentiel de bandes plates V_{bp}

On appelle potentiel de bandes plates V_{bp} , le potentiel à appliquer aux bornes de la structure pour annuler la courbure de bandes du semi-conducteur. A ce potentiel, il n'y a pas de zone de charge d'espace dans le semi-conducteur. Par contre, si une variation de charge intervient à l'interface électrolyte - diélectrique, elle entraîne une modification de la courbure de bandes du semi-conducteur, par effet de champ, si bien que l'on peut quantifier cette modification par la mesure de la variation du potentiel de bandes plates.

La valeur du potentiel de bandes plates est donnée par la relation de Mott-Schottky, qui s'applique entre les régimes de désertion et d'inversion :

$$V - V_{bp} = \frac{q \cdot N \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_{SE}}{2C_D^2} \cdot \left[\left(\frac{C_D}{C_T} \right)^2 - 1 \right]$$

V polarisation continue appliquée à la structure
 q charge élémentaire
 N dopage du semiconducteur
 ϵ_{SE} permittivité relative du semiconducteur
 C_D capacité du diélectrique
 C_{ZCE} capacité de la zone de charge d'espace du semiconducteur
 C_T capacité totale du substrat.

D'après le schéma électrique équivalent de la structure EDS, la capacité totale C_T du substrat Si/SiO₂ entre les régimes de désertion et d'inversion est donnée par la formule :

$$\frac{1}{C_T} = \frac{1}{C_{ZCE} + C_{SS}} + \frac{1}{C_D}$$

avec C_{SS} = capacité des états d'interface.

A ces régimes, C_{SS} est négligeable par rapport à C_{ZCE} pour les substrats utilisés, donc la capacité totale est :

$$C_T = (C_D \cdot C_{ZCE}) / (C_{ZCE} + C_D)$$

Lorsque les dopages sont inférieurs à 10^{22} m^{-3} et les épaisseurs d'oxyde inférieures à 500 Å, $1/C_D^2$ devient négligeable par rapport à $1/C_T^2$; la relation de Mott-Schottky devient :

$$V - V_{bp} = \frac{q \cdot N \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_{sc}}{2C_T^2}$$

La caractéristique $(1/C_T^2)=f(V)$ est linéaire entre les régimes de désertion et d'inversion. L'abscisse à l'origine de cette droite est la valeur du potentiel de bandes plates du substrat. La capacité totale de la structure se déduit de l'impédance en quadrature ($C_T = 1 / Zq \cdot \omega$). Les mesures d'impédance permettent donc de mesurer le potentiel de bandes plates, et la courbure de bandes du semi-conducteur pour toute polarisation.

Les mesures d'impédances électrochimiques sur structure EDS permettent de déterminer le comportement électrique de la structure soumise à différentes perturbations

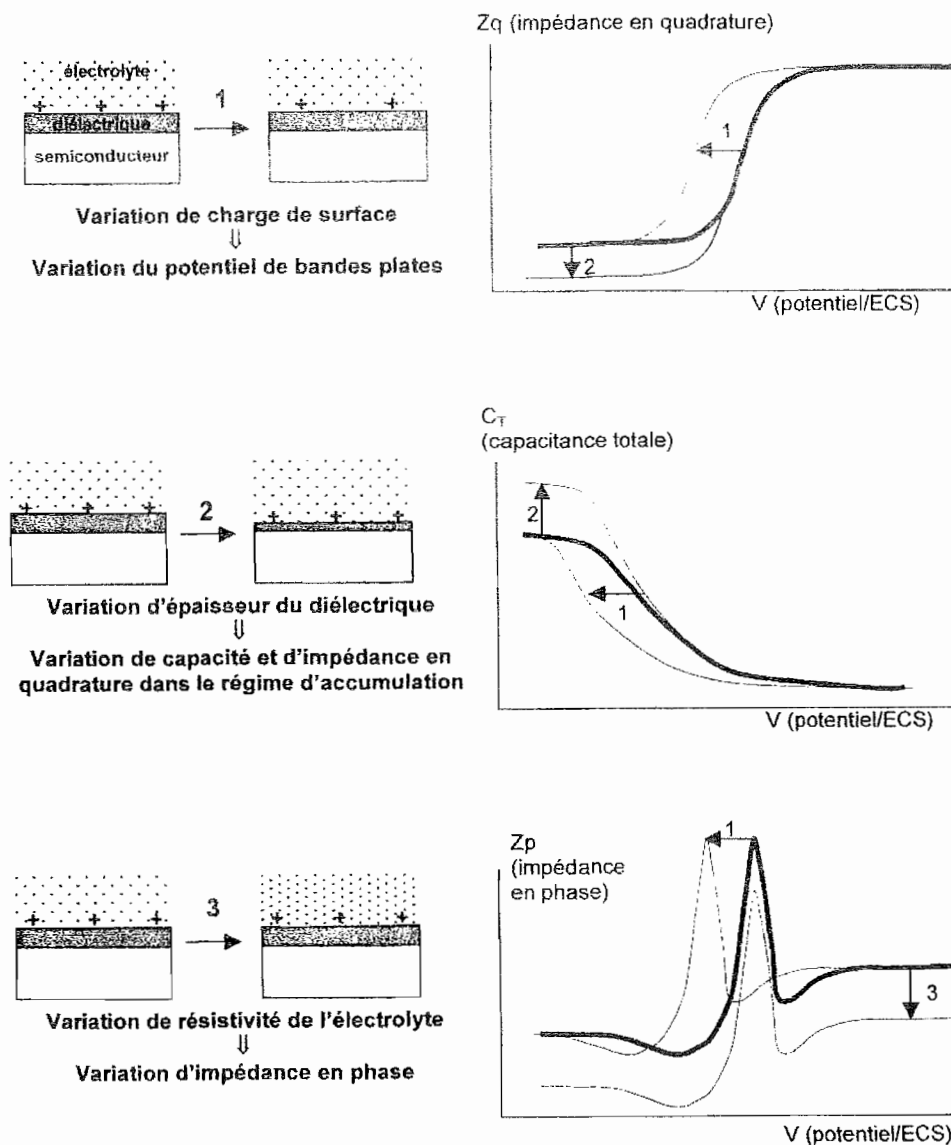


Figure 3.2.1-1 Comportement électrique de la structure EDS soumise à différentes perturbations (Cloarec, Thèse 1997).

En conclusion :

- Toute variation de la résistivité de la structure EDS entraîne un décalage de l'impédance en phase.
- Toute modification de l'épaisseur de la couche d'oxyde ou de sa constante diélectrique, en régime d'accumulation, entraîne une variation de la capacité de la structure, donc de son impédance en quadrature.
- Toute modification de la charge de surface du diélectrique entraîne une variation de potentiel de bandes plates et donc un décalage des courbes d'impédances par rapport à l'axe des potentiels.

Ainsi, en théorie, les mesures d'impédance d'une structure EDS à différents régimes permettent de déterminer ses caractéristiques électriques. Les variations d'impédances peuvent dénoter des modifications apportées à la structure, telles que changements de polarisation, de composition de l'électrolyte, de charge de surface ou d'épaisseur du diélectrique. Dans la pratique, la réalisation des substrats par oxydation thermique ou anodique du silicium ne peut se faire sans imperfections. Certaines sont d'ordre macroscopique, comme la différence d'épaisseur de la couche d'oxyde entre les bords et le centre des échantillons, entraînant une dérive spatiale des mesures. D'autres sont d'ordre microscopique, telles que les liaisons pendantes, les défauts cristallins ou le déficit d'oxygène dans l'oxyde, entraînant la présence de charges parasites dans la structure qui peuvent perturber l'effet de champ.

Cette méthode de mesures et l'observation du comportement électrique de structures EDS fonctionnalisées à l'aide d'oligonucléotides, nous ont permis d'étudier les effets de variations de charges sur la structure EDS.

3.3 Impédance optoélectrochimique

Une autre alternative, pour sonder la structure, est de la soumettre à un éclaircissement : il y a alors création de paires électron / trou. Excepté à la polarisation correspondant au potentiel de bandes plates, il existe toujours une zone, proche de la surface, où règne un champ électrique. Les électrons et les trous photogénérés, présents dans cette zone, vont être séparés par l'action du champ électrique et il en résulte une augmentation de la charge statique du semi-conducteur dans la ZCE.

Si la structure est en circuit ouvert, la charge du côté électrolytique Q_{el} demeure constante sous illumination. Afin de satisfaire à l'équilibre électrique de la structure, une nouvelle répartition des charges dans le semi-conducteur s'établit entraînant une diminution de la courbure de bandes. On observe donc une modification du niveau de Fermi du semi-conducteur et l'apparition d'un photopotential V_{PH} aux bornes de la structure.

Pour les mesures d'impédance optoélectrochimiques, on mesure un photopotential en générant un photocourant dans la structure par illumination modulée du silicium (Stricot Thèse 1986, Chen Thèse 1998, Cloarec Thèse 1997).

La Figure 3.3-1 permet de comprendre cette variation du niveau de Fermi sous illumination. Cette figure montre l'allure de la courbe représentant la charge d'un semi-conducteur de type n en fonction du potentiel de surface dans l'obscurité ($\Delta p = 0$) et sous une illumination donnée ($\Delta p \neq 0$). La droite glissante, de pente α , telle que $\tan \alpha = C_D$ (capacité du diélectrique), permet la détermination de la répartition du potentiel, par rapport au potentiel de bandes plates, à partir de la seule connaissance du potentiel de surface. Ainsi, par exemple, la répartition du potentiel V/V_{FB} , correspondant à la polarisation V continue, dans l'obscurité, s'écrit :

$$V/V_{FB} = \varphi_s + V_D \quad \text{avec } \tan \alpha = Q_T(\varphi_s)/V_D$$

Lorsque la structure EDS est soumise à un éclaircissement, auquel un taux d'injection Δp correspond, le potentiel de surface diminue, puisque la charge n'évolue pas, pour passer de φ_s à φ_s^* . Par

conséquent, la variation de la chute de potentiel dans le diélectrique ΔV_D étant nulle, la nouvelle polarisation V^*/V_{FB} s'écrit:

$$V^*/V_{FB} = \varphi_s^* + V_D$$

Le photopotential V_{ph} , aux bornes de la structure EDS, est donc :

$$V_{ph} = V^*/V_{FB} - V/V_{FB} = \varphi_s^* - \varphi_s$$

Ainsi, le photopotential aux bornes de la structure EDS est, en fait, le photopotential qui apparaît aux bornes du semi-conducteur.

La Figure 3.3-2 représente le diagramme énergétique d'une structure EDS dont le semi-conducteur est de type n, dans l'obscurité (courbe continue-polarisation continue égale à V) et sous illumination (courbe en pointillé-polarisation continue égale à V^*). Elle montre que la chute de potentiel dans le diélectrique restant constante, le photopotential qui apparaît aux bornes de la structure entraîne une variation du niveau de Fermi sous illumination et une nouvelle répartition des charges.

Dans ces conditions, une illumination modulée entraîne une modulation du niveau de Fermi du semi-conducteur, analogue à la modulation imposée à la structure EDS dans la méthode des impédances électrochimiques.

Nous noterons « impédance optoélectrochimique » (Z_{opto}) la fonction qui relie le photopotential au photocourant généré par l'éclairement.

$$V_{ph} = Z_{opto} \times J_{ph}$$

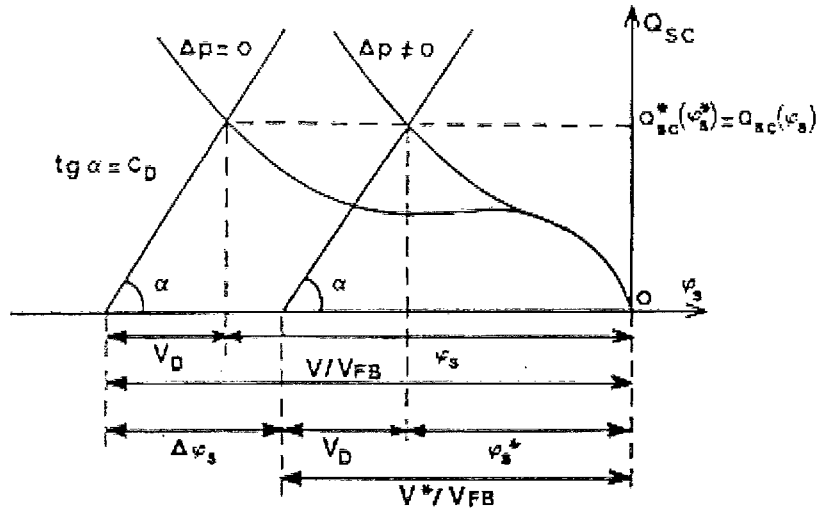


Figure 3.3-1 : Evolution de la charge d'un semi-conducteur de type n avec le potentiel de surface dans l'obscurité ($\Delta p = 0$) et sous illumination ($\Delta p \neq 0$). La droite de pente α permet de visualiser la répartition du potentiel imposée à la structure EDS par rapport au potentiel de bandes plates dans l'obscurité et sous illumination dans le cas où la charge du semi-conducteur reste constante sous éclairage et sans éclairage. D'après Stricot (thèse 1986).

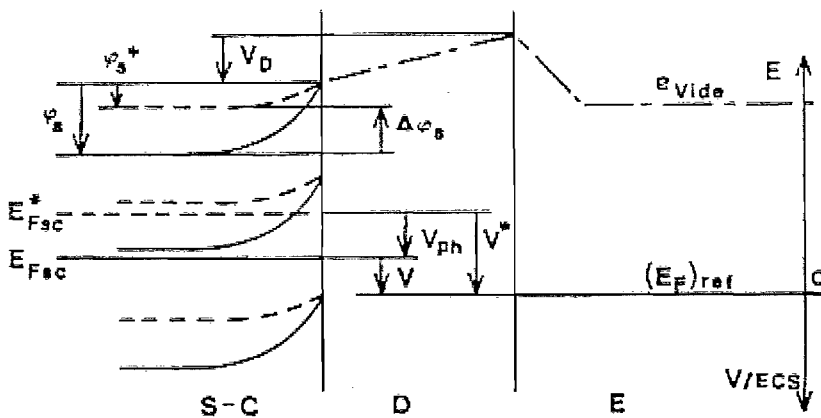


Figure 3.3-2 : Diagramme énergétique électronique d'une structure EDS comportant un semiconducteur de type n, dans l'obscurité (-) et sous illumination (- -) dans le cas où la charge du semiconducteur reste constante sous éclairage. D'après Stricot (thèse 1986).

Ces impédances complexes dépendent de la polarisation et de la fréquence de la source d'excitation. L'analyse des résultats expérimentaux à l'aide de schémas électriques, équivalents théoriques de la structure EDS, permet sa caractérisation.

Remarques et hypothèses

La sensibilité des mesures d'impédance, pour la détection de l'hybridation d'acides nucléiques liés à la surface de la silice, dépend de différents facteurs que l'on peut répertorier en grandes catégories :

- Le potentiel de polarisation correspondant à la zone de désertion du semi-conducteur. Il est favorable à l'attraction des acides nucléiques vers la surface, pour les potentiels positifs, et à leur répulsion, pour les potentiels négatifs.
- Les facteurs liés au type de fonctionnalisation et au type d'interaction entre la silice et les acides nucléiques chargés :
 - La silanisation : couverture et homogénéité de la surface (intérêt de la sensibilité des structures aux variations de pH, par exemple, et maîtrise de l'adsorption non spécifique par ailleurs).
 - Les silanes et espaceurs : l'épaisseur de ces couches (proportionnelle à la longueur des molécules pour les couches auto-assemblées) éloigne les charges des acides nucléiques de la surface sensible de la structure et permet à des ions de s'insérer, créant un effet d'écran.
 - La structure des acides nucléiques adsorbés à la surface ou organisés perpendiculairement à celle-ci.

3.4 Réalisation d'un montage de mesures optoélectrochimiques à l'échelle microscopique

La réalisation d'un banc de mesures à l'échelle microscopique a requis l'étude et la maîtrise de certaines bases :

3.4.1 Montage

La lecture des puces à ADN a nécessité la conception et la réalisation d'un banc de mesures optoélectrochimiques qui réponde aux critères essentiels de résolution, de rapidité, d'adaptation aux expériences biochimiques, etc., mais qui tienne aussi compte du prix des réactifs, en optimisant les volumes et les volumes morts de la cellule de mesures.

3.4.1.1 Types de montages

Le banc de mesures optoélectrochimiques existant était pourvu d'une source d'excitation lumineuse constituée d'une diode laser et d'un modulateur acousto-optique (Stricot Thèse 1986, Chen Thèse 1998). Ce montage nous a servi de référence pour tester les modifications envisagées.

Nous avons établi une cartographie de référence d'un échantillon de quatre pouces (~10 cm) de diamètre, de dopage type p, pourvu d'un contact ohmique Cr/Au, en face arrière, et de 45 nm de silice thermique.

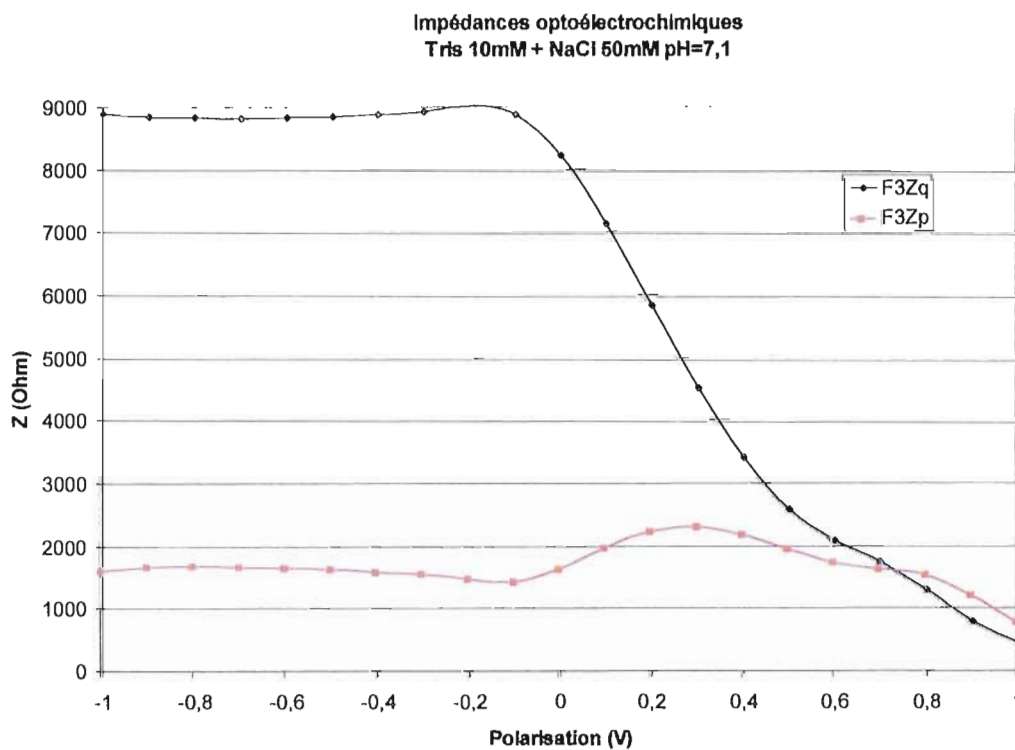


Figure 3.3.1.1-1 : Caractéristiques $Z = f(V)$ en phase et en quadrature de la structure EDS entre +1 et -1 volt par rapport à l'électrode au calomel saturé. Les mesures sont effectuées dans un tampon tris 10 mM et NaCl 50 mM à pH = 7,1. Le potentiel de cartographie continu a été choisi à 0,3 V/ecs pour être dans la zone de plus forte dynamique de la courbe d'impédance en quadrature.

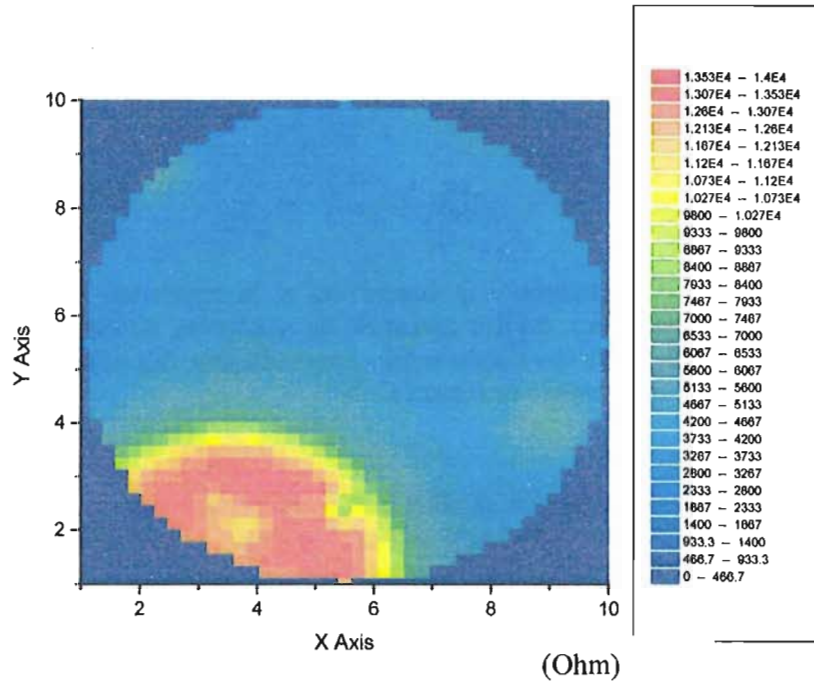


Figure 3.3.1.1-2 Cartographie d'impédance optoélectrochimique en quadrature à $V = 0,3 \text{ V/ecs}$. La cartographie (A) a été effectuée au centre de l'échantillon, sur un rayon $R = 40 \text{ mm}$; avec un pas $d = 2 \text{ mm}$.

Nous avons effectué les mesures après traitement de la surface à la solution piranha, pendant 10 minutes, suivi d'un rinçage abondant à l'eau. Cette cartographie nous a servi de référence (A) pour toutes les modifications de montage que nous avons testées. Dans un premier temps, nous avons remplacé le montage du dispositif d'illumination initial constitué d'un laser hélium-néon à 632 nm et d'un modulateur acousto-optique par une diode laser émettant à la longueur d'onde de 670 nm d'intensité modulée par modulation de la puissance d'alimentation. La figure 3.3.1.1-3 présente les caractéristiques $Z_{opto} = F(V)$ obtenues. La comparaison de ces courbes avec celles de la figure 3.3.1.1-1. montre qu'elles présentent la même allure générale mais avec une diminution générale des valeurs et un décalage vers les potentiels positifs de $0,3 \text{ V}$. La diminution des valeurs d'impédance observées peut être attribuée à la diminution du niveau moyen de l'éclairage. Le décalage en potentiel est attribuable à la modification de la surface de la silice qui évolue dans les premières heures assez rapidement après un traitement à la solution piranha. Ainsi, pour réaliser la cartographie d'impédance nous avons été contraints de polariser la structure à 0 V/ECS pour la placer dans la région de la plus forte dynamique de la courbe d'impédance.

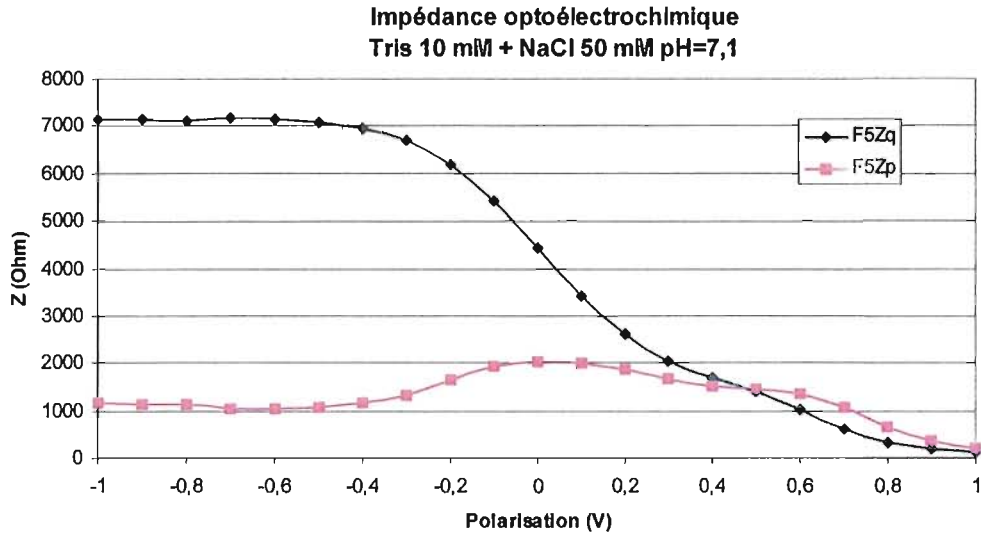


Figure 3.3.1.1-3 : Caractéristiques $Z = f(V)$ en phase et en quadrature de la structure EDS entre +1 et -1 volt par rapport à l'électrode au calomel saturé. Les mesures sont effectuées dans un tampon tris 10 mM et NaCl 50 mM à pH = 7,1. Le potentiel de cartographie a été choisi à 0 V/ecs dans la zone de plus forte dynamique de la courbe en quadrature.

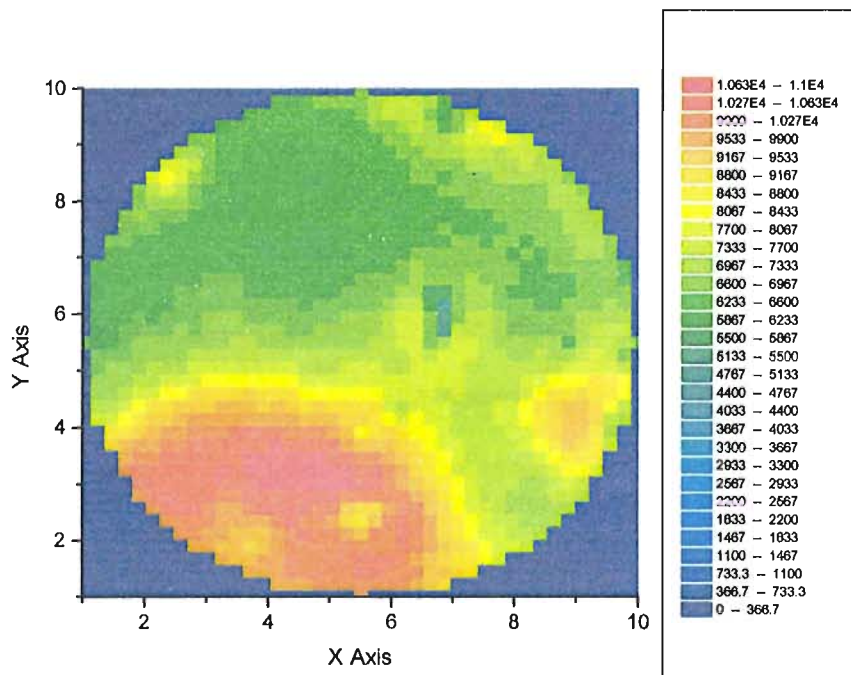


Figure 3.3.1.1-4 : Cartographie d'impédance optoélectrochimique en quadrature à $V=0$ V/ecs, avec une diode laser modulée.

La cartographie a été effectuée au centre de l'échantillon, sur un rayon $R = 40$ mm ; avec un pas $d = 2$ mm.

Cette cartographie a été effectuée avec un décalage de 300 mV vers les potentiels négatifs, par rapport à la cartographie de référence. Cette nouvelle polarisation est utilisée pour travailler dans les mêmes conditions que dans la cartographie de référence (A), pour les caractéristiques de la structure. Après un traitement très acide, comme celui à la solution piranha, la surface de la silice se met en

équilibre avec le tampon de mesures, mais cet équilibre est très long à réaliser avec de la silice thermique ; on peut assister à des dérives pendant de longues heures.

Cette cartographie, effectuée avec la diode laser modulée, est néanmoins tout à fait comparable à la cartographie de référence ; elle présente les mêmes défauts. Nous retiendrons donc ce mode d'excitation pour nos expériences ultérieures, car il présente deux avantages : un encombrement plus faible et une plus grande stabilité d'éclairement.

3.4.1.2 Influence de la focalisation

Nous avons vérifié que la réponse de la structure n'est pas fonction de la surface éclairée, en réalisant une cartographie avec un faisceau d'une surface d'un millimètre carré, puis de 250 microns carrés.

Nous avons procédé à des mesures, pour valider le montage, avec une diode laser modulée et focalisée. Nous obtenons les caractéristiques suivantes :

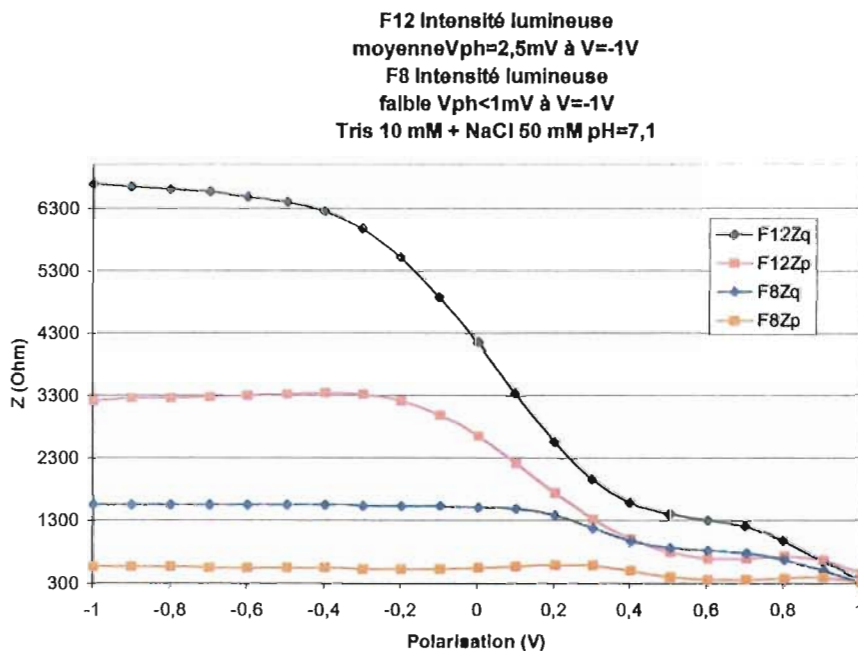


Figure 3.3.1.2-1 : Caractéristiques $Z = f(V)$ en phase et en quadrature de la structure EDS entre +1 et -1 volt par rapport à l'électrode au calomel saturé. Les mesures sont effectuées dans un tampon tris 10 mM et NaCl 50 mM à pH = 7,1.

Pour la première cartographie (F12), les caractéristiques présentées ont été réalisées avec la même intensité lumineuse que pour la cartographie non focalisée. Pour la deuxième cartographie (F8) nous avons utilisé une intensité lumineuse atténuée ($/2,5$) par un filtre polarisant. Le potentiel de cartographie a été choisi à 0,3 V/ecs, dans la zone de plus forte dynamique de la courbe en quadrature, pour les faibles intensités lumineuses (voir Figure 3.3.1.2-1)

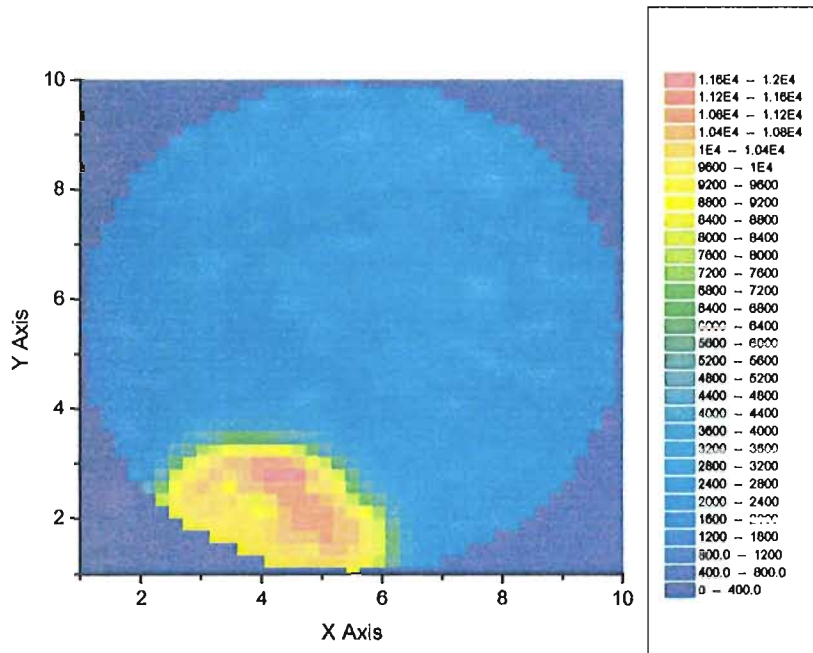


Figure 3.3.1.2-2 Cartographie d'impédance optoélectrochimique en quadrature à $V = 0,3$ V/ecs, avec une diode laser modulée et focalisée, à faible intensité lumineuse. La cartographie a été effectuée au centre de l'échantillon, sur un rayon $R = 40$ mm ; avec un pas $d = 2$ mm.

Cette cartographie, effectuée avec la diode laser modulée, focalisée et atténuée, est tout-à-fait comparable à la cartographie de référence. Cette vérification valide la méthode de mesure optoélectrochimique à l'échelle microscopique.

3.4.1.3 Montage à deux électrodes

Le montage potentiostatique à trois électrodes permet grâce à l'utilisation d'une électrode de référence, de s'affranchir de la chute de potentiel à l'interface contre-électrode/ solution. Cependant, du fait que la structure a un comportement bloquant, cette chute de potentiel devrait être faible et relativement constante puisqu'il n'existe pas de phénomènes faradiques ; elle ne devrait pas ou peu influencer sur les mesures. Il devrait donc être possible de réaliser les mesures avec un montage à deux électrodes, c'est ce que nous nous proposons de vérifier au cours des contrôles préliminaires

Afin de simplifier les montages, une deuxième étude a été réalisée. Des tests ont été effectués sur le banc de mesures à l'échelle macroscopique, pour aider à la conception du banc de mesures à l'échelle microscopique. Ils ont permis d'analyser la possibilité de passer d'un montage électrochimique de trois électrodes à deux électrodes. S'affranchir d'un montage potentiostatique permet de simplifier le montage, ceci est particulièrement intéressant pour le montage, essentiellement à l'échelle microscopique.

Un montage à deux électrodes ne conserve que l'électrode de travail et la contre-électrode. Dans ce montage on applique une polarisation entre les deux électrodes, sans pouvoir connaître la répartition des chutes de potentiel. Le problème que l'on peut rencontrer, avec ce type de montage, est l'évolution de la contre-électrode lors de différentes mesures. Ainsi il faut s'assurer que la contre-électrode est chimiquement inerte et qu'il n'y a pas d'adsorption à sa surface, qui puisse introduire des variations de ses propriétés électrochimiques lors de différentes mesures. Nous utilisons une contre-électrode en platine, ce qui nous assure la stabilité chimique dans les domaines de polarisation étudiés. Dans le premier type de cellules, il peut y avoir un risque d'adsorption sur la contre-électrode, lors des phases

d'hybridation, par exemple, alors que dans le deuxième type de cellules, la contre-électrode n'est pas en contact avec la solution pendant la phase d'hybridation.

Nous avons donc procédé à des mesures permettant de valider le montage à deux électrodes :

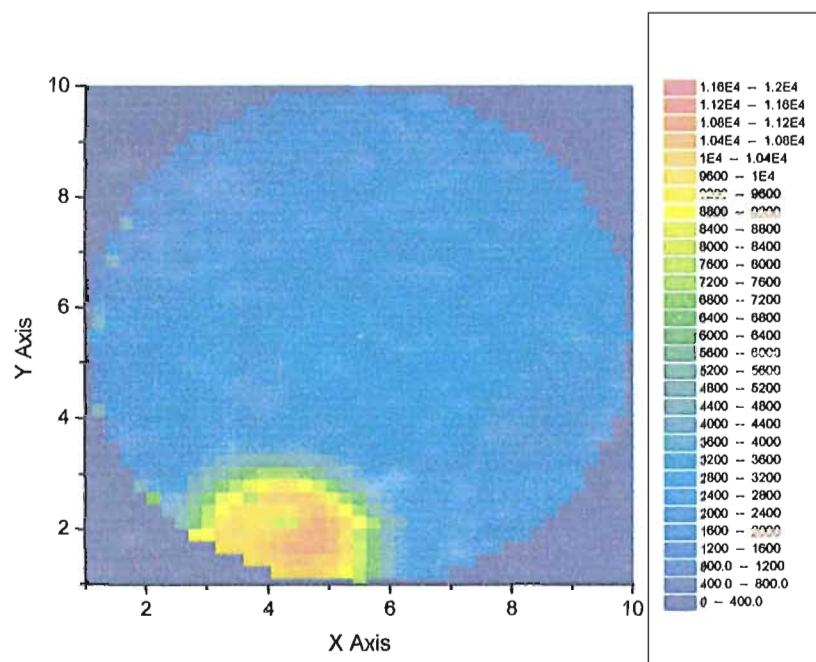


Figure 3.3.1.2-3 Cartographie d'impédance optoélectrochimique en quadrature, avec un montage à deux électrodes, à la polarisation $dV=-0,15$ V entre l'électrode de travail et la contre-électrode. L'excitation lumineuse est assurée par une diode laser modulée et focalisée. La cartographie a été effectuée au centre de l'échantillon, sur un rayon $R = 40$ mm ; avec un pas $d = 2$ mm.

Puis nous avons testé une contre-électrode originale en verre, recouverte d'oxyde d'étain (SnO_2). Ceci pourrait nous permettre de nous servir de la fenêtre du montage comme contre-électrode.

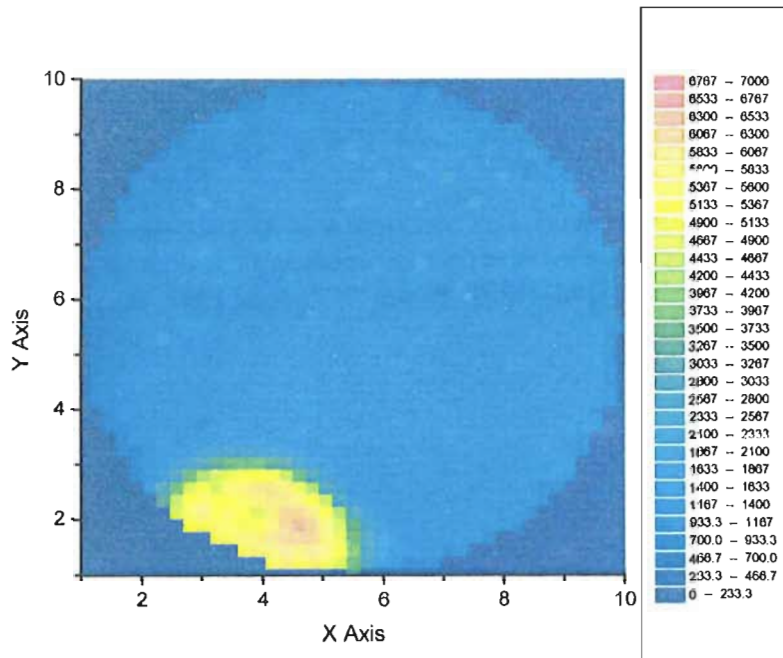


Figure 3.3.1.2-4 Cartographie d'impédance optoélectrochimique en quadrature avec un montage à deux électrodes, avec $dV = -0,4$ V. L'excitation lumineuse est assurée par une diode laser modulée et focalisée.

La cartographie a été effectuée au centre de l'échantillon, sur un rayon $R = 40$ mm ; avec un pas $d = 2$ mm.

Ces cartographies, effectuées avec la diode laser modulée, focalisée et atténuée, avec une contre électrode en platine ou en SnO_2 sont tout à fait comparables à la cartographie de référence. Cette vérification valide la méthode de mesure optoélectrochimique avec un montage à deux électrodes.

4 LE MICROTAMPONNAGE (MICRO-CONTACT PRINTING)

Le microtamponnage est une technique de localisation et de confinement pouvant être utile pour différents types d'adressage, comme le jet, et pour une meilleure lisibilité des puces lors de leur lecture (Xia[1]&[2] 1998&1997, Kumar[1]&[2]1994, Wang 1997, Jeon 1997, Pompe 1999, Mrksich 1996, @[1], Lahiri 1999).

4.1 Principe

Le principe de réalisation de réseaux organofonctionnels est basé sur l'adressage sélectif de molécules organiques, de fonctionnalités différentes à la surface d'un substrat.

On définit un réseau par l'utilisation d'au moins deux types d'extrémités organiques différentes (ou de mélanges différents), greffés à la surface, dans des zones distinctes.

On peut localiser soit un, soit tous les dépôts de molécules ou de mélanges de molécules à la surface du substrat. Les zones ainsi définies ont pour principales caractéristiques des différences de réactivité chimique, de propriétés physico-chimiques, notamment d'énergie de surface qui entraînent une différence de mouillabilité vis-à-vis des solvants. La localisation du dépôt se réalise par transfert mécanique des molécules vers la surface des substrats. Dans un premier temps, l'adsorption des molécules, des solutions, ou des mélanges à transférer, sur une matrice (tampon) est effectuée. La matrice est ensuite mise en contact avec le substrat ; la pression et le temps de contact sont optimisés en fonction de la réactivité entre substrat et molécules à greffer. Dans un deuxième temps, d'autres molécules, ou mélanges de molécules sont greffés, soit par transfert localisé, comme dans la première phase, soit sur l'ensemble du substrat, s'il n'y a pas de risque d'interaction entre les molécules successivement déposées.

Des réseaux organofonctionnels sont utilisés pour la localisation de réactions chimiques. Lorsqu'ils sont mis en contact avec des substrats de type silice/silicate, les solvants minéraux ou organiques (eau, alcool, acétone, acétonitrile, tétrahydrofurane, solvants chlorés...), sont très mouillants. Cette propriété est bénéfique pour la réactivité des solutés vis-à-vis du substrat, mais elle est un inconvénient pour le confinement des réactifs dans une zone localisée du substrat. Plusieurs solutions ont été mises en œuvre pour confiner les réactifs (Calvert 1993, Urban 1999) :

- La réalisation de puits dans lesquels les réactifs sont déposés
- La réalisation de sur-structures par des procédés de stéréolithographie, par exemple.
- La délimitation des zones de synthèse par des résines hydrophobes photosensibles, ou des couches organiques, après lithographie, insolation et développement.

La solution que nous avons retenue, consiste à délimiter les zones de synthèse par « micro-contact printing ». Grâce à cette technique nous profitons de deux avantages :

- La délimitation des zones de réaction par des molécules transférées de caractère hydrophobe ayant une énergie de surface très faible. (confinement des réactifs dans les zones hydrophiles du réseau) (Drelich [1]&[2] 1996&1994)
- La présence de groupements fonctionnels qui permettent des réactions localisées dans les nœuds hydrophiles du réseau.

4.1.1 Stratégies de multifonctionnalisation

Les puces à ADN sont des réseaux de plots d'oligonucléotides ou de brins d'ADN monocaténares. Chaque plot ou série de plots doit être constitué de brins d'ADN de séquences différentes. La localisation des réactions de synthèses d'oligonucléotides ou d'accrochages de brins présynthétisés est la difficulté majeure dans la réalisation des puces à ADN. Nous proposons de résoudre ce problème en fabriquant des substrats par étapes successives de fonctionnalisation, dont une au moins est obtenue par micro contact printing. Nous pouvons utiliser différentes méthodes :

- La première méthode est celle du micro-transfert d'une couche organique de type hydrophobe, délimitant des zones qui seront fonctionnalisées, dans une seconde étape, avec des molécules possédant une extrémité réactive. Cette deuxième étape peut être réalisée de différentes manières : par micro-transfert avec le tampon complémentaire, ou par traitement en solution de l'ensemble de l'échantillon. Dans ce dernier cas, il faut s'assurer de l'absence de réactivité de la seconde solution avec les zones où a eu lieu le premier transfert.

Une variante de cette méthode (inversée) consiste à transférer, dans un premier temps, par tamponnage, une couche organique possédant une extrémité réactive. Mais la qualité de cette fonctionnalisation est moins bonne que celle obtenue en solution ; or, notre objectif est d'obtenir la meilleure qualité de couche organique possédant une extrémité réactive. Nous écartons donc ce procédé de notre étude.

- La deuxième méthode consiste, dans un premier temps, en la fonctionnalisation en solution des substrats avec des molécules organiques possédant une extrémité réactive, puis au micro-transfert de molécules réactives vis-à-vis de la première couche organique (capping). Ces molécules amènent des propriétés physico-chimiques différentes, du type hydrophobe, à la surface des zones transférées. Cette méthode comporte des risques, la couche transférée par tamponnage est rapportée à la surface ce qui, selon la taille du réseau, peut gêner l'accès à la couche réactive. Une solution est d'utiliser des molécules courtes lors du micro-transfert, mais ceci est au détriment de la structuration de la couche transférée et risque de contaminer des zones non transférées en augmentant la volatilité des molécules de la solution transférée.

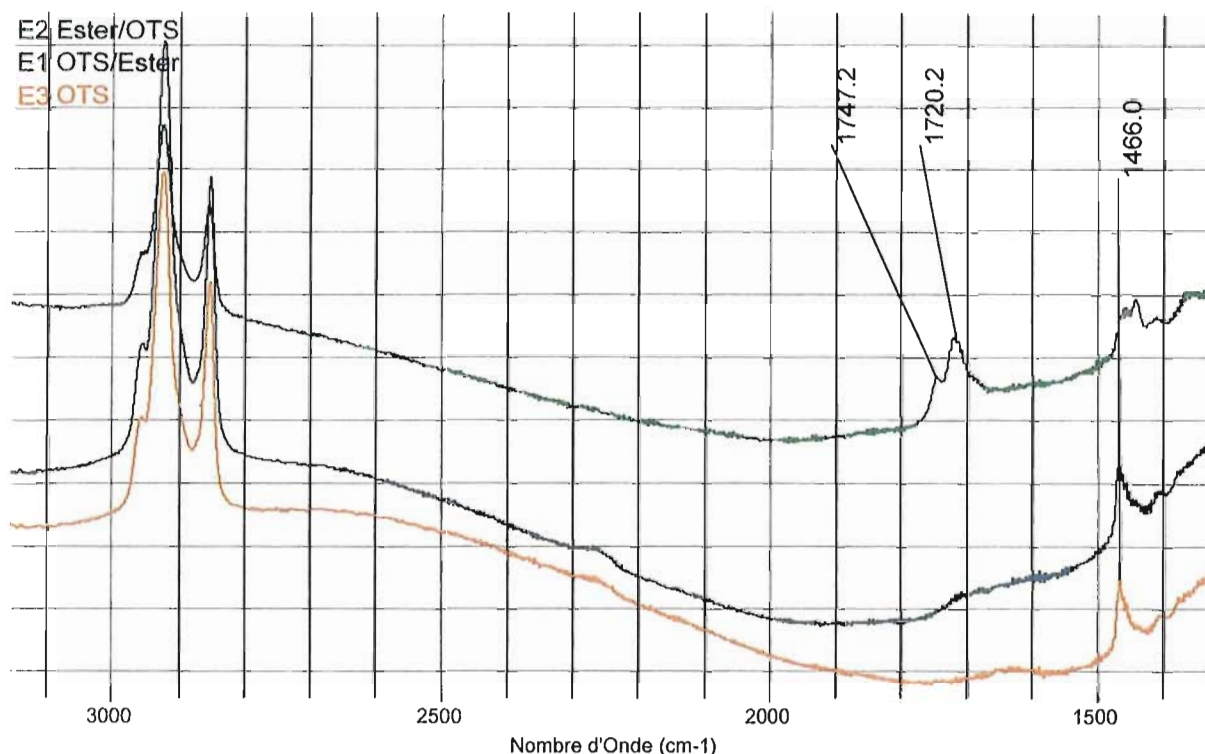


Figure 4.1.1-1: Spectres infrarouge sur silicium poreux à échelle commune :

- En rouge (référence) : silanisé OTS (ν CH₂ et ν CH₃ de 2800 à 3000 cm^{-1} et δ CH₂ à 1466 cm^{-1}).
- En bleu : silanisé OTS puis Ester (ν CH₂ et ν CH₃ de 2800 à 3000 cm^{-1} et δ CH₂ à 1466 cm^{-1}).
- En vert : silanisé Ester puis OTS (ν CH₂ et ν CH₃ de 2800 à 3000 cm^{-1} , δ CH₂ de 1466 à 1450 cm^{-1} , et ν C=O deux pics à 1730 et 1715 cm^{-1})

Afin de vérifier la validité des solutions envisagées, nous avons réalisé des expériences de silanisation sur des substrats de silicium poreux, ce qui nous a permis d'effectuer un suivi infrarouge de chaque étape d'une multifonctionnalisation.

Ces mesures de spectrométrie infrarouge (fig 4.1.1-1) nous confirment l'absence de réactivité des surfaces, préalablement silanisées Ester ou OTS, pour une deuxième silanisation : absence des pics à 1730 et 1715 cm^{-1} ν C=O sur l'échantillon préalablement silanisé OTS puis Ester (en bleu) et absence d'une augmentation de l'aire des pics de 2800 à 3000 cm^{-1} ν CH₂ et ν CH₃ sur l'échantillon préalablement silanisé Ester puis OTS (en vert).

Les deux méthodes ont été mises en œuvre : pour la première, nous avons transféré de l'octadécyltrichlorosilane (OTS) par tamponnage sur une surface de silice hydroxylée, puis, après recuit et lavage aux ultra-sons, nous avons silanisé en solution avec un silane ester. La deuxième méthode a été appliquée à une surface silanisée, en solution avec le silane ester, puis activée au NHS, sur laquelle une amine pourvue d'une longue chaîne alkyle a été micro-transférée.

4.2 Elaboration des tampons

4.2.1 Conception des masques

La conception des masques a été réalisée avec les logiciels LEDIT et LASI. Dans notre étude, les premiers essais ont été réalisés avec les masques conçus pour la photochimie du troisième niveau (4096 plots / 4 cm² : fentes ouvertes parallèles de 312,5 µm de largeur, séparées de 937,5 µm). Puis nous avons conçu des masques constitués de réseaux de formes circulaires (de 500 µm de diamètre, espacés de 250 µm ; à 100 µm de diamètre, espacés de 50 µm).

4.2.2 Lithographie

Différentes méthodes ont été mises en œuvre selon la technique de gravure employée et le type de masque utilisé pour les insulations. Ainsi le masque de photochimie constitué de fentes parallèles nous a amenés à réaliser deux insulations croisées à 90°, pour définir des zones fermées (carrés). Nous avons testé deux types de résines positives : AZ5214 et AZ5440. La première nous permet d'obtenir des épaisseurs de 0.5 à 1 µm avec des effets de bords limités (ce qui est intéressant pour les grandes surfaces) mais la résistance de cette couche aux traitements chimiques post-lithographiques est insuffisante et génère des défauts. La deuxième résine nous a permis d'obtenir des épaisseurs de 4 µm supprimant les défauts dans les attaques chimiques postérieures, ceci, tout en gardant une résolution satisfaisante à l'échelle des motifs que nous utilisons. Les essais menés avec ce masque ont été réalisés pour préparer les échantillons à une gravure humide. Les échantillons réalisés avec la deuxième série de masques ont été prévus pour la gravure sèche. Cette technique a été mise en œuvre avec les mêmes résines et le même prétraitement HF que la gravure humide. Un autre procédé a aussi été testé pour remplacer le masque de gravure en SiO₂ par un masque métallique. Ce masque a été obtenu par dépôt sous vide sur substrat lithographié puis réalisation d'un « lift-off » de la résine à l'acétone. Cette alternative, pour la gravure silicium, nous permet d'avoir un masque beaucoup plus résistant au plasma chloré ou fluoré que la silice. Dans ce dernier cas, nous avons utilisé la résine AZ5214 en résine négative par double insolation pour obtenir une bonne qualité de « lift-off ».

4.2.3 Gravures sèches et humides du silicium

Il existe deux principaux procédés de gravure :

- la gravure humide réalisée par attaque chimique. Elle est facile à mettre en œuvre et peu onéreuse.
- La gravure sèche réalisée par attaque plasma dans un réacteur. Elle est plus coûteuse mais permet de réaliser des formes circulaires et d'obtenir des flancs de gravure droits.

4.2.3.1 Gravure humide

Nous avons testé deux types d'attaques du silicium après ouverture du masque de silice au HF tamponné (HF, NH₄F, H₂O : 1.5 nm/s) (Knotter 2000, Watanabe 1991)

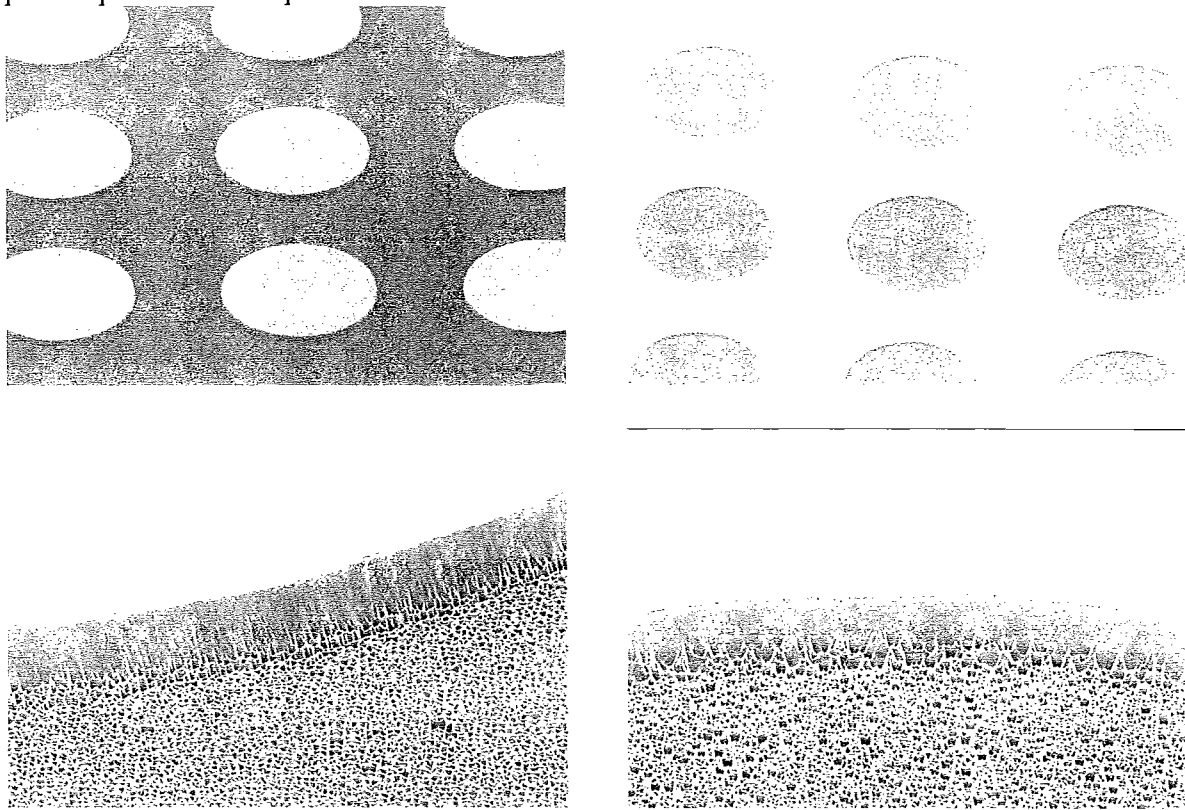
- Mélange éthylène-diamine, pyrocathécol, pyrazine, eau ayant une sélectivité de 60/1 Si/SiO₂
- Mélange potasse, eau (500 g/l) à 80°C (1 µm/min sur les plans 1.0.0.) ayant une sélectivité de 400/1 Si/SiO₂ et une sélectivité faible entre les plans cristallins du silicium, ce qui ne permet pas de faire des usinages chimiques de formes perpendiculaires sans attaques des plans (1.1.0) au niveau des intersections ([2], Bassous 1978, Bean 1978).

Notre objectif étant d'obtenir des plots circulaires pour faciliter un adressage par jet, nous n'avons pas retenu le procédé de gravure humide du silicium et avons procédé à des essais de gravure sèche.

4.2.3.2 Gravure sèche

Nous nous sommes servis de protocoles standards de gravure RIE (Reactive Ion Etching) du silicium établis au LEOM pour des échantillons de silicium dont le masque de protection est constitué de silice thermique (2 µm sur nos échantillons) : Plasma 250 W, Cl₂ 100 mTorr, débit de 20 sscm.

Les travaux de D.L. Flamm (1981) ont été très utiles pour la compréhension des gravures RIE et pour l'optimisation des plasmas.



échantillons Si/SiO₂ après dépôt de résine, lithographie, développement, et gravure plasma au Chlore; 20 minutes à gauche (motifs positifs), 10 minutes à droite (motifs négatifs).

motifs : plots de 500 μm de diamètre séparés de 250 μm .

On peut voir une partie gravée de l'échantillon de type cristallin et la partie protégée par la silice du type amorphe ; la hauteur de marche est d'environ 25 μm à gauche et 15 μm à droite

Détails du motif positif : flanc et fond de gravure

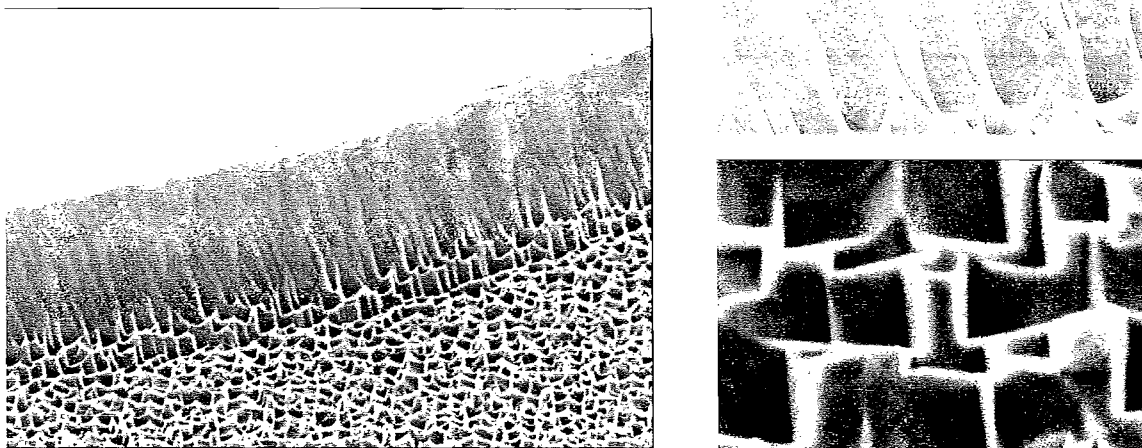
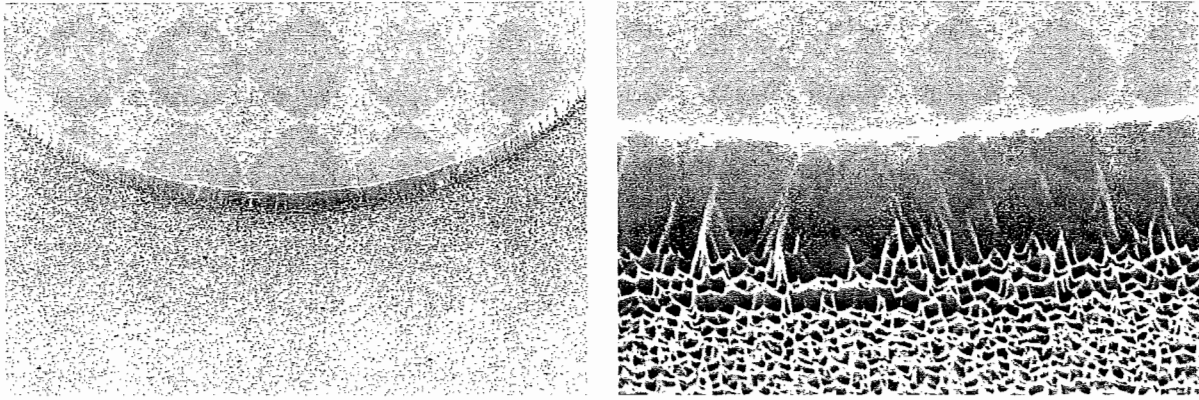
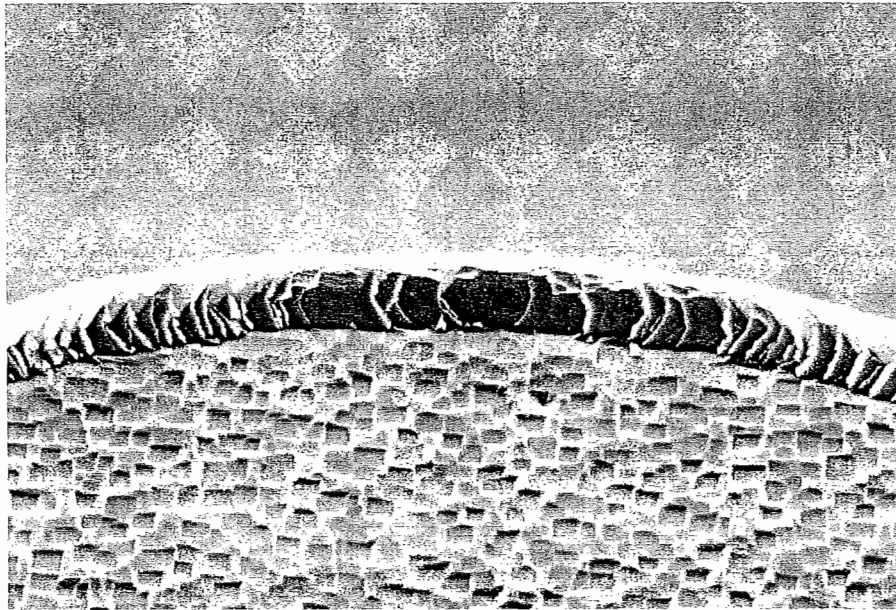


Figure 4.2.3.2.-1 : Caractérisation MEB des usinages au plasma chloré du silicium.



même échantillon après traitement au "BOE"(HF tamponné : HF/NH₄F/H₂O) qui dissout la silice de protection



échantillon négatif après dissolution des membranes cristallines de silicium (fond de gravure) à la potasse et dissolution de la silice formée au BOE.

Figure 4.2.3.2-2 : Caractérisation MEB des échantillons après usinage au plasma chloré du silicium, traitement à la potasse puis au BOE.

Les figures 4.2.3.2-1 et 4.2.3.2-1 nous permettent d'observer une matrice de silicium lors de la gravure sèche d'un réseau de plots. Les différents grossissements nous permettent d'observer les détails des motifs après gravure et d'apprécier l'efficacité du traitement à la potasse sur le fond de gravure.

4.2.4 Modification chimique de surface

Après les étapes de gravure il est nécessaire d'éliminer les matériaux ayant servi de masque de gravure comme la silice (ou l'or) par le BOE (ou l'eau régale, respectivement). Il s'ensuit une passivation du silicium par formation d'une couche d'oxyde natif au contact de l'air ambiant. Cette couche d'oxyde natif peut, elle aussi, être fonctionnalisée par silanisation afin d'optimiser ses propriétés physico-chimiques (adsorption et/ou adhésion).

Les échantillons en silicium obtenus, silanisés à l'OTS, peuvent être directement utilisés pour réaliser des transferts d'OTS sur les puces. Généralement les échantillons de silicium micro-usinés, puis silanisés à l'OTS ou aux fluorosilanes, servent de matrice pour le moulage de tampons en polymères. La silanisation évite l'adhésion du polymère et facilite le démoulage du tampon.

4.2.5 Obtention de tampons par moulage

Les matrices silanisées à l'OTS sont répliquées par moulage, les matériaux utilisés sont des polymères du type polydiméthylsiloxane (ou des dérivés fluorés de ce polymère). Dans nos travaux nous avons utilisé des polymères commerciaux (Rhodosyl n°489) dont la composition exacte ne nous est pas communiquée. Leur préparation et utilisation consistent à mélanger le polymère à un catalyseur (4% en masse) puis à recouvrir la matrice avec le mélange. Après 24 heures on peut procéder au démoulage, au découpage puis au collage des tampons sur un support.

4.3 Mise en œuvre et protocole de transfert

Les transferts s'effectuent sur des substrats propres, ayant subi le prétraitement à la solution piranha et un séchage sous flux d'azote (sans stockage prolongé avant utilisation). Le tampon est imbibé, par immersion dans une solution de silane à 10 mM dans du CCl₄, de l'hexane ou de l'heptane. Puis, après élimination de l'excès de solution par un flux d'azote, le tampon est mis au contact de l'échantillon pendant quelques secondes. Après le transfert les échantillons sont recuits pendant 1 heure à 105°C.

Pour obtenir une bonne reproductibilité de positionnement et une pré-automatisation de cette phase de tamponnage, nous nous sommes servis d'une platine de déplacement (X, Y, Z) Charly-Robot pilotée par ordinateur. La précision de reproductibilité du positionnement est alors de l'ordre de 10 µm.

4.4 Caractérisations et résultats obtenus

Un substrat Si/SiO₂ est fonctionnalisé par microtamponnage à l'OTS avec un tampon de silicium, lui-même fonctionnalisé à l'OTS, présentant des zones carrées de 937,5µm de côté, séparées par 312,5µm.

Le substrat est silanisé avec le CDSUM, puis le H₂N-POE est greffé. Des oligonucléotides L185 sont synthétisés sur un large plot (14 mm de diamètre), puis hybridés avec des oligonucléotides U185 marqués CY3. On obtient alors, par cartographie de fluorescence, les caractérisations présentées dans la figure 4.4-1.

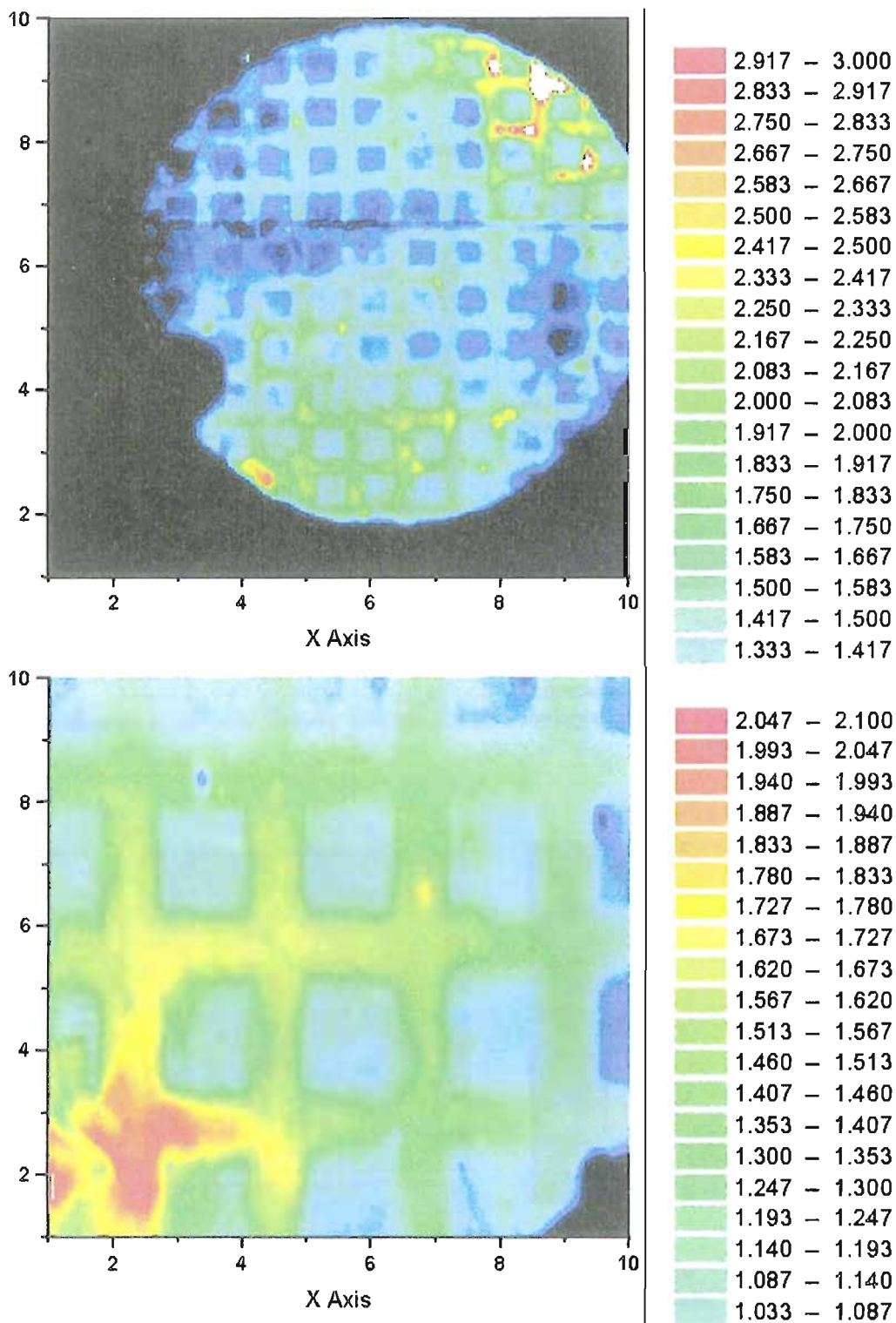


Figure 4.4.1 Cartographies de fluorescence.

Les zones préalablement tamponnées à l'OTS présentent bien des intensités de fluorescence nettement inférieures aux autres. Ces résultats pourraient être améliorés en employant des tampons en polymères propices à une meilleure qualité de transfert.

Un autre substrat Si/SiO₂ a été fonctionnalisé par micro transfert d'OTS, avant d'être silanisé avec le CDSUM et greffé au H₂N-POE. Le tampon utilisé cette fois-ci est en PDMS et présente un réseau de formes circulaires de 500 µm de diamètre, espacées de 250 µm. Quatre plots de synthèse d'ADN ont été effectués avec le dispositif « Macro » : 2 plots TTT-L185 et 2 plots TTT-U226. Les

caractérisations par cartographies de fluorescence, après hybridation avec des oligonucléotides U 185-CY3, sont présentées ci-dessous.

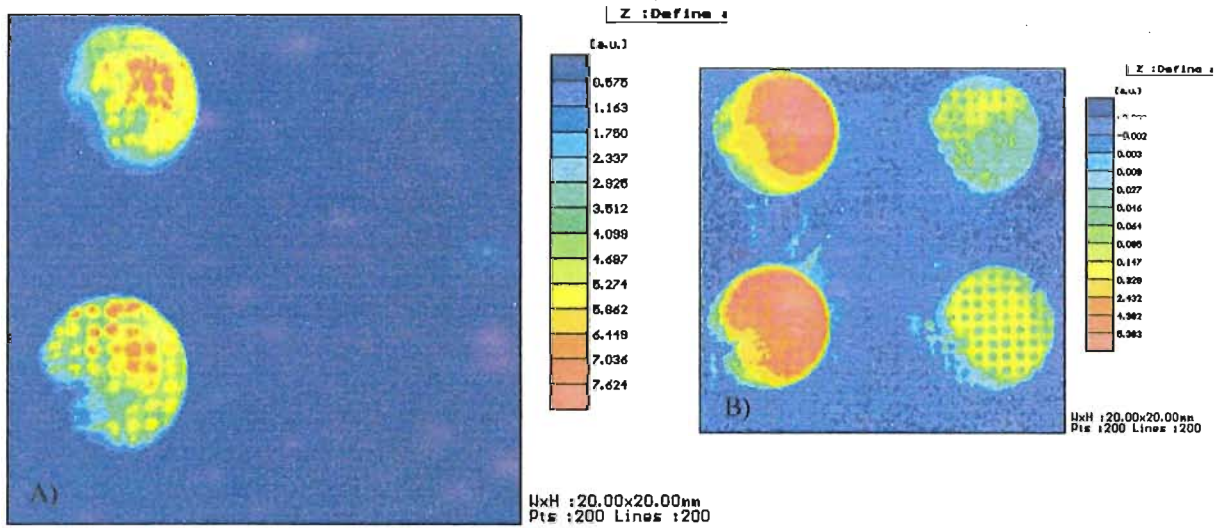


Fig 4.4-2 : Echantillon après micro-transfert d'OTS, puis silanisation Ester, greffage POE, synthèse sur quatre plots (2*TTT-L185 à gauche et 2*TTT-U226 à droite) et hybridation U185-CY3 (PL = 10 mW).

A) En pleine échelle linéaire d'intensité de fluorescence

B) L'échelle des intensités de fluorescence en population est utilisée pour pouvoir observer la réponse des plots non complémentaires (à droite).

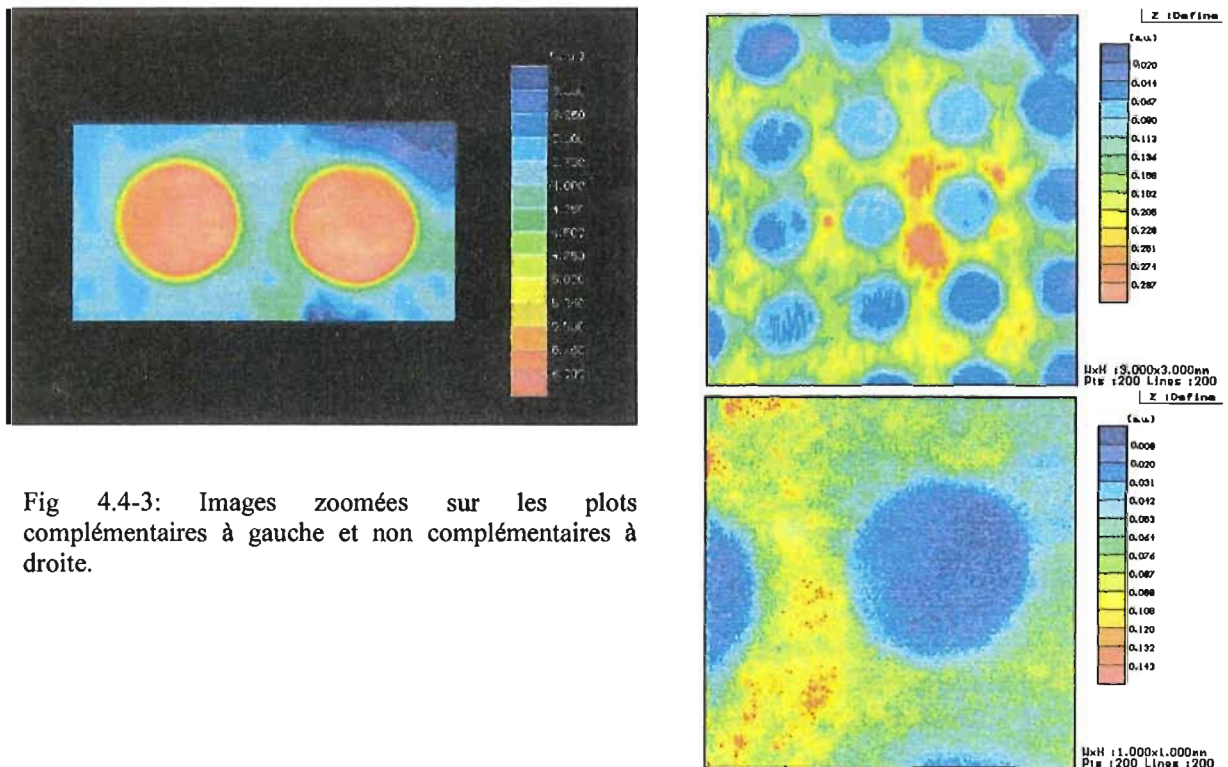


Fig 4.4-3: Images zoomées sur les plots complémentaires à gauche et non complémentaires à droite.

Sur les images des figures (4.4-2 et 4.4-3), au niveau des plots non complémentaires (plots U226) l'intensité de fluorescence est plus grande autour des plots que dans les plots : cela signifie qu'il y a

plus d'adsorption non spécifique sur l'OTS transféré que sur les zones H₂N-POE – oligonucléotide non complémentaire.

Une autre voie d'utilisation du micro-tamponnage consiste en un usinage par gravure des substrats (création physique d'un réseau de trous) puis en un transfert de la solution de silane par application des substrats usinés sur une surface plane préalablement imbibée de solution. Après recuit, silanisation au CDSUM, greffage de H₂N-POE et synthèse sur deux plots (L185 à droite et U226 à gauche) avec le dispositif « Macro », on procède à l'hybridation U185-CY3, que l'on caractérise par cartographie de fluorescence (figures : 4.4-4 à 4.4-6).

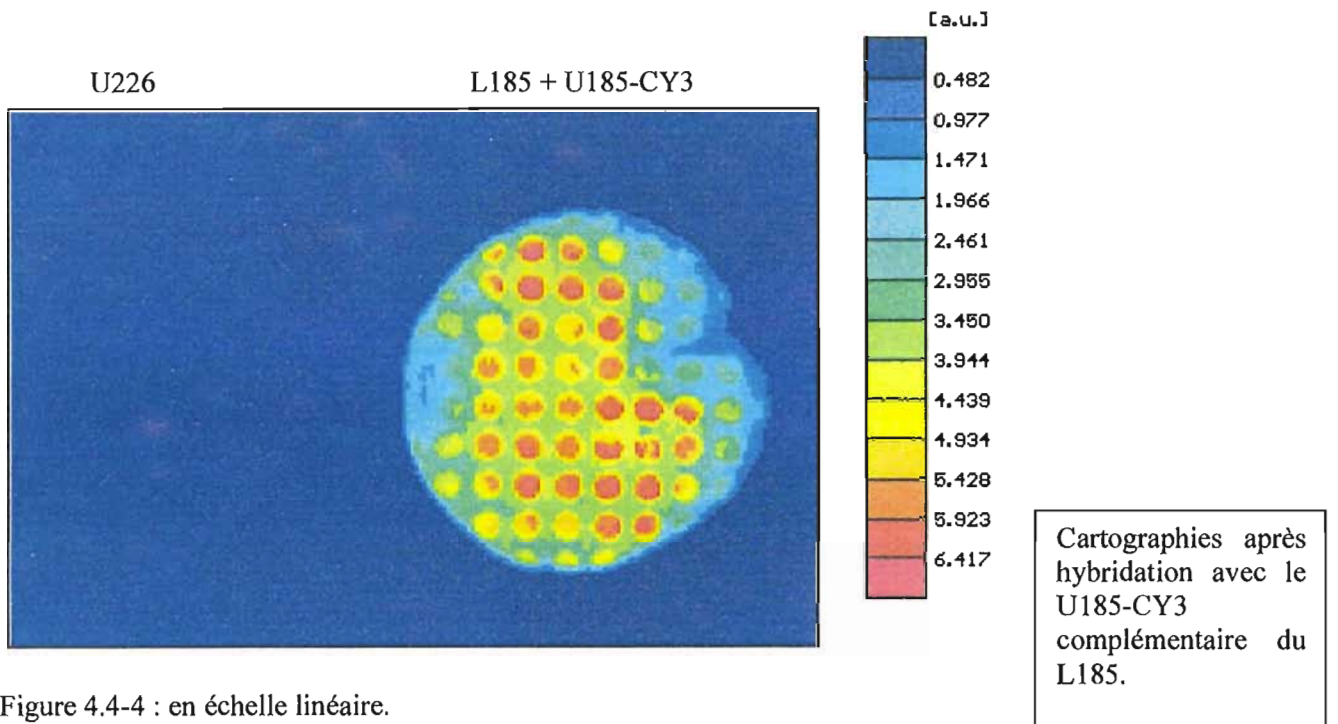


Figure 4.4-4 : en échelle linéaire.

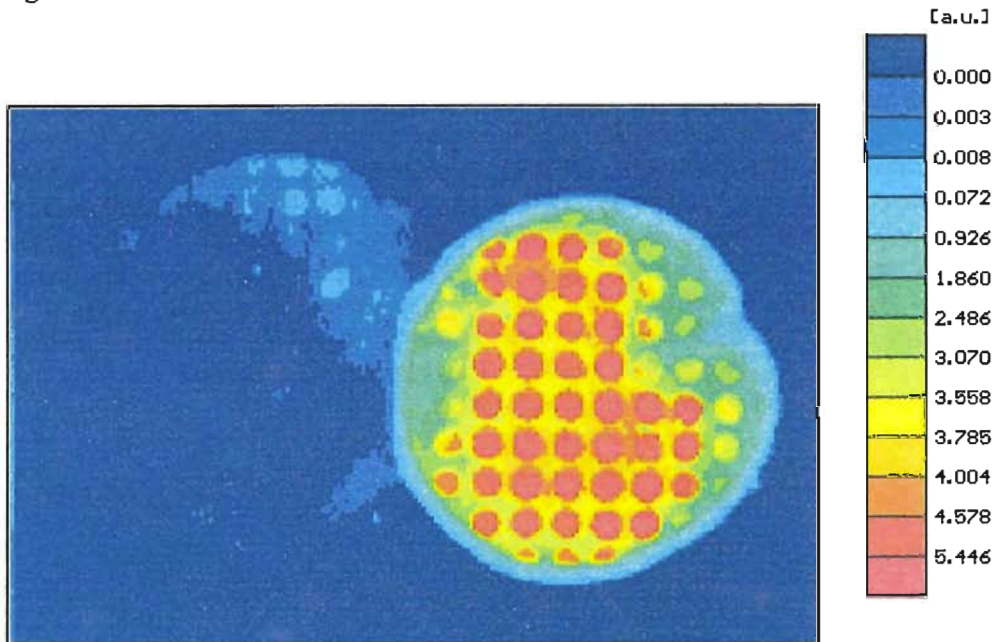


Figure 4.4-5 : en échelle par population, pour apercevoir la réponse non spécifique du plot U226 à gauche.

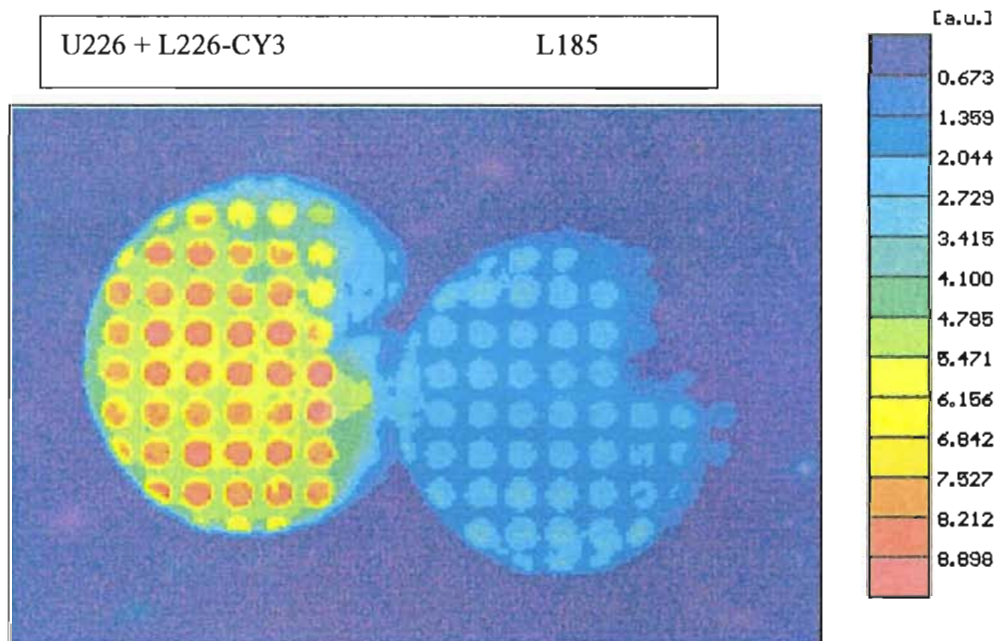
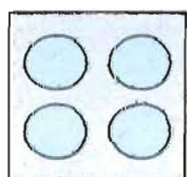


Figure 4.4-6 : Après dénaturation (1 minute NaOH 0,1M), hybridation L226-CY3 et lavage SSC 2X.

On a procédé à la dénaturation et à l'hybridation avec le L226-CY3. On peut observer cependant, sur la figure 4.4-6, que la dénaturation n'a pas été suffisante pour diminuer la réponse du plot L185 jusqu'au niveau de l'adsorption non spécifique de la première hybridation (U185-CY3).

La principale application du micro-tamponnage pour les puces à ADN est le confinement des gouttes au cours de l'adressage réalisé par jets. La différence d'énergie de surface permet d'augmenter l'angle de contact des solutions avec la surface et d'accroître les volumes pour une même surface de contact. Un autre avantage est présenté dans les caractérisations suivantes pour les systèmes à jets : c'est la correction de tir (dernière figure). Une goutte, projetée de façon décentrée sur un plot, voit sa position automatiquement rectifiée par un simple effet d'affinité pour la surface du plot par rapport au reste de la surface micro-transférée. Nous présentons des cartographies de fluorescence d'un réseau au pas de 750 μm (diamètre des plots 500 μm) réalisé par micro-transfert d'OTS, puis silanisation avec le CDSUM, activation au NHS et projection d'oligonucléotides porteurs, à la fois, d'un groupement fluorophore (CY3) et d'un amino-espaceur pouvant former avec l'acide activé une liaison peptidique (amide). La projection a été effectuée par une machine développée au laboratoire, basée sur l'utilisation de micro-vannes. Sur la dernière image de la figure 4.4-7, on voit également des petites gouttes (satellites) dont les positions par rapport aux gouttes principales sont invariables. Ces satellites sont dus à l'utilisation des microvannes de la machine de projection.



- Ester activé
- OTS

Surface de l'échantillon après fonctionnalisation par microtamponnage et avant la projection d'oligonucléotides L185-CY3.

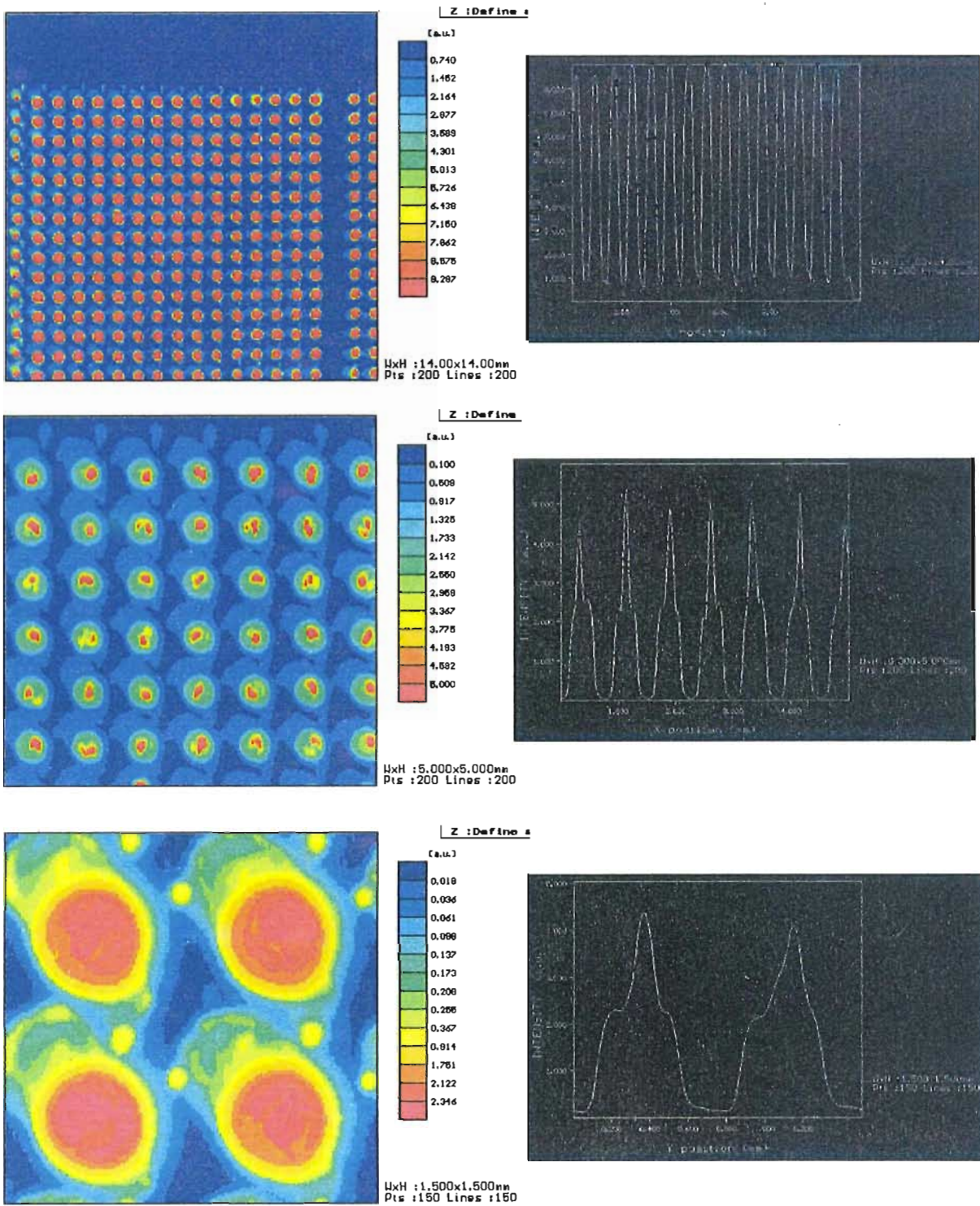


Figure 4.4-7 : cartographies de fluorescence et analyses de sections caractérisant l'immobilisation d'oligonucléotides, porteurs de groupements CY3, adressés par micro-déposition par jets.

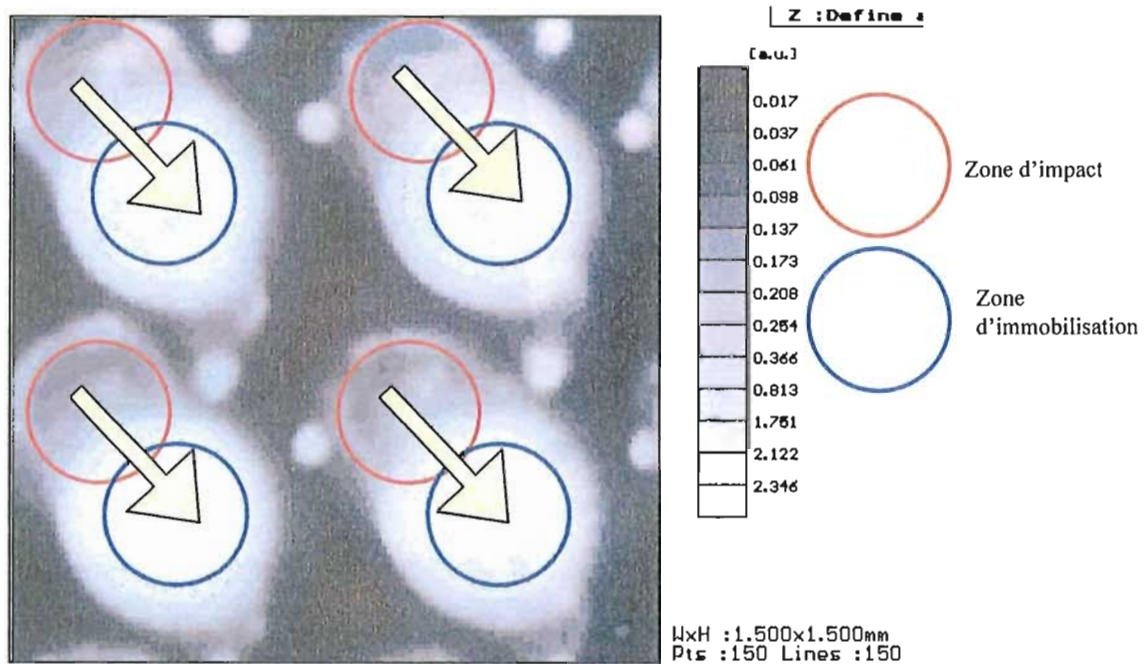


Figure 4.4-8 : Cette cartographie à fort grossissement, avant désactivation de la surface et lavage, révèle l'efficacité d'un réseau hydrophile / hydrophobe, pour concentrer les réactifs dans les nœuds hydrophiles du réseau ; la différence d'énergie de surface constituant la force motrice de ce réarrangement.

Enfin, après désactivation et lavage, on obtient une surface aux caractéristiques géométriques bien maîtrisées.

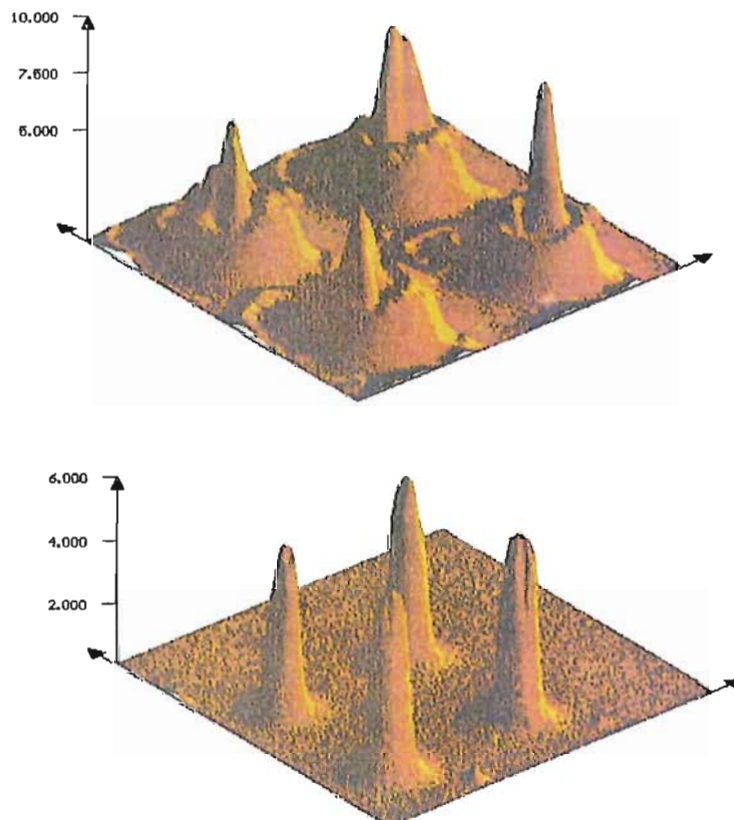


Figure 4.4-9 : Cartographies de fluorescence en trois dimensions de l'échantillon avant et après désactivation et lavage de la surface.

Conclusion :

Nous avons développé des outils permettant la micro-structuration des substrats par réalisation de structures bidimensionnelles physicochimiques en réseaux sur des supports de type silice. La technique utilisée fait appel au transfert de molécules, de façon localisée, par l'intermédiaire d'un micro-tampon. Nous avons défini les conditions de fabrication de ces tampons et en avons obtenu formant un réseau de plots de 500 μm de diamètre avec un pas de 750 μm . Ces tampons sont utilisés pour réaliser des motifs permettant un adressage localisé des liquides. Deux types de supports ont été envisagés :

- d'une part, des substrats, sur lesquels des dépôts d'OTS forment des zones hydrophobes, qui confinent des plots de silice nue. Ces plots sont ensuite fonctionnalisés par greffage d'un silane, qui permet l'immobilisation ou la synthèse de brins d'ADN.
- d'autre part, des substrats fonctionnalisés, sur lesquels le tampon a servi à déposer un motif de longue chaîne alcane hydrophobe. Ces deux techniques ont montré la possibilité de réaliser des supports à l'échelle microscopique.

5 LA MICROFLUIDIQUE : TECHNIQUE D'ADRESSAGE DE REACTIONS CHIMIQUES

Une alternative aux systèmes d'adressage par la lumière, qui délimitent les zones de synthèse par des réactions photochimiques localisées, consiste à réaliser un adressage mécanique des réactifs de synthèse chimique (Weiler 1996). L'adressage est obtenu par circulation des réactifs dans des canaux micro-usinés. Cette technique a nécessité la fabrication, en salle blanche, de systèmes usinés dans du silicium (100) par des attaques chimiques sélectives localisées par photolithographie. Nous avons réalisé un montage connecté sur le synthétiseur pour alimenter et maintenir le système en contact avec la puce lors de la synthèse, remplaçant ici le dispositif d'adressage « macro ».

L'avantage de la microfluidique sur la photochimie est d'utiliser les réactifs de synthèse classiques employés dans les synthétiseurs d'ADN, en routine, profitant ainsi des excellents rendements de couplages chimiques. De plus, chaque nouveau cycle de synthèse photochimique (ajout d'une nouvelle base) implique une insolation prolongée de la surface de la puce, en général dans le proche UV, ce qui est propice à la dégradation des nucléotides déjà couplés à la surface.

Pour la réalisation des systèmes de microfluidique, la conception des masques a été réalisée avec les logiciels LEDIT et LASI. Dans notre étude, les essais ont été effectués avec des masques de mêmes caractéristiques que ceux de la photochimie du troisième niveau (4096 plots / 4 cm^2 : fentes ouvertes parallèles de 312,5 μm de largeur, séparées de 937,5 μm) pour les parties centrales du système. L'alimentation en réactifs implique l'ajout de bandes latérales d'alimentation ainsi qu'une connexion à la fluidique d'un synthétiseur. Cette connexion a nécessité, pour la simplification du montage, de percer, de part en part, la structure en silicium. Ceci nous a amenés à utiliser une technologie de lithographie et d'attaques chimiques double face.

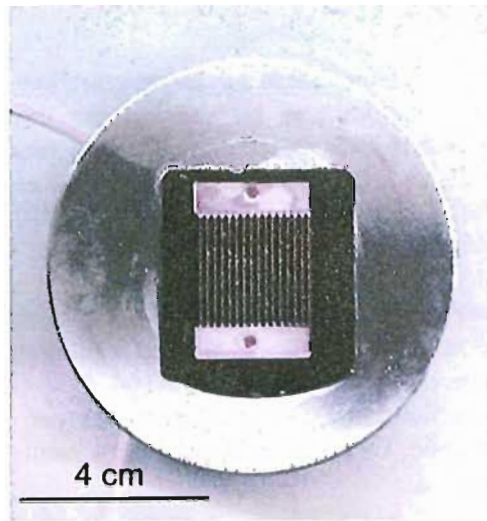


Figure 5-1 : Surstructure microfluidique en silicium, usiné KOH, monté par collage sur acier inox. La connexion au synthétiseur d'ADN est réalisée en face arrière du montage par des embouts Luer de ¼ de pouce.

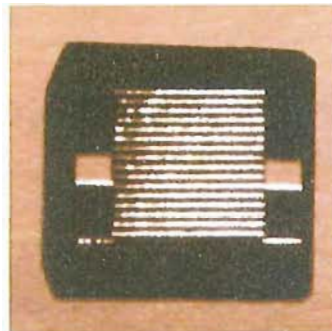


Figure 5-2 : Surstructure microfluidique en silicium, usiné éthylènediamine, pyrocatechol, pyrazine à 115°C, ce qui constitue une alternative à l'attaque par KOH concentrée.

Les premiers essais de microfluidique ont été réalisés sans montage, à la main, sur des transparents pour imprimante à jet d'encre, en injectant de la fluorescéine avec une seringue, ceci afin de démontrer l'intérêt du montage de microfluidique.

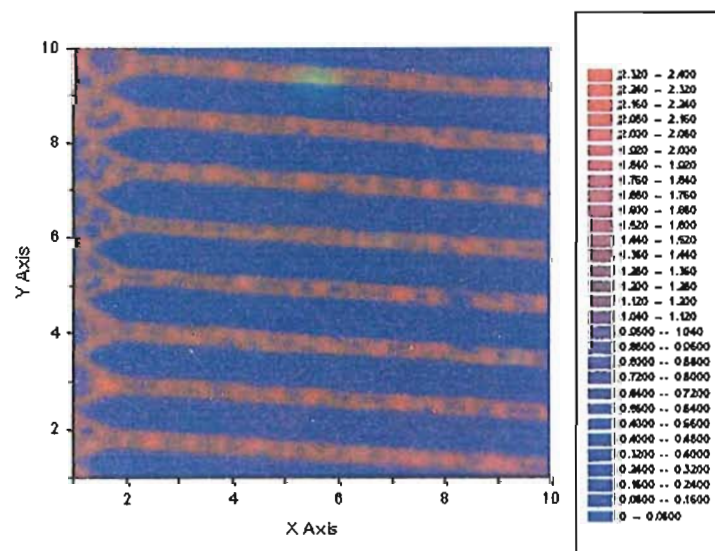


Figure 5-3 : Cartographie de fluorescence d'un transparent jet d'encre après circulation de fluorescéine.

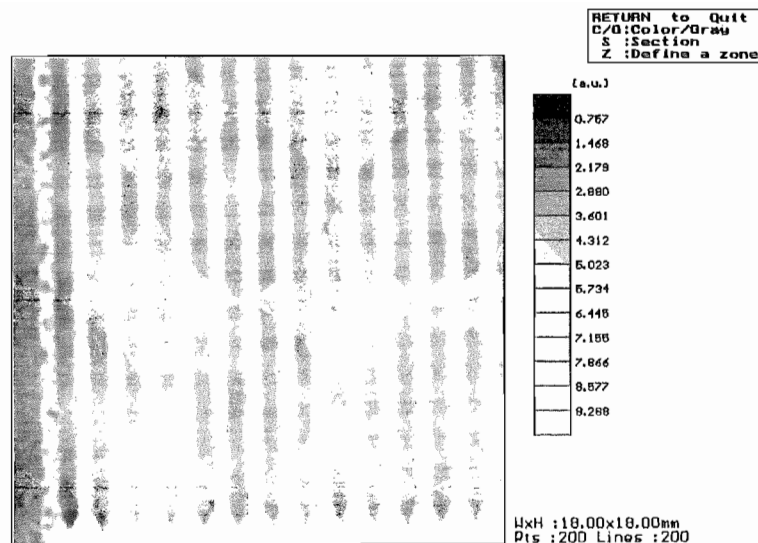


Figure 5-4 : Cartographie de fluorescence d'un transparent jet d'encre après circulation de fluorescéine croisée à 90° par une circulation de bleu de bromothymol.

Sur l'image de la figure 5-4 on peut remarquer que le dernier canal à gauche présente une intensité de fluorescence inférieure aux autres, ce qui dénote une hétérogénéité interne de fluide. Une partie de ce problème serait certainement résolue par l'utilisation de plusieurs alimentations, au lieu d'une seule, centrale. Ceci répartirait les fluides de façon plus homogène dans le système.

Les premiers essais sur verre ou silicium ont posé le problème de l'étanchéité, auquel la pression de contact ainsi que la planéité des échantillons auraient pu pallier. Nous avons résolu ce problème en modifiant la surface de la surstructure de silicium par silanisation à l'OTS. Cette couche organique est hydrophobe donc peu « mouillable ». Elle permet de s'affranchir de tout risque de fuite et d'obtenir une délimitation parfaite des zones sur lesquelles est effectuée la synthèse, sans une pression de serrage excessive.

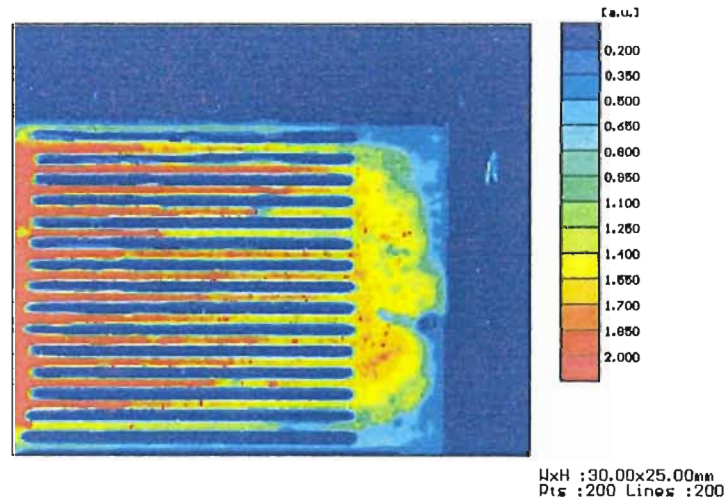


Figure 5-5 : Cartographie de fluorescence d'un échantillon Si/SiO₂ après silanisation Ester, activation, greffage POE-NH₂ puis synthèse par micro-fluidique de L185, déblocage NH₄OH 2 heures, hybridation U185 à 47°C et lavage SSC 2X. Les protocoles de synthèses classiques sur colonnes, du synthétiseur Expedite, ont été adaptés au surcroît de volumes actifs et de volumes morts de nos dispositifs d'adressage (voir annexe 8). Nous pouvons observer sur cette image une intensité de fluorescence supérieure du côté de l'entrée du système (à gauche) à celle de la sortie (à droite). La correction des volumes dans ce protocole a été insuffisante pour garantir l'homogénéité de synthèse dans le système. Nous pouvons également remarquer la plus faible réponse des canaux les plus externes. Ceci est dû au problème de fluïdique que nous avons déjà observé avec les transparents.

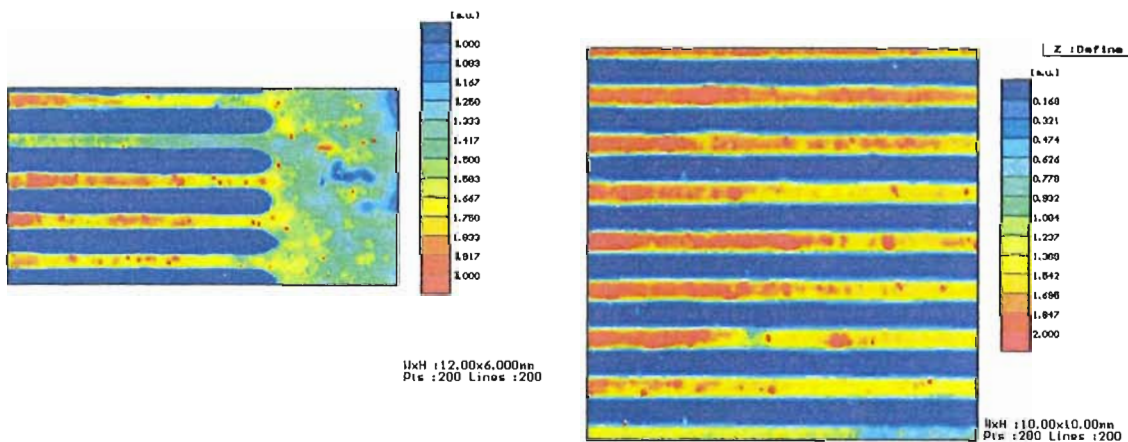
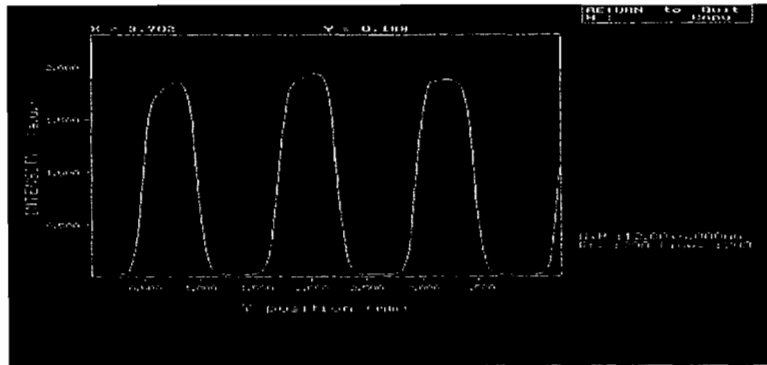


Fig 5-6 : Agrandissement à haute résolution d'un bord et du centre de l'échantillon.

Les bandes de synthèse ne devraient représenter que le tiers de la largeur des bandes non synthétisées. Or, comme nous le montre la coupe ci-dessous, les bandes synthétisées sont plus larges. Ceci est dû au fait que nous sommes partis des masques de lithographie adaptés à la synthèse photochimique. Leurs dimensions ne prennent pas en compte les phénomènes de sous-gravure et de sélectivité des attaques chimiques nécessaires à la réalisation des systèmes de microfluidiques.



L'utilisation de la gravure sèche pourrait être propice à l'amélioration des dispositifs présentés, par maîtrise de la sous-gravure, possibilité d'adaptation de la profondeur des canaux, définition des profils d'attaque en U...

En effet, comme le montrent les images des figures (5-7 et 5-8), les attaques chimiques à la potasse concentrée posent le problème des intersections perpendiculaires (figure 5-8), et celui de l'hétérogénéité liée à des défauts d'attaque (figure 5-7).

Les expériences effectuées démontrent la faisabilité de l'adressage, par fluide, des réactions de synthèse d'ADN, ainsi que le bon fonctionnement du démonstrateur réalisé dans notre étude. Cette technique d'adressage peut également être complémentaire d'autres. Elle permettrait, par exemple, d'introduire localement des mismatches sur une puce en cours de synthèse.

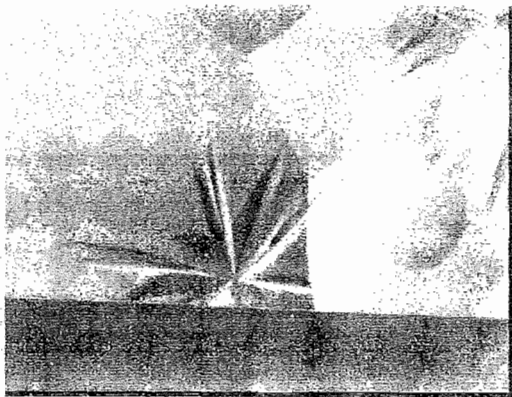
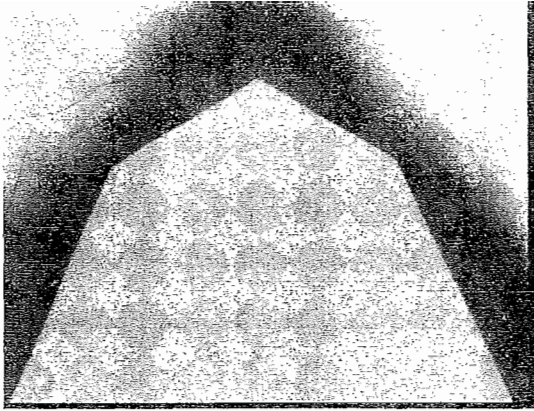
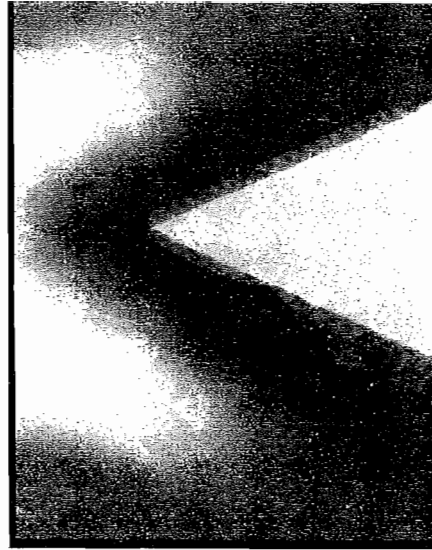


Figure 5-7 : Images du fond de gravure KOH avec un objectif X20, filtre polarisant et filtre interférentiel Normasky.



A)



B)



C)

Figure 5-8 : Image de gravure KOH d'une intersection perpendiculaire, A) en cours d'attaque obj X 10, B) en fin d'attaque obj X 10, C) en fin d'attaque obj X 40.

6 OPTIMISATION DES STRUCTURES POUR LA LECTURE PAR FLUORESCENCE

Une modélisation de l'intensité de fluorescence émise par des fluorophores placés au voisinage d'une surface réfléchissante a été réalisée par M. Garrigues. Cette intensité est une fonction de l'amplitude du champ électromagnétique exciteur perçu par les fluorophores, ainsi que de la combinaison des ondes émises par ces fluorophores, dans l'axe de détection, ondes directes et ondes réfléchies interférant (Kain 1999). A la proximité d'une surface réfléchissante, le champ électromagnétique perçu par le fluorophore, lors d'une illumination normale à la surface, est la somme algébrique des champs incident et réfléchi. Il s'agit d'un phénomène d'interférence. Lors d'une réflexion, la direction du champ électromagnétique est inversée. C'est pourquoi on observe la répartition suivante (voir Fig (6-1)):

- à la surface du miroir, le champ est presque nul (les champs incident et réfléchi s'annulent).
- pour une distance à la surface du miroir équivalente à $e = \lambda_{\text{excitation}}/4$, le champ est maximum (les champs incident et réfléchi s'additionnent).
- pour un système de détection d'axe normal à la surface réfléchissante et pour une distance du fluorophore à la surface du miroir équivalente à $e = \lambda_{\text{émission}}/4$, le champ émis dans l'axe de détection est maximum.

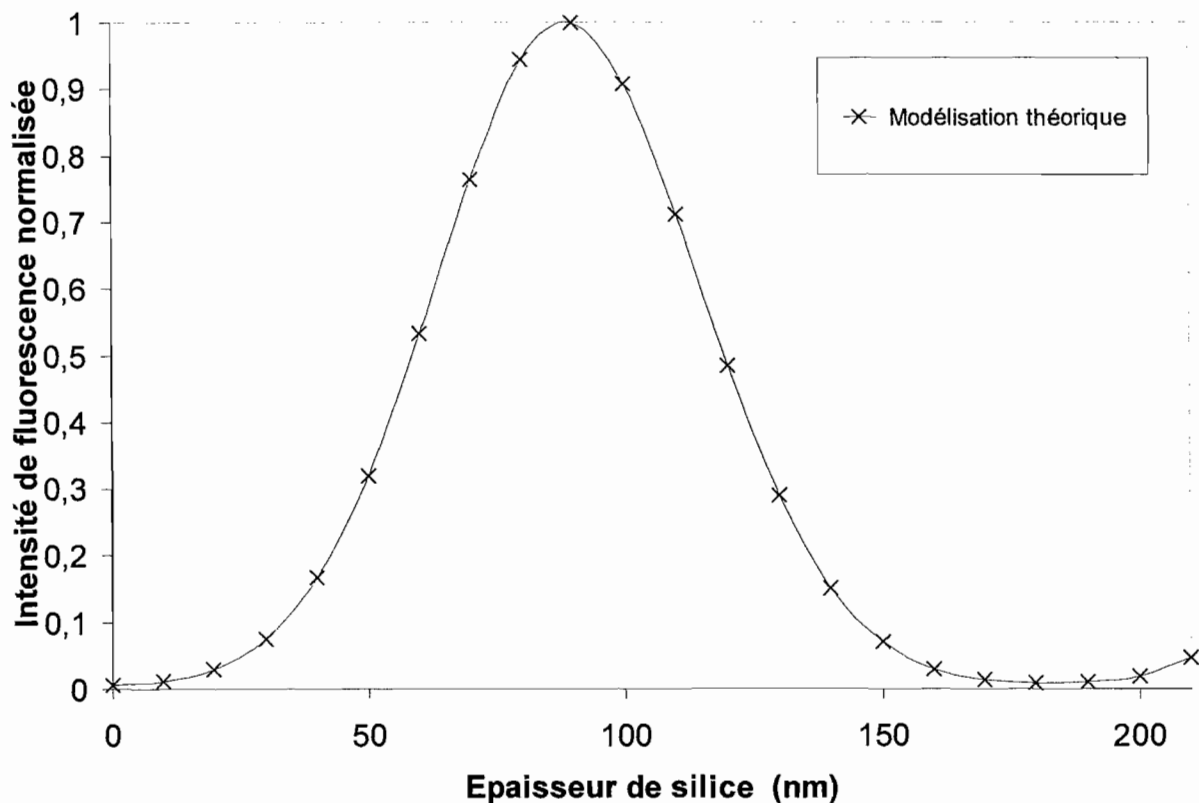


Figure 6-1 : Modélisation théorique de l'intensité de fluorescence émise par le CY3 à 570 nm en fonction de l'épaisseur de la couche de silice recouvrant le silicium, pour une excitation monochromatique à 515 nm, selon M. Garrigues.

Cette modélisation théorique a été vérifiée expérimentalement au laboratoire sur des supports en silicium, pourvus de silice thermique transparente aux longueurs d'ondes étudiées. L'épaisseur de la couche de silice permet d'éloigner les fluorophores de la surface du silicium qui constitue un miroir. Des supports fabriqués par attaques au HF tamponné (BOE) de la couche de silice, afin d'en maîtriser

l'épaisseur, ont été fonctionnalisés au CDSUM, greffés H₂N-POE, synthétisés sur l'ensemble de leur surface (L185) puis hybridés avec des brins complémentaires (U185-CY3), porteurs d'un groupement fluorophore. Ces travaux seront présentés par M. Bras en 2001 (Thèse ECL).

Ce type de modèle est également applicable au silicium poreux. L'interface silicium massif / silicium poreux constitue un miroir. Le chemin optique parcouru dans la couche poreuse permet d'éloigner les fluorophores de l'interface réfléchissante.

L'optimisation de l'épaisseur de la couche de silice pour nos mesures de fluorescence avec le CY3 correspond à des longueurs d'onde de 550 nm (entre 515 et 570 nm). Avec $e = \lambda/(4*n)$, l'épaisseur doit être comprise entre 80 et 90 nm. On peut également prendre en compte l'épaisseur de la couche de fonctionnalisation (épaisseur (silane + H₂N-POE) \approx 5 nm). Un exemple d'application de cette optimisation a été étudié au chapitre IV.4.2.1

Pour la suite de nos travaux, les études de fluorescence sur support plan Si/SiO₂ ont été effectuées sur des substrats Si/SiO₂ pourvus d'une couche d'oxyde thermique de 80 nm.

7 ETUDE DE LA FAISABILITE DE L'ADRESSAGE PAR JET

L'adressage des réactifs de synthèse d'ADN ou de brins présynthétisés munis d'un amino-espaceur, ou d'autres bio-molécules ([5]), peut être réalisé par projection par jets (Blanchard 1996). Les deux principaux systèmes, utilisés dans différents types de machines (synthétiseur d'ADN, imprimante à jet d'encre...), pouvant délivrer de petites quantités de solutions sont :

Les systèmes pressurisés, équipés de microvannes à commutation rapide.

Les systèmes piézo-électriques donnent une impulsion à la solution contenue dans une chambre d'éjection munie d'une ouverture calibrée (Goldmann 2000).

Les manipulations préliminaires à la réalisation d'une machine de projection automatisée, nous ont amenés à tester la stabilité de systèmes commerciaux d'impression aux réactifs et solvants de synthèse d'ADN. L'adressage des phosphoramidites par jets étant la base de notre étude nous avons testé et validé la compatibilité chimique des systèmes d'impression avec l'acétonitrile. Ce solvant est chimiquement très agressif, particulièrement mouillant et très volatil. Le système commercial de projection utilisé provient d'une imprimante Epson stylus color II dont la résolution annoncée est de 720 dpi.

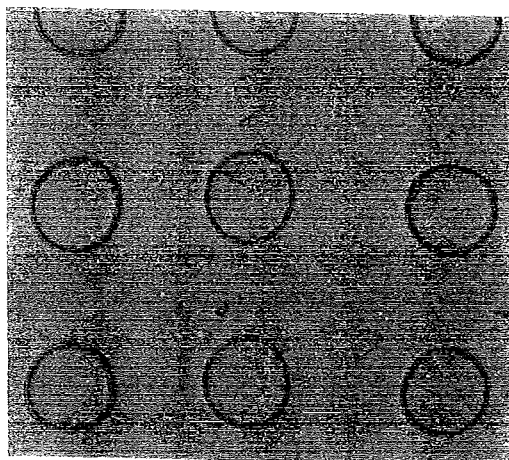


Figure 7-1 : Image d'un réseau réalisé sur une structure Si/SiO₂ avec de la fluorescéine en solution, diluée dans l'acétonitrile. La taille des plots est de 80 μ m avec un pas de 200 μ m.

La figure 7-1 montre un réseau obtenu par projection d'acétonitrile. La forme des plots est circulaire mais la répartition de la fluorescéine, après séchage des gouttes (très rapide), fait apparaître le contour des plots comme la zone la plus concentrée en fluorescéine au détriment du centre des plots. Cet effet se rencontre également lors de l'évaporation de gouttes déposées par un spotter et est appelé effet « donuts » du nom des petites pâtisseries américaines en forme de couronnes.

Après l'adaptation de la tête d'impression dans une enceinte saturée en acétonitrile, nous avons projeté une goutte et une seule, à la demande, sur une lame de microscope fonctionnalisée à l'OTS. Dans ce milieu la goutte de faible volume ne s'évapore pas avant des temps supérieurs à 3 minutes, ce qui valide l'utilisation de l'adressage par jets pour la synthèse d'ADN. L'image de la figure 7-2 nous montre la trace de la goutte qui délimite un plot de 40 μm de diamètre.



Figure 7-2 : Image d'une goutte d'acétonitrile de 40 μm de diamètre après séchage sur une surface fonctionnalisée à l'OTS.

CHAPITRE III

MISE AU POINT DES PROTOCOLES DE CHIMIE DE SURFACE

1 LE PRETRAITEMENT DES SUBSTRATS

La fonctionnalisation du substrat nécessite une étape de prétraitement destinée, d'une part, à le rendre propre, en éliminant toute molécule qui souillait la surface (graisses, molécules adsorbées), et, d'autre part, à favoriser la formation de groupements silanols superficiels, permettant la création de liaisons siloxanes avec l'agent de couplage. Ce prétraitement, assez agressif du point de vue chimique, ne doit pas altérer les qualités optiques et géométriques de la surface ; en particulier, sa rugosité ne doit pas être augmentée de façon non contrôlée.

Il faut, dans un premier temps, préparer les substrats du type SiO_2 , afin d'en optimiser la réactivité et d'obtenir des conditions de greffage répétables.

La contamination, par adsorption des substrats, engendre la présence de couches interfaciales de faible cohésion, nuisibles à la réactivité de la surface.

Nous avons testé plusieurs mélanges d'acides minéraux, additionnés d'oxydants, qui pourvoient aux impératifs fixés dans cette étape de préparation. L'incidence des traitements a été suivie par mesure de l'angle de contact de l'eau sur le substrat, par la méthode de la goutte posée.

La préparation de ce type de mélange, comme de tout mélange acido-basique, entraîne des réactions de caractère exothermique marqué. Il convient donc d'observer la règle de l'ajout de la solution la plus dense à la solution la moins dense, pour éviter les projections et assurer une bonne diffusion des réactifs.

a. Mélange sulfochromique

C'est un mélange saturé de dichromate de potassium (ou de sodium) (15 g) mouillé par de l'eau distillée (5 ml) et dissous partiellement dans l'acide sulfurique concentré à 96% (90 ml). La mise en équilibre du mélange est effectuée par agitation puissante. Elle est facilitée par l'exothermicité du mélange eau-acide sulfurique.

b. Solution piranha

C'est un mélange de peroxyde d'hydrogène (35% en poids) (1/4 v/v) et d'acide sulfurique concentré (96%) (3/4 v/v). Ce mélange est à effectuer avec précaution car son exothermicité est très marquée et il engendre un fort dégagement gazeux (effervescence). Cette solution paraît plus active pour éliminer la contamination superficielle du verre (effervescence et présence d'oxygène naissant, voire d'ozone).

Les types de substrats testés sont :

- le verre de lamelle de microscope brut (amilabo), sur lequel l'angle de mouillage de l'eau est d'environ 48° .
- la silice thermique brute sur laquelle l'angle de mouillage de l'eau est d'environ 54° .

Le tableau suivant (voir figure 1-1) donne les résultats des angles de mouillage obtenus après traitement et rinçage abondant à l'eau distillée.

Traitements	Supports	Angles (°)
Sulfochromique à T° ambiante 10 minutes	sur verre	$\theta(\text{H}_2\text{O})= 10^\circ$
	sur silice thermique	$\theta(\text{H}_2\text{O})= 38^\circ$
Sulfochromique aux ultrasons 10 minutes	sur verre	$\theta(\text{H}_2\text{O})= 5,2^\circ$
	sur silice thermique	$\theta(\text{H}_2\text{O})= 34^\circ$
Sulfochromique à chaud (60-70°)10 minutes	sur verre	$\theta(\text{H}_2\text{O})= 4,7^\circ$
	sur silice thermique	$\theta(\text{H}_2\text{O})= 25^\circ$
Piranha fraîche 10 minutes	sur verre	$\theta(\text{H}_2\text{O})= 5.9^\circ$
	sur silice thermique	$\theta(\text{H}_2\text{O})= 26^\circ$

Figure 1-1 Suivi des prétraitements par mouillage.

Pour conclure, nous avons suivi les effets des traitements sur de la silice thermique, car les variations d'angle de contact avec l'eau sont plus marquées que sur le verre, où elles sont proches de la limite de résolution de l'appareillage (+/- 1°).

Plus l'angle de mouillage $\theta(\text{H}_2\text{O})$ est faible, plus le caractère hydrophile de la surface est grand, plus la surface est réactive vis-à-vis de la silanisation. C'est pourquoi, à partir des résultats du tableau 1-1, nous pouvons adopter le traitement sulfochromique à chaud ou la solution piranha. Dans la suite de ce travail, nous avons opté pour la solution piranha pour deux raisons :

- La solution piranha ne nécessite pas la mise en œuvre de plaques chauffantes
- La solution piranha ne contient ni Chrome ni Potassium, elle n'est constituée que de Soufre, d'Oxygène et d'Hydrogène. Il faut néanmoins savoir que les vapeurs d'acide sulfurique sont cancérogènes.

De plus, dans un éventuel développement industriel, l'utilisation du mélange sulfochromique est banni pour des raisons liées à l'environnement.

Le protocole que nous avons, par la suite, systématiquement utilisé est défini comme suit :

1. Installation des substrats dans l'eau oxygénée.
2. Ajout de l'acide sulfurique. Attente de 10 minutes au minimum.
3. Rinçage abondant des substrats avec de l'eau ultra pure.

C'est ce protocole que nous appellerons, par la suite, « traitement piranha ».

Les caractéristiques topographiques d'un substrat Si/SiO₂ ayant subi un traitement piranha sont données dans les figures 1-2 et 1-3.



D:\SPM DATA\FRANCO~1\1007001c.hdf

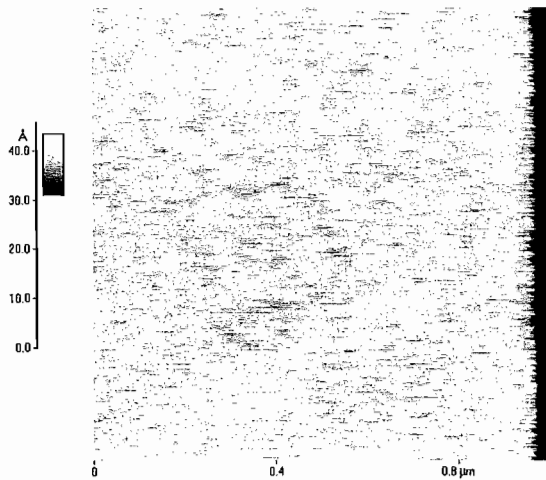
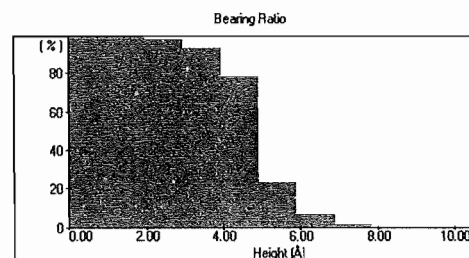
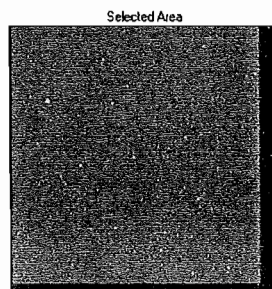
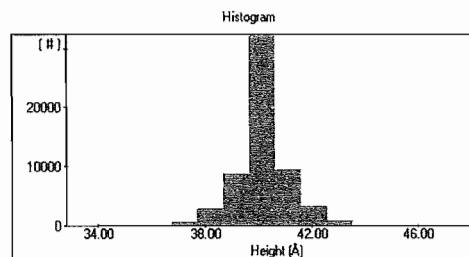
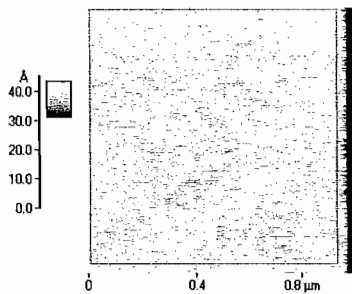


Image de 1 μm de côté d'une silice thermique (150Å d'épaisseur) après un prétraitement de 10 minutes à la solution piranha

Region Analysis

D:\SPM DATA\FRANCO~1\1007001c.hdf



Region	Rp-v	Rms rough	Ave rough	Median Ht	Mean Ht	Surface area	Volume	Pij area
[A.]	10.6 Å	0.99 Å	0.62 Å	40.6 Å	40.2 Å	0.837 μ^2	0.00350 μ^3	0.837 μ^2

Figure 1-2 Caractérisation AFM d'un substrat Si/SiO₂ après traitement piranha.

L'analyse de surface de la figure 1-2 révèle une RMS de 1Å, en ne tenant pas compte de l'artefact enregistré sur la partie droite de l'image (balayage effectué de droite à gauche). Cet artefact est dû à une grande affinité entre la pointe et le substrat très hydrophile.



D:\SPMDATA\FRANCO~1\1007001a.hdf

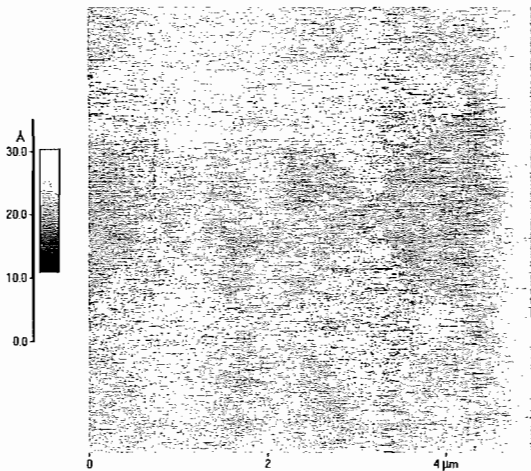
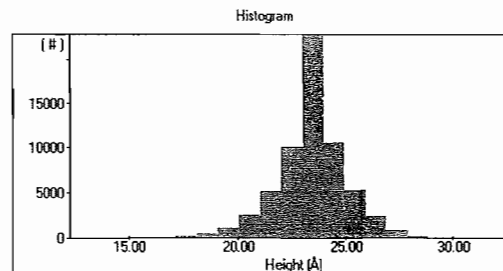
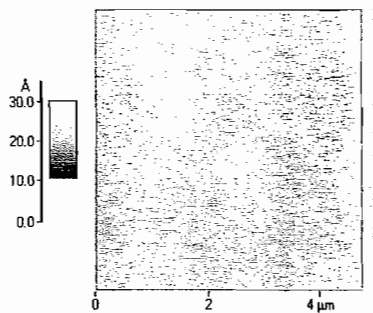


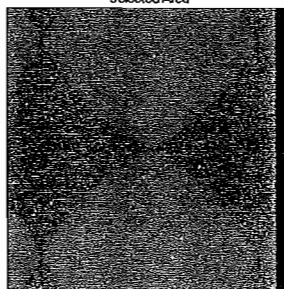
Image de 5 μm de côté d'une silice thermique (150Å d'épaisseur) après un prétraitement de 10 minutes à la solution piranha.

Region Analysis

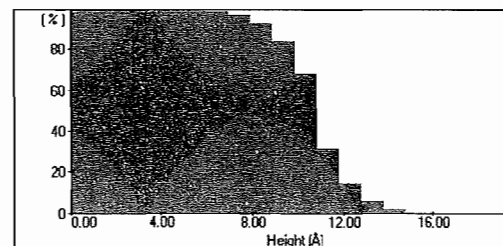
D:\SPMDATA\FRANCO~1\1007001a.hdf



Selected Area



Bearing Ratio



Region	Rp-v	Rms rough	Ave rough	Median Ht	Mean Ht	Surface area	Volume	Pij area
[A.]	19.6 Å	1.59 Å	1.11 Å	24.0 Å	23.5 Å	23.7 μ²	0.0567 μ³	23.7 μ²

Figure 1-3 Caractérisation AFM d'un substrat Si/SiO₂ après traitement piranha.

L'analyse de surface de la figure 1-3 révèle une RMS de 1,6Å, en ne tenant pas compte de l'artefact enregistré sur la partie droite de l'image (balayage effectué de droite à gauche).

Ces caractérisations topographiques montrent la planéité et l'homogénéité des substrats traités. Les défauts observés n'excèdent pas dix angströms. Le traitement ne semble donc pas avoir altéré, de façon importante, la qualité morphologique du substrat.

2 FONCTIONNALISATION DE SUBSTRATS Si/SiO₂.

La fonctionnalisation de la surface consiste à déposer, à la surface du support, une couche, qui permet ultérieurement de fixer des molécules fonctionnelles ayant des propriétés spécifiques, optiques, mécaniques, chimiques et/ou biologiques. L'objectif de la fonctionnalisation est de lier fortement les molécules actives au support pour donner à la structure la fonctionnalité optimale, avec les critères de stabilité et de reproductibilité les meilleurs (Plueddemann 1991, Sagiv 1980, Tillman 1988, Wasserman [1]&[2] 1989).

Les molécules utilisées pour assurer la fonctionnalisation, appelées agents de couplage, comportent deux groupements fonctionnels distincts, liés par un enchaînement organique, le plus souvent, une chaîne aliphatique. L'un des groupements est destiné à lier l'agent de couplage sur le support, l'autre à fixer la molécule active. Cependant, la chaîne hydrocarbonée peut, le plus souvent, jouer un rôle actif dans l'organisation de la couche de fonctionnalisation, par des interactions entre chaînes de type Van Der Waals ou par des liaisons hydrogène entre chaînes ou avec la solution en contact, lors de l'utilisation de la puce (hybridation, lavage).

Ainsi, pour la fonctionnalisation de la silice et du verre, les principaux agents de couplage utilisés sont les organosilanes. Ils forment des liaisons siloxanes, covalentes et relativement stables avec les groupements silanols de la surface du substrat. Ce sont des molécules organofonctionnelles de formule générale : R_m-Si(X)_n où n=4-m et X est un groupement hydrolysable ou substituable (alcoxy, chloro, diméthylamino) et R une chaîne organique sélectionnée pour sa réactivité.

La réactivité de la chaîne dépend de ses fonctions chimiques, de sa conformation, et de la structure globale du dépôt.

Les mécanismes de silanisation relèvent de beaucoup de paramètres :

- l'état de surface initial : les prétraitements
- le type de silane (longueur de chaîne, fonctions)
- les conditions opératoires (solvants, anhydricité, pH, température, catalyse...)
- le rinçage (désorption)
- le recuit (réticulation / chimisorption)

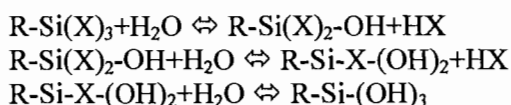
Dans ce travail, nous avons étudié la silanisation en milieux aqueux, hydro-alcooliques, et dans les solvants organiques non anhydres. Les silanes que nous avons utilisés sont des molécules synthétisées du commerce, ce qui a restreint notre choix. L'emploi de molécules synthétisées à façon, permettrait d'optimiser les travaux (choix des fonctions hydrolysables, de la longueur de chaîne et de la fonction terminale).

2.1 La silanisation en milieu non anhydre

La silanisation en milieu non anhydre a été étudiée par de nombreux chercheurs (Osterholtz 1992, Schmidt 1984, El Aarch thèse 1996) qui ont tenté de modéliser les mécanismes dans les différentes conditions expérimentales. Nous résumons, ci-dessous, les principaux résultats dont nous sommes servis pour l'élaboration de nos protocoles.

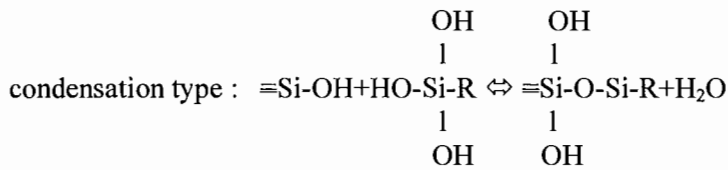
La silanisation en milieu non anhydre, pour des silanes possédant des chaînes (R) d'une longueur inférieure à huit méthylènes, admet un mécanisme en deux étapes :

- Une première étape d'équilibres d'hydrolyses des groupements X en groupements silanols :



- Une deuxième étape complexe d'équilibres de condensations des silanols du silane entre eux ou avec les silanols de surface. Cette étape de chimisorption est précédée d'équilibres d'adsorption,

accompagnée de la création de liaisons hydrogène entre silanols et aboutit à la formation de ponts siloxane (Si-O-Si) :



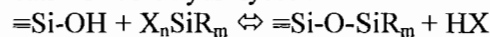
La condensation des silanes en solution provoque la formation d'oligomères. Eux aussi sont en compétition avec les monomères et les silanols de surface pour les réactions de condensation. La réactivité des sites comprenant des groupements silanols diminue d'un groupement tri-silanol à un groupement mono-silanol. Ceci signifie qu'il sera plus difficile de chimisorber des oligomères que des monomères ; d'où l'intérêt de limiter la formation des oligomères, en contrôlant les cinétiques de condensation, et d'éliminer les oligomères adsorbés au rinçage.

A la surface du substrat, on distingue différents types de condensations :

- la condensation verticale qui est la liaison du silane au substrat après formation de liaisons hydrogène
- la condensation horizontale qui résulte de la réticulation des silanes chimisorbés ou adsorbés entre eux ou avec d'autres silanes de la solution.

Lors de la silanisation, on admet, en général, que le film obtenu a une structure multicouche du type polymère.

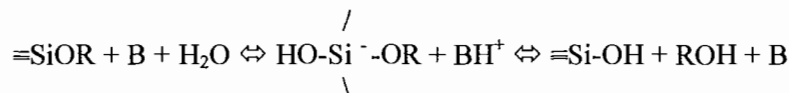
- Une réaction de condensation directe peut aussi entrer en compétition avec les condensations et les hydrolyses :



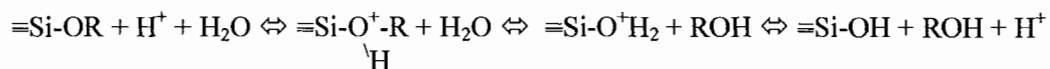
Toutes ces réactions entrent en compétition et donnent naissance à des structures condensées.

En solution aqueuse ou hydroalcoolique, le choix du pH de silanisation joue un rôle primordial, conditionnant les mécanismes et les cinétiques d'hydrolyse et de condensation des silanes :

- L'hydrolyse en milieu basique d'alcoxy-silanes est catalysée par l'aspect nucléophile des hydroxydes qui se substituent aux groupements alcoxy par des mécanismes du type sn^2 sur le silicium.



- L'hydrolyse en milieu acide d'alcoxy-silanes est favorisée par la protonation du groupement alcoxy. Puis il y a substitution du groupement alcoxy protoné par l'eau, libérant l'alcool correspondant. Enfin le proton entrant dans le cycle catalytique est libéré.



- L'hydrolyse des chlorosilanes est favorisée par un milieu basique réagissant sur l'acide chlorhydrique libéré par cette hydrolyse (exothermicité des réactions acide-base).
- L'hydrolyse des diméthylaminosilanes est favorisée par un milieu acide neutralisant la diméthylamine libérée par l'hydrolyse.
- Les réactions de condensations dépendent du pH et peuvent donc être catalysées en milieu acide ou basique. Pour accroître la couverture de la surface par des monomères au détriment des oligomères, il est préférable d'augmenter la durée de vie des silanols en solution, c'est-à-dire de favoriser une hydrolyse rapide et une condensation lente. D'après les études par RMN (El Aarch thèse 1996), les vitesses d'hydrolyse sont rapides, aussi bien en milieu acide que basique (/ neutre), mais un minimum de condensation est observé en milieu acide (entre pH 4 et 6, selon les silanes). La catalyse acide semble alors préférable.

- En milieu aqueux ou hydro-alcoolique, l'eau constituant tout ou partie du solvant, joue un triple rôle, à la fois solvant, réactif et produit de réaction des réactions d'hydrolyse et de condensation. Lors de l'hydrolyse d'alcoxysilanes, la solution s'enrichit en alcool. L'ajout d'alcool à la solution permet de solubiliser certains silanes, de diminuer la cinétique d'hydrolyse (loi de Le Chatelier), ainsi que la constante diélectrique du milieu, ce qui entraîne une augmentation des forces d'interaction entre les ions de la solution, cette modification de la solvation des ions (H^+ , OH^-) aura une influence certaine sur les cinétiques d'hydrolyse et de condensation ainsi que sur les mécanismes d'adsorption des silanes.

La cinétique des réactions d'hydrolyse est influencée par des facteurs d'ordre stérique pour les alcoxysilanes. La vitesse d'hydrolyse diminue lorsque la taille du groupement alcoxy augmente.

Dans le cas particulier des silanes monofonctionnels (une seule fonction hydrolysable portée par le silicium $n=1$), la présence de méthyles ou de chaînes alkyles portées par le silicium se caractérise par un effet inductif donneur des dérivés hydrocarbonés, augmentant la densité électronique autour du silicium (diminution de la cinétique d'hydrolyse liée à l'attaque nucléophile de l'oxygène de l'eau subie par le silicium). Le principal avantage des silanes monofonctionnels est de former des couches qui sont toujours des monocouches (édifice 2D). Leurs molécules constitutives ne peuvent que dimériser, elles ne polymériseront jamais.

C'est à partir de l'ensemble de ces considérations que nous avons défini les conditions expérimentales et les protocoles de silanisation.

2.2 Les couches auto-assemblées

D'autres paramètres influent sur les équilibres d'adsorption et la structure du dépôt, notamment la nature de la chaîne organofonctionnelle (R) du silane. En effet pour une longueur de chaîne (R) supérieure à huit motifs méthylène (ou CF_2), les silanes, comme les acides gras ou les dérivés soufrés (thiols et disulfides) ont tendance à former des couches auto-assemblées (SAM's), dont la structuration est assurée par des interactions du type Van Der Waals entre les chaînes. Ces interactions sont exothermiques ($\Delta G < 0$) et interviennent fortement dans la structuration du dépôt lors des phases d'adsorption. Ces dernières constatations ont permis la mise en œuvre de silanes ayant des caractères tensioactifs pour effectuer des silanisations du type SAM's.

Les couches mono-moléculaires auto-assemblées sont des assemblages moléculaires qui se forment spontanément par immersion d'un substrat approprié dans un solvant organique contenant des molécules de surfactant susceptibles d'interagir avec la surface du solide. Il existe plusieurs types de réactions possibles : le greffage d'organo-silanes, sur des surfaces hydroxylées, appelé aussi silanisation ; la chimisorption de composés soufrés tels que les thiols et les disulfures sur des surfaces métalliques, ou encore la chimisorption d'alcools et d'amines sur le platine, d'acides carboxyliques sur l'oxyde d'aluminium et d'argent (Atre 1995, Bain[1]&[2] 1989, Evans 1995, Silberzan 1991, Allara 1985, Collet, Thèse 1997, [7], [8]).

Les molécules de surfactant susceptibles de former des couches auto-assemblées présentent trois parties distinctes : la tête réactive, le corps de la molécule, la fonction terminale.

La première partie de la molécule est constituée d'une tête réactive qui va permettre de fixer la molécule sur le substrat. C'est le processus le plus exothermique de l'assemblage. Le résultat de la forte interaction entre la tête et le substrat est que la molécule semble s'attacher fortement sur un site spécifique ; cependant, du fait de l'exothermicité de l'interaction, les molécules vont chercher à occuper tous les sites disponibles à la surface du substrat, déplaçant, dans ce processus, les molécules qui pouvaient préalablement être adsorbées à la surface : c'est le phénomène de « self cleaning process ». Cette constatation implique une certaine mobilité des molécules à la surface du substrat, sinon l'assemblage obtenu ne pourrait pas être dense et ordonné.

La deuxième partie de la molécule est constituée par la chaîne hydrocarbonée. Lorsque des molécules sont suffisamment proches les unes des autres, suite au mécanisme précédent, les interactions de Van Der Waals entre les chaînes, environ cinq à dix fois plus faibles que le premier processus, peuvent intervenir. Si le corps de la molécule comporte des groupements polaires, les interactions électrostatiques peuvent jouer un rôle dominant. Ces interactions contribuent à la formation d'un assemblage dense et ordonné de molécules dans le film. La chimisorption et la mobilité des molécules sont des processus importants : en effet, ils permettent aux molécules de se placer à proximité les unes des autres, donc de ressentir des interactions de Van Der Waals qui sont à très courte portée.

La troisième partie de la molécule est sa fonction terminale. Ses groupes de surface sont désordonnés sous l'effet de la température ambiante. L'agitation thermique suffit à introduire un peu de désordre dans la conformation de la molécule au niveau du groupement terminal, toutefois on peut considérer que les films mono-moléculaires sont des assemblages denses et ordonnés, du moins sur une certaine distance de cohérence (encombrement stérique de la molécule à greffer / densité de sites surfaciques réactifs). La nature de la fonction terminale peut jouer un grand rôle sur la structuration du film, notamment si cette fonction est de type polaire.

La silanisation de substrats de silice par formation de films auto-assemblés se réalise généralement par l'emploi de solutions diluées (mM) de silanes ou de mélange de silanes. Outre les caractéristiques intrinsèques des silanes, décrites auparavant, les conditions opératoires ont une influence primordiale sur la silanisation. Ainsi de nombreuses études ont mis en évidence une température critique de silanisation, définie en fonction de chaque silane par rapport à l'énergie des interactions, inter chaînes, du type Van Der Waals, qui doit demeurer supérieure à l'énergie d'agitation thermique, pour qu'il y ait structuration de la couche : auto-assemblage (Brzoska [1]&[2] 1992&1994, Davidovits 1996).

La nature apolaire des solvants ou des mélanges de solvants utilisés (McGovern 1994), tend à favoriser les interactions polaires entre surface et silane en solution, et les interactions dispersives entre les chaînes du silane. L'utilisation des solvants de la série alcane est fréquente avec les alkyl silanes mais peut engendrer des problèmes d'insolubilité pour d'autres silanes fonctionnels. L'ajout de tétrachlorure de carbone, ou son utilisation comme solvant pur, permet de solubiliser la plupart des silanes organofonctionnels ; mais augmente la quantité d'eau présente en solution (par rapport aux alcanes purs) ce qui favorise l'hydrolyse des silanes et leur polymérisation en solution, au détriment d'une réaction avec la surface. L'utilisation de silanes mono-fonctionnels pallie au problème de la polymérisation en solution, qui ne se traduit que par une dimérisation conduisant à la formation d'un dimère non réactif (chimisorption) vis-à-vis de la surface. Il est établi que l'on observe deux phases de cinétiques distinctes lors de la formation d'une SAM's sur une surface :

- une première étape, très rapide, qui ne prend que quelques minutes, aboutissant à la couverture presque totale de la surface. Ainsi les angles de contact et les mesures d'épaisseur effectuées par ellipsométrie atteignent à cette étape 80 à 90% de leur valeur finale.
- une deuxième étape, lente, qui dure plusieurs heures, voit la couche formée initialement se compléter, se structurer, par le réarrangement des chaînes alkyles et l'achèvement du processus de self cleaning.

Il est à noter que la longueur des chaînes alkyles intervient dans la cinétique du processus d'adsorption. Ceci est dû aux interactions du type Van der Waals, qui augmentent avec la longueur de la chaîne. Le caractère exothermique de cette interaction favorise donc l'adsorption des silanes longue chaîne sur la silice (au détriment des courtes chaînes). Cet effet est accentué par la diminution de la solubilité des silanes avec l'allongement de leur chaîne carbonée.

Ces observations nous ont permis de définir la nature des silanes utilisés et les protocoles de silanisation.

La silanisation est précédée d'un traitement piranha.

Le milieu de silanisation, dont le pH a été fixé à 4,5 par ajout d'acide acétique, est composé de 2% volumique de GPTS.

La silanisation est effectuée durant 30 minutes, à température ambiante, dans un large excès de mélange réactionnel. Puis les échantillons sont recuits une heure à cent degrés et enfin débarrassés de toute trace de dépôt de silane non chimisorbé, par passage aux ultrasons, pendant dix minutes, dans l'éthanol. Ils sont finalement rincés à l'eau et séchés sous flux d'azote.

Ces conditions de silanisation permettent d'avoir une hydrolyse rapide du groupement méthoxy, tandis que les vitesses de condensation sont minimisées (voir D.2).

Caractéristiques des couches obtenues par mouillage :

Les angles de contact obtenus sur ces échantillons avec l'eau et le diiodométhane sont :

$$\left(\begin{array}{l} \Theta_{(H_2O)} = 61^\circ \\ \Theta_{(CH_2I_2)} = 43^\circ \end{array} \right.$$

Owens_Wendt : $\gamma_d = 31 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma_p = 16 \text{ mJ/m}^2$

On réalise le même type d'échantillon, et le même mélange réactionnel (eau et acide acétique pH 4,5), mais sans ajout de silane, pour obtenir une référence.

(Réf : $\Theta_{(H_2O)} = 52,6^\circ$ $\Theta_{(CH_2I_2)} = 49^\circ$; Owens_Wendt : $\gamma_d = 26 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma_p = 23 \text{ mJ/m}^2$)

Caractéristiques des couches obtenues par microscopie à force atomique (AFM) :

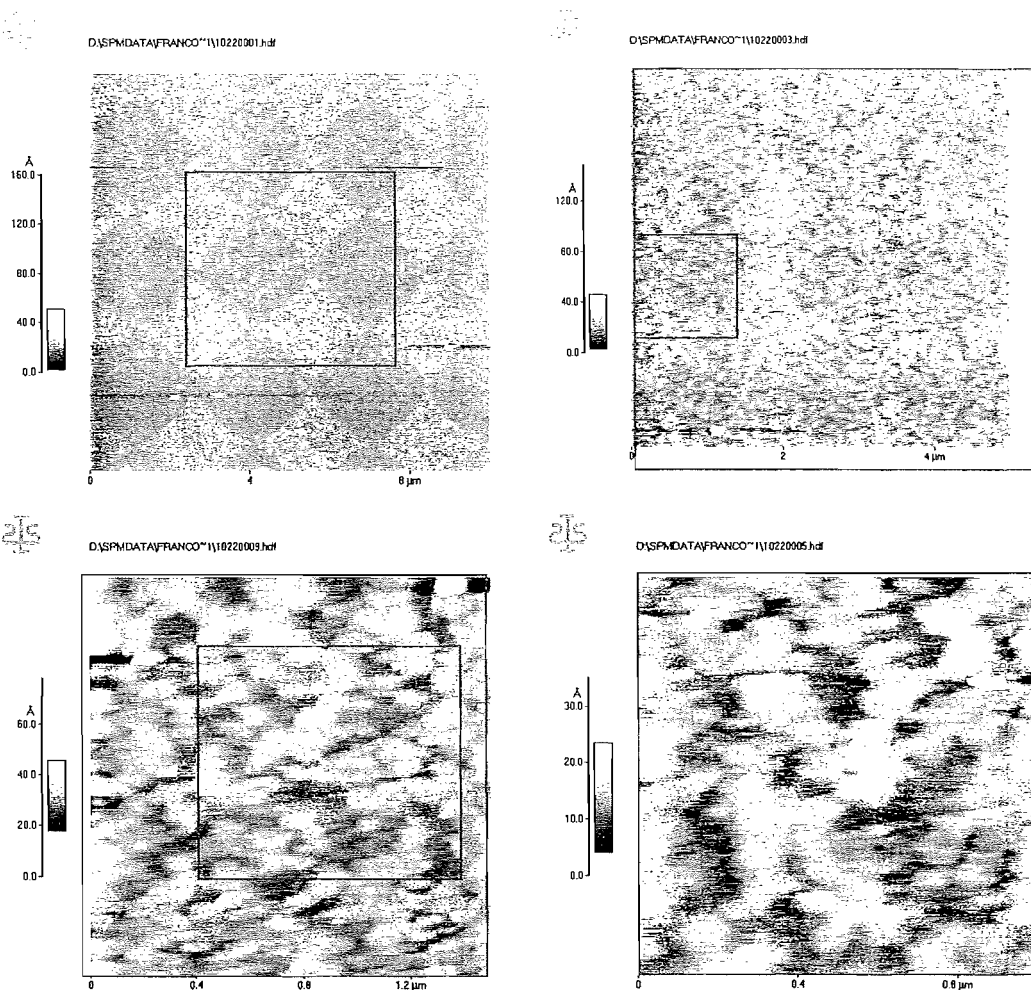


Figure 3-1 : Images de 10, 5, 1.5 et 1 μm de côté d'une silice thermique silanisée avec du GPTS en milieu aqueux après recuit et lavage.

Les images de la figure 3-1 révèlent que la surface des échantillons est couverte d'îlots de formes diverses, de 50 à 500 nm de côté, et d'une hauteur de 1,5 à 3 nm.

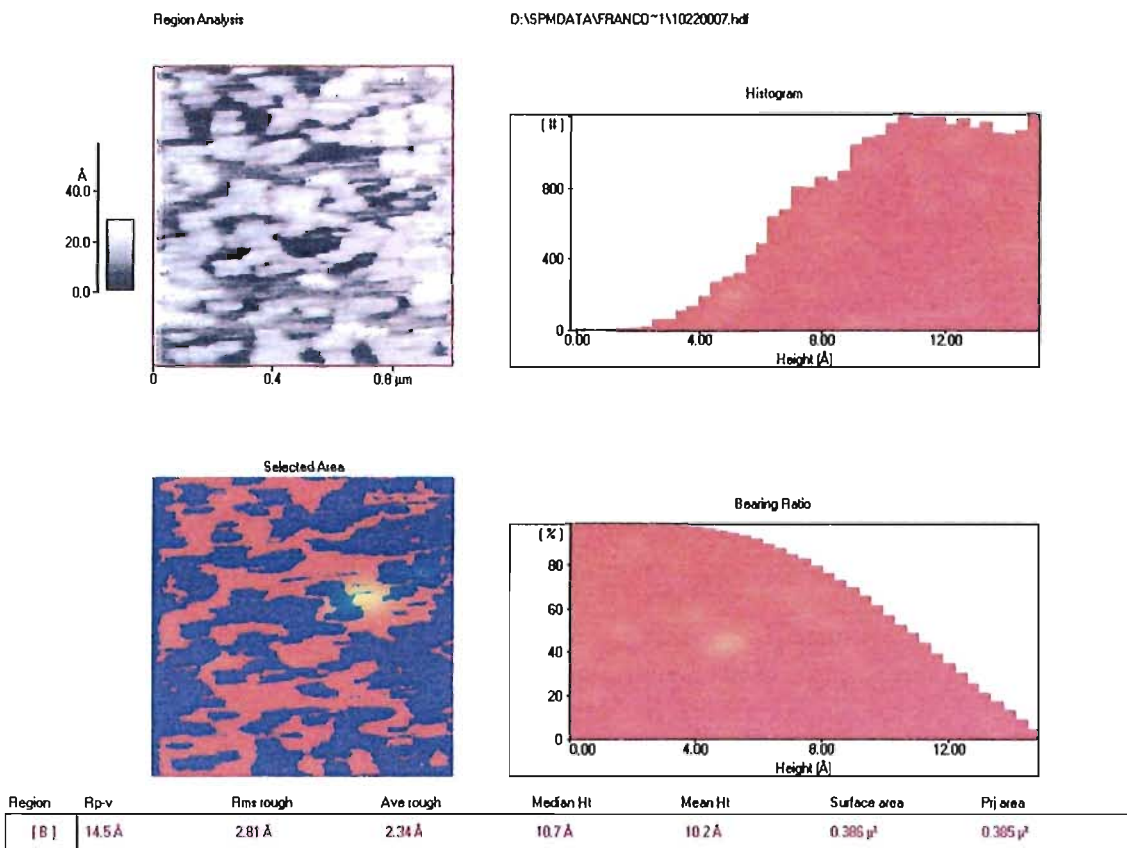
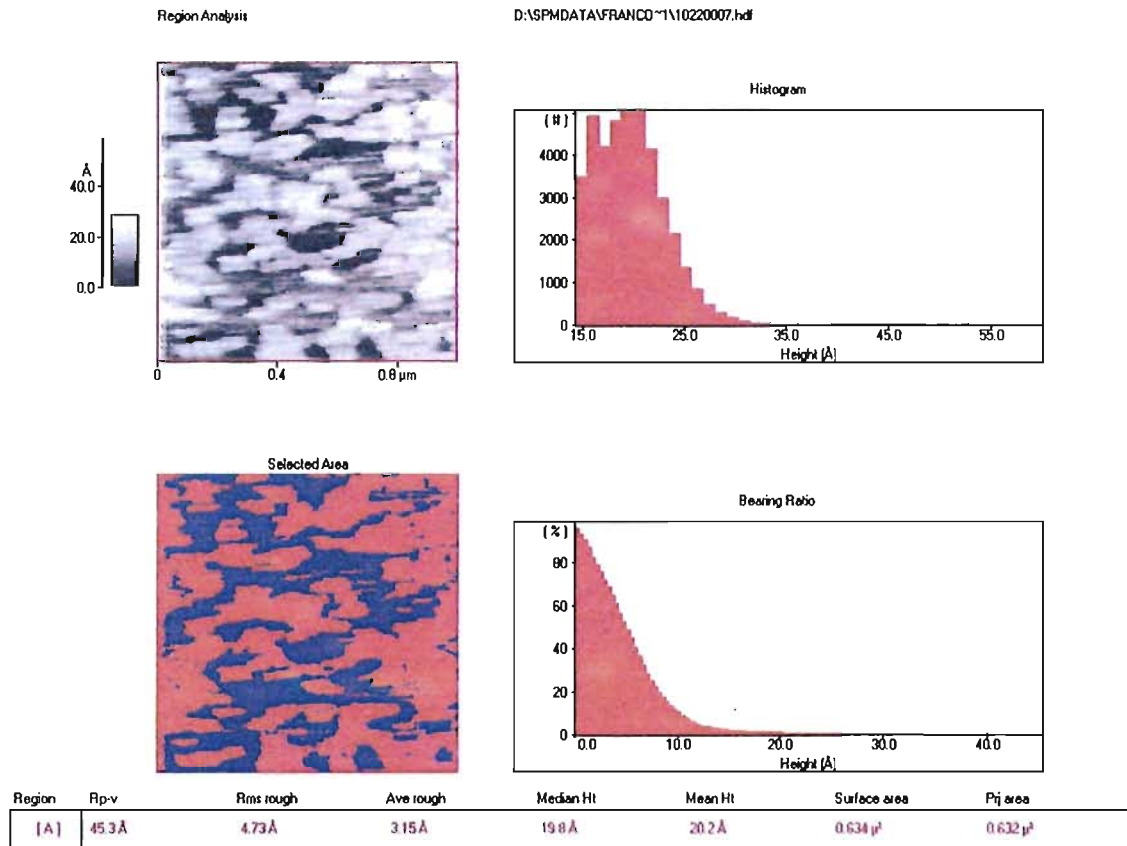


Figure 3-2 : Image de 1 μm de côté et analyse de surface d'une silice thermique silanisée avec du GPTS en milieu aqueux, après recuit et lavage.

L'analyse de surface (Figure 3-2) dispose d'une fonction permettant de sélectionner les surfaces selon leur hauteur. Lors de la première analyse, seules les surfaces sommitales sont considérées ($h > 15\text{\AA}$, hauteur moyenne de $19,8\text{\AA}$). Elles représentent entre 60 et 65% de la surface totale et ont une RMS de $4,75\text{\AA}$.

Dans la deuxième analyse, seules les parties de la surface d'une hauteur inférieure à 15\AA (hauteur moyenne de $10,7\text{\AA}$) sont prises en compte, elles représentent 35 à 40% de la surface totale et ont une RMS de $2,8\text{\AA}$. La RMS de l'échantillon sur l'image de $1\text{ }\mu\text{m}$ est de $5,6\text{\AA}$.

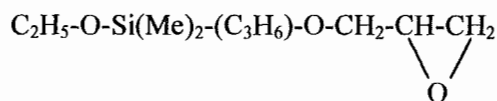
Ces surfaces silanisées au GPTS nous ont permis d'étudier en parallèle la synthèse et l'immobilisation d'oligonucléotides sur les supports solides. Le principal problème que nous avons rencontré avec le GPTS a été le manque de robustesse des liaisons siloxanes dans les couches de silane. Les couches semblaient évoluer lors des traitements chimiques, comme lors de la déprotection à l'ammoniaque en fin de synthèse, ou lors de mesures d'impédances électrochimiques dans le tampon d'analyse (Tris), lorsque l'échantillon était soumis à des polarisations. Ces hypothèses sur la dégradation des couches de GPTS pendant leur utilisation pour la synthèse d'ADN, ont été confirmées en 1999 par Southern et al. lors de mesures d'ellipsométrie (Gray 1997).

Les inconvénients de cette méthode de silanisation sont le manque de reproductibilité et la difficulté à réutiliser les surfaces préparées. La validation des mesures nécessitant l'emploi de différentes méthodes analytiques sur le même échantillon, nous avons donc procédé à la fabrication de lots de substrats identiques.

Nous nous sommes également orientés vers le choix de silanes monofonctionnels, de façon à obtenir des structures monocouches et non pas des couches polymères, a priori plus fragiles vis-à-vis des agressions chimiques. Pour ces raisons, nous avons opté, dans un premier temps, pour le glycidoxypropyldiméthyléthoxysilane (GPMS), qui a une chaîne fonctionnelle de même structure moléculaire que le GPTS, mais qui diffère par sa fonction d'accrochage sur le support.

4 LE GPMS (Glycidoxypropyldiméthyléthoxysilane).

Le GPMS est un silane mono-fonctionnel, dont la formule semi-développée est :



Il possède une extrémité réactive vis-à-vis de la silice (silanol), après l'hydrolyse de la fonction éthyloxy dans le milieu réactionnel, et une fonction époxyde (comme le GPTS), utilisable pour l'accrochage d'amino-espaces ou hydrolysable en diol pour la synthèse directe d'oligonucléotides.

Protocole opératoire de silanisation en milieu hydro-alcoolique

La silanisation est précédée d'un traitement piranha.

Le milieu de silanisation est composé de 2% volumique de GPMS dans un mélange hydroalcoolique (EtOH/H₂O : 3/1, en volume) dont le pH a été fixé à 4,5 par ajout d'acide acétique.

Nous avons effectué une étude cinétique sur le temps de silanisation par mouillage.

Ici des substrats Si/SiO₂ ont subi le protocole décrit ci-dessus, la seule modification étant une variation du temps de silanisation :

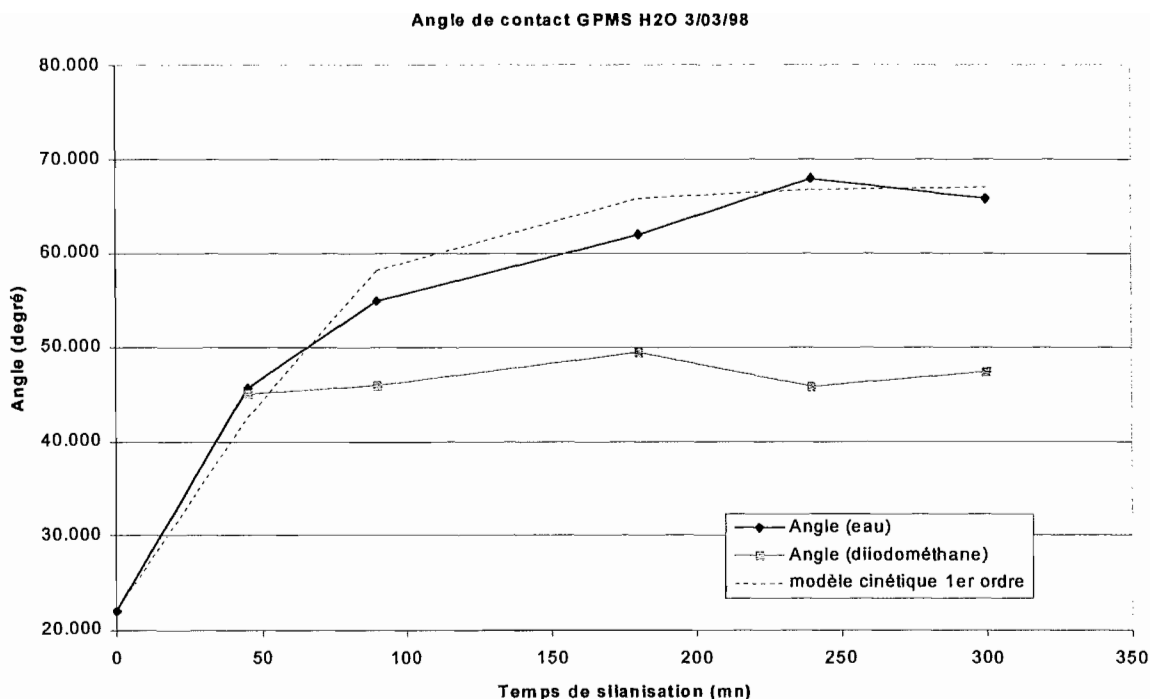


Figure 4-1 : Suivi de silanisation au GPMS en milieu hydro-alcoolique par mesures d'angle de contact.

La figure 4-1 présente l'évolution de l'angle de mouillage d'un substrat de type silice, ayant subi préalablement le traitement piranha, au cours du temps de silanisation. La courbe montre que l'angle de contact semble converger vers une asymptote à 67° pour un temps supérieur ou égal à 240 minutes. Ainsi le protocole de silanisation que nous avons adopté est le suivant.

La silanisation est effectuée durant quatre heures, à température ambiante, dans un large excès de mélange réactionnel. Puis les échantillons sont sortis de la solution, séchés rapidement à la soufflette, sous courant d'azote. Ils sont ensuite portés dans une étuve pour subir un recuit, pendant une heure, à cent degrés. Ils sont débarrassés de toute trace de silane non chimisorbé, par passage aux ultrasons, pendant dix minutes, dans l'éthanol. Ils sont enfin rincés à l'eau et séchés sous flux d'azote.

Ces conditions de silanisation permettent d'avoir une hydrolyse rapide du groupement éthoxy tandis que les vitesses de condensation sont minimisées (voir D.2).

Caractéristiques des couches obtenues par mouillage (voir annexe 5) :

Les angles de contact obtenus sur ces échantillons avec l'eau et le diiodométhane sont :

$$\Theta_{(H_2O)} = 67^\circ \quad \Theta_{(CH_2I_2)} = 46^\circ$$

$$\text{Owens_Wendt : } \gamma_d = 30 \text{ mJ/m}^2, \gamma_p = 12 \text{ mJ/m}^2$$

On réalise le même type d'échantillon, et le même mélange réactionnel (eau et acide acétique pH 4,5), mais sans ajout de silane, pour obtenir une référence.

(Réf : $\Theta_{(H_2O)} = 52^\circ$; $\Theta_{(CH_2I_2)} = 46^\circ$; Owens_Wendt : $\gamma_d = 29 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma_p = 24 \text{ mJ/m}^2$)

On peut observer une différence de 15° d'angle de contact avec l'eau entre échantillon et référence, ce qui dénote une modification de la surface lors de la silanisation et la possibilité de suivre la réaction par mesures d'angle de contact.

Caractéristiques des couches obtenues par microscopie à force atomique (AFM) :

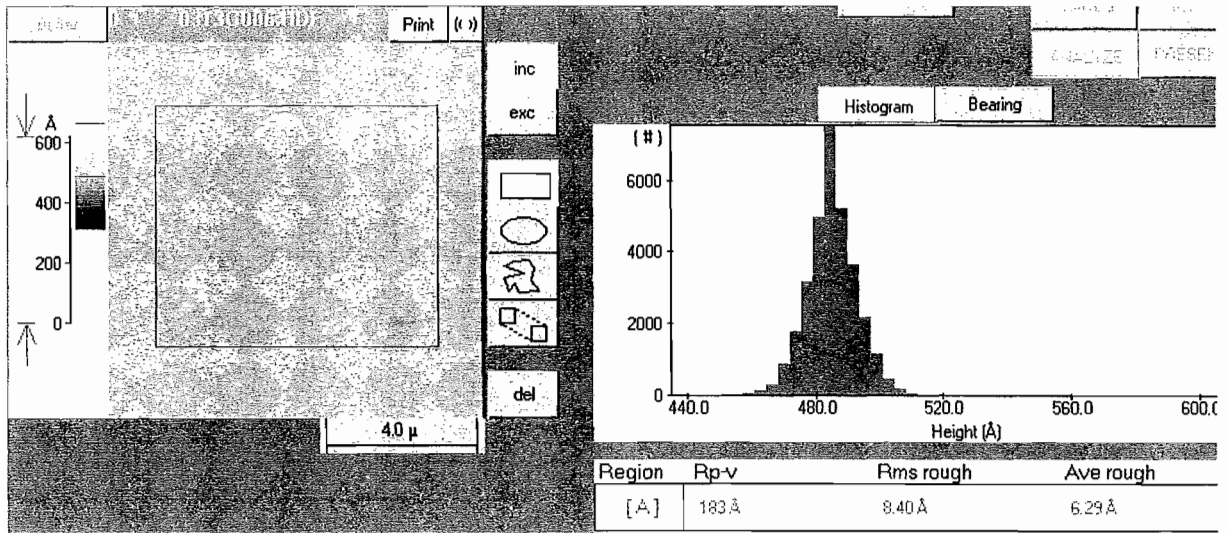


Figure 4-2 : Image de 10 microns d'un échantillon silanisé GPMS (Pointe A , sr1.sp1.g0.42)

Les mesures AFM en mode contact nous renseignent sur la topographie des surfaces. L'échantillon, après silanisation, présente une surface régulière et homogène, à cette échelle de 10 μm . Cette surface présente une RMS de 8,40 Å.

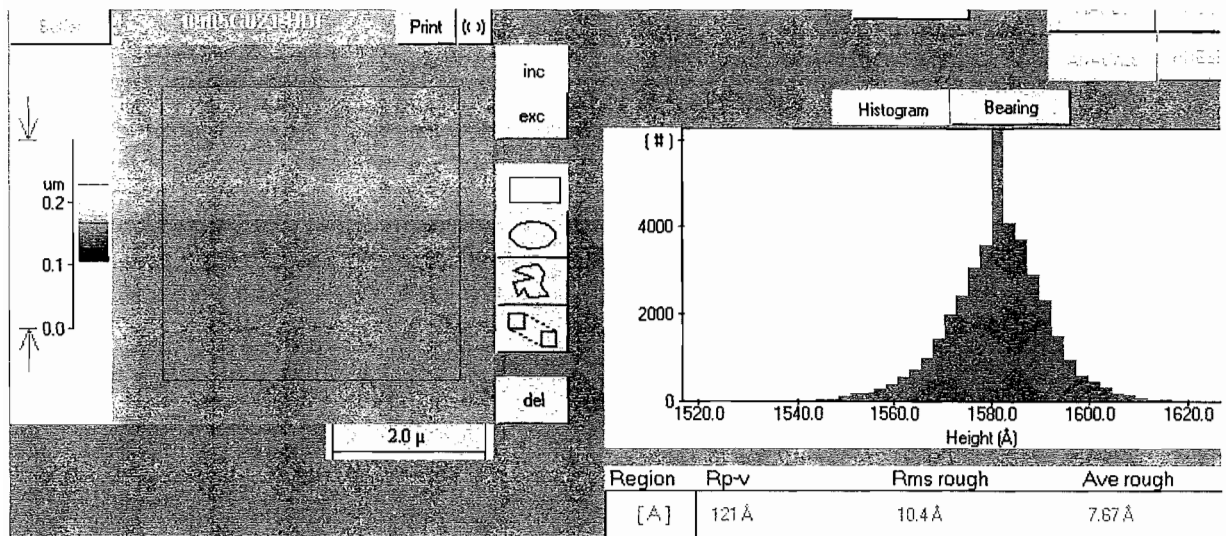


Figure 4-3 : Image de 5 microns d'un échantillon silanisé GPMS, après ouverture des époxydes par HCl 0,1 N, pendant 10 minutes, puis synthèse de l'oligonucléotide 656 en colonne. (Pointe C, sr1.sp0.4.g0.3)

L'échantillon, après silanisation et synthèse d'ADN, présente une surface régulière et homogène à cette échelle de 5 μm . Cette surface présente une RMS de 10,4 Å supérieure de 2 Å à celle de l'échantillon après silanisation. Cette différence reflète la modification de la topographie de la surface lors des étapes de synthèse ou de déprotection d'ADN. Ces modifications traduisent un apport de matière (ADN) et, peut-être, une dégradation de la couche de silane lors des contacts de la surface avec des réactifs agressifs (iode, acide trichloracétique, ammoniac, solvants...).

Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire du GPMS et de son hydrolyse en diol par HCl :

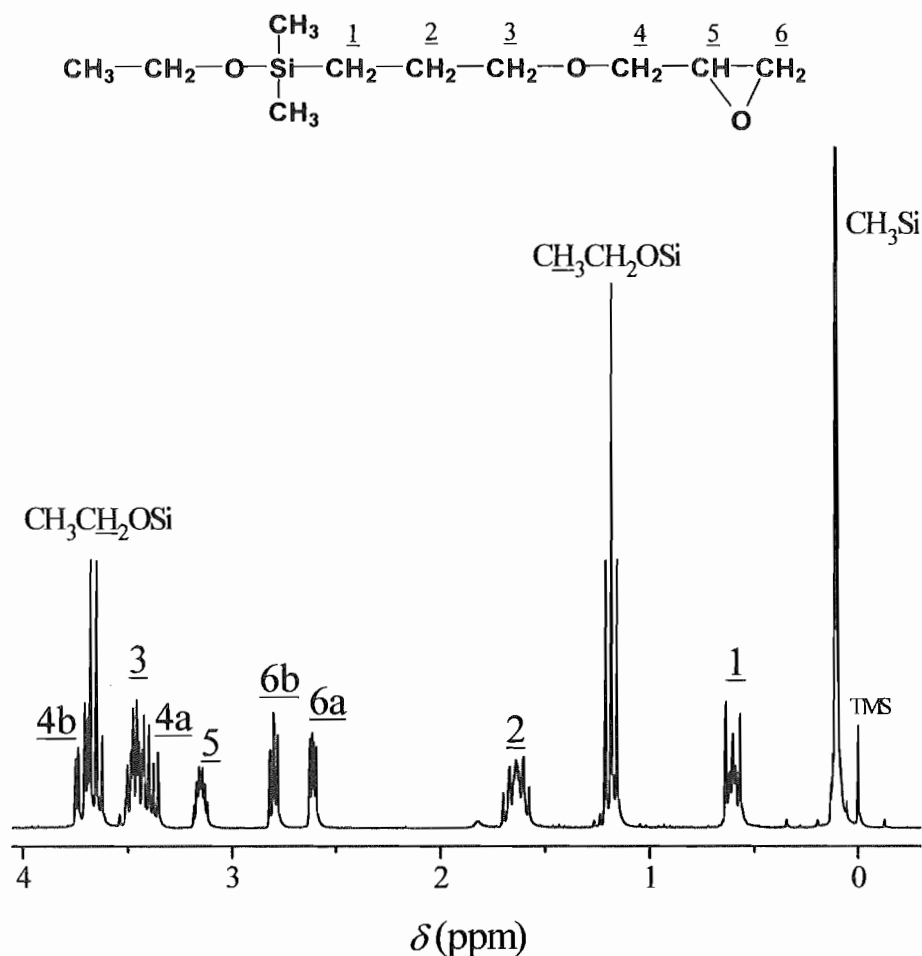


Figure 4-4 : Spectre RMN ¹H du GPMS en solution dans du CDCl₃. Les analyses ont été effectuées au LMOPS de Solaize et interprétées à l'aide d'expériences de découplage homonucléaire afin d'attribuer plus facilement les pics.

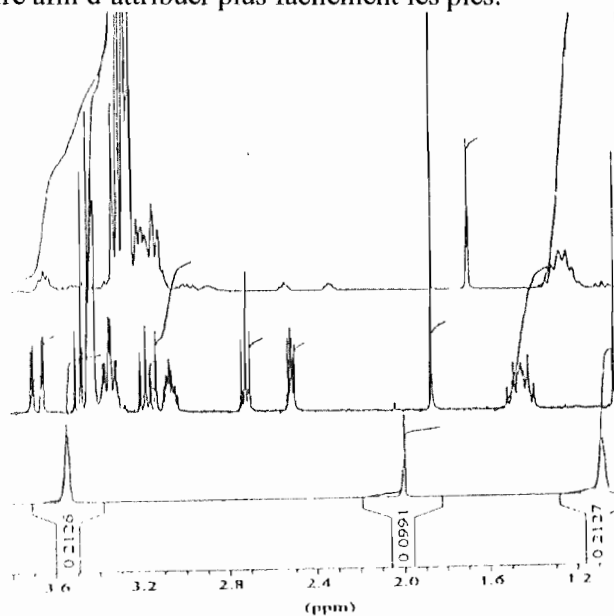


Figure 4-5 : Spectres RMN du GPMS dans CDCl₃, avant et après hydrolyse par HCl 0,1M pendant 10 minutes.

Après ajout de HCl (0,1M) pendant 10 minutes, l'hydrolyse de l'époxyde du GPMS en diol se traduit par la disparition de trois pics à 3,15, 2,61 et 2,80 ppm caractéristiques de la fonction glycidoxy hydrolysée (voir figure 4-5).

D'autres mesures par RMN du silicium permettent de caractériser les silanisations (Duchet 1997).

Sur un support Si/SiO₂ ayant suivi le protocole de fonctionnalisation et d'hydrolyse du GPMS, ce qui autorise la synthèse d'oligonucléotides, nous avons réalisé une puce, par synthèse *in situ*, avec le dispositif « macro ». Nous avons ensuite testé l'efficacité de cette puce par son aptitude à l'hybridation, caractérisée par cartographie de fluorescence.

Plan de synthèse :

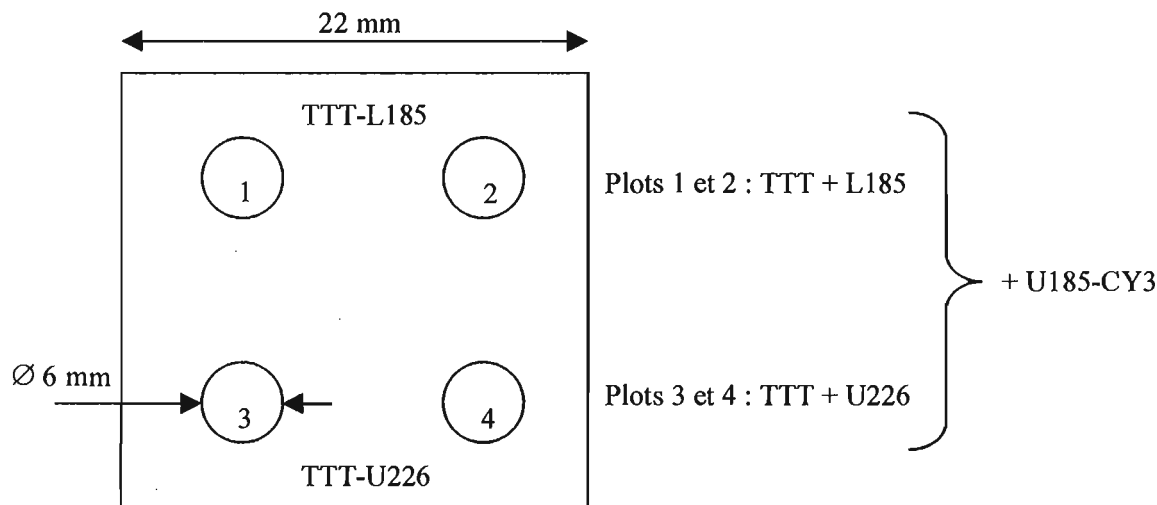


Figure 4-6 : Plan de synthèse de la puce GPMS.

Après déblocage à l'ammoniaque et hybridation avec des oligonucléotides U185-CY3, pendant 30 minutes à 47°C puis lavage au SSC 2X pendant 30 minutes à 47°C, l'hybridation a été caractérisée par cartographie de fluorescence.

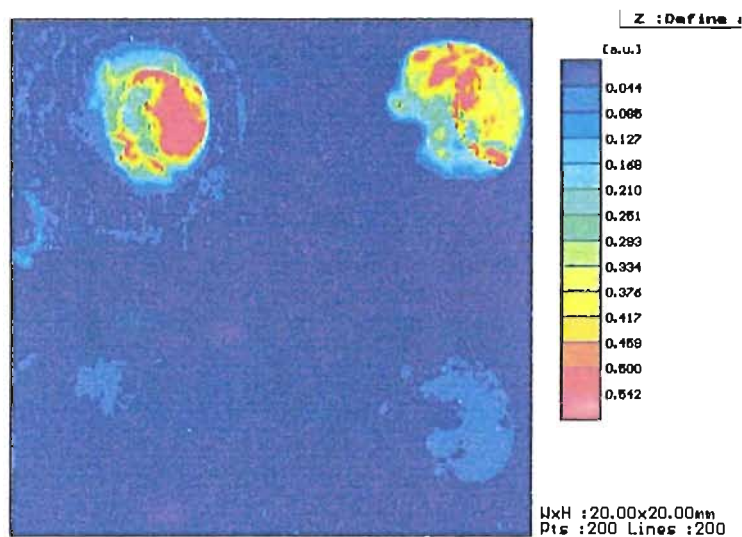


Figure 4-7 : Cartographie de fluorescence de la puce GPMS après hybridation avec des oligonucléotides modifiés U185-CY3, lavage au SSC 2X, et séchage de l'échantillon (PL=50 mW).

Les intensités de fluorescence mesurées sur les plots 1 et 2 sont en moyenne de 0,2 (U.A.), sur une base de 6 mm de diamètre pour les plots, et de 0,03 (U.A.) sur les plots non complémentaires 3 et 4, la puce présente donc une hybridation spécifique. Le rapport signal sur bruit de fond biologique est donc de l'ordre de 6,5. Sur la cartographie on observe une hétérogénéité des plots de synthèse. Elle est due à un défaut de fluide de la cellule de synthèse mais aussi à la probable dégradation de la couche d'accrochage lors des traitements de synthèse, de déprotection, d'hybridation et de lavage. Cette puce n'a pas résisté à la dénaturation par traitement à la soude 0,1 M, les tentatives de réhybridation ayant échoué.

Ce type de fonctionnalisation s'avère donc efficace pour initier une synthèse d'ADN et mener une hybridation spécifique, mais est très fragile vis-à-vis des lavages et protocoles de dénaturation.

Ces constatations nous ont confortés dans le choix de nouveaux silanes, pourvus d'une chaîne carbonée plus longue. Ils permettent la silanisation par la technique des SAM's et l'obtention d'une zone hydrophobe dense, qui protège les liaisons siloxanes des agressions extérieures, à la surface des structures.

Conclusion

Sur les surfaces silanisées au GPTS ou au GPMS, nous avons obtenu des résultats de caractérisation, d'hybridation, d'immobilisation ou de synthèse.

D'autres analyses nous ont permis de caractériser la formation de nos couches ainsi que leur fonctionnalité.

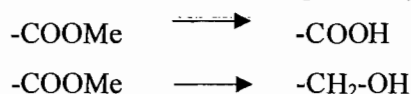
Nous avons déterminé par RMN le temps et les conditions d'hydrolyse de la fonction époxyde. Nous avons validé les mesures de fluorescence sur nos surfaces.

La différence d'angle de contact mesurée entre GPMS et GPTS provenait de la morphologie des films de silanes : le GPTS, sous forme d'îlots, présentait des silanols et des liaisons siloxanes vers l'extérieur ; la surface n'étant pas totalement couverte, elle présentait également des silanols et des ponts siloxanes vers l'extérieur.

5 LE CHLORODIMETHYLSILYLUNDECANOATE DE METHYLE (CDSUM)



Cette molécule possède une extrémité réactive vis-à-vis de la silice (silanol) après l'hydrolyse de la liaison Si-Cl dans le milieu réactionnel, et une fonction ester utilisable, après hydrolyse en acide, pour l'accrochage d'amino-espaces, ou réductible en alcool pour la synthèse directe d'oligonucléotides.



La possibilité de réactions sur les silanes greffés a été mise en évidence par différentes études (Maoz [1] 1995, Maoz [2] 1987).

La chaîne portant la fonction ester de ce silane comporte dix groupements méthylène ; cette longueur nous permet d'envisager l'utilisation de ce silane par auto assemblage, c'est-à-dire la fonctionnalisation de la silice par une " Self assembled monolayer (SAMs) " (Boukherroub[1] 1999).

L'organisation des assemblages moléculaires de silane permet de fabriquer des interfaces de composition, de structure et d'épaisseur bien contrôlées.

Les SAMs sont des assemblages moléculaires qui se forment spontanément sous certaines conditions (D.2.2). Ici les silanes hydrolysés en silanols, polaires, situés en milieu apolaire, ont une grande affinité pour le substrat polaire et se fixent sur celui-ci.

Le milieu de silanisation est composé de 10 mM de silane en solution dans de l'hexane, du CCl₄, ou un mélange des deux (Solvant aprotique et apolaire).

La silanisation est précédée d'un traitement piranha et d'un séchage sous flux d'azote.

La silanisation est effectuée durant deux heures et demie à basse température (- 5°C) dans un large excès de mélange réactionnel, puis les échantillons sont recuits deux heures à cent degrés et enfin débarrassés de toute trace de dépôt de silane non chimisorbé par lavage aux ultrasons pendant dix minutes dans le CCl₄.

Caractéristiques des couches obtenues avec le CDSUM :

*Mouillage :

$$\Theta_{(\text{H}_2\text{O})} = 80,6^\circ \quad \Theta_{(\text{CH}_2\text{I}_2)} = 46^\circ$$

$$\text{Owens-Wendt : } \gamma_d = 32 \text{ mJ/m}^2, \gamma_p = 3,5 \text{ mJ/m}^2$$

(Ref : $\Theta_{(\text{H}_2\text{O})} = 60^\circ$ $\Theta_{(\text{CH}_2\text{I}_2)} = 41^\circ$; Owens-Wendt : $\gamma_d = 31,5 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma_p = 16 \text{ mJ/m}^2$)

↳ Même mélange réactionnel (CCl₄) mais sans ajout de silane.

On peut observer une différence de 20° d'angle de contact avec l'eau entre échantillon et référence, ce qui dénote une modification de la surface lors de la silanisation et la possibilité de suivre la réaction par mesures d'angle de contact.

* Microscopie à force atomique :

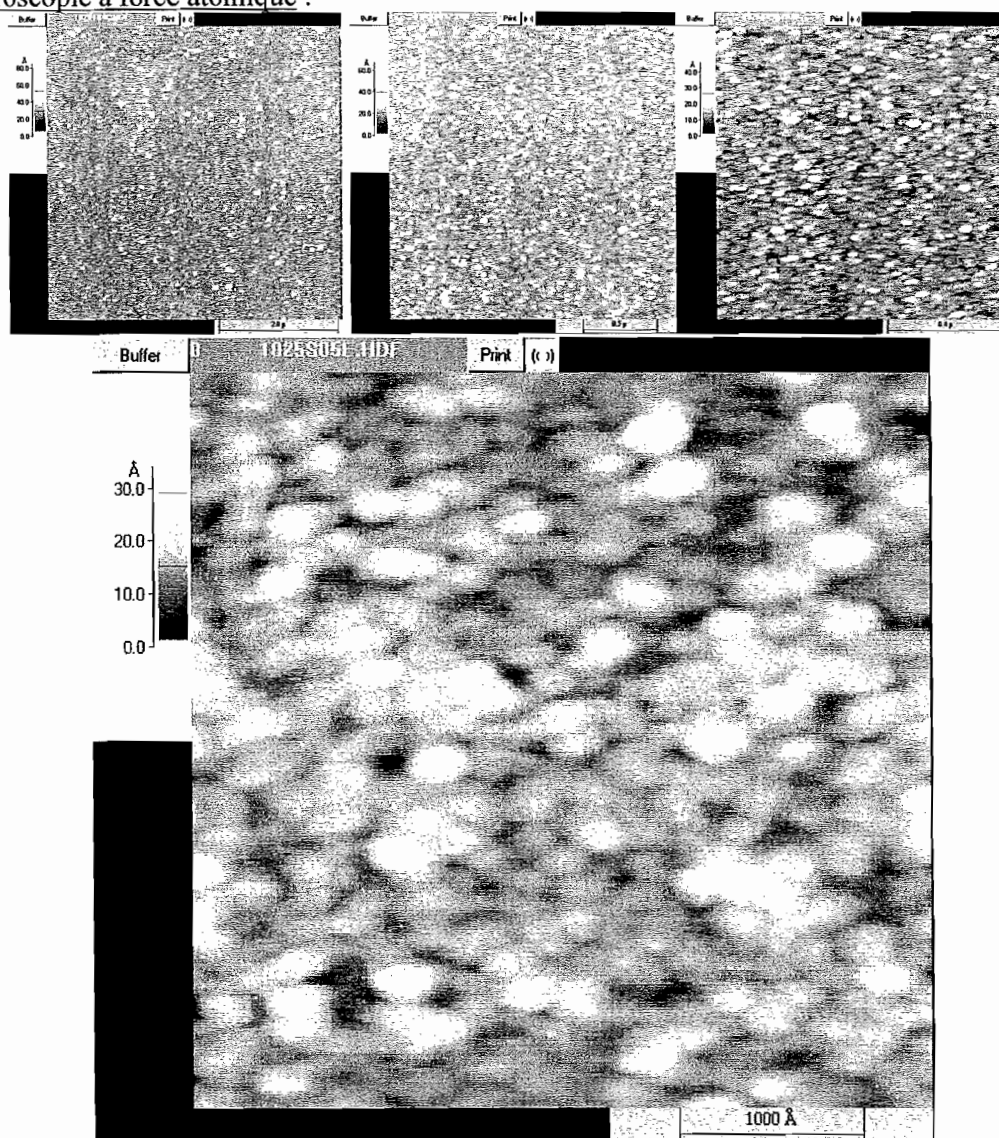


Figure 5-1 : Images AFM de 5, 2, 1 et 0,4 μm de côté d'un échantillon silanisé CDSUM.

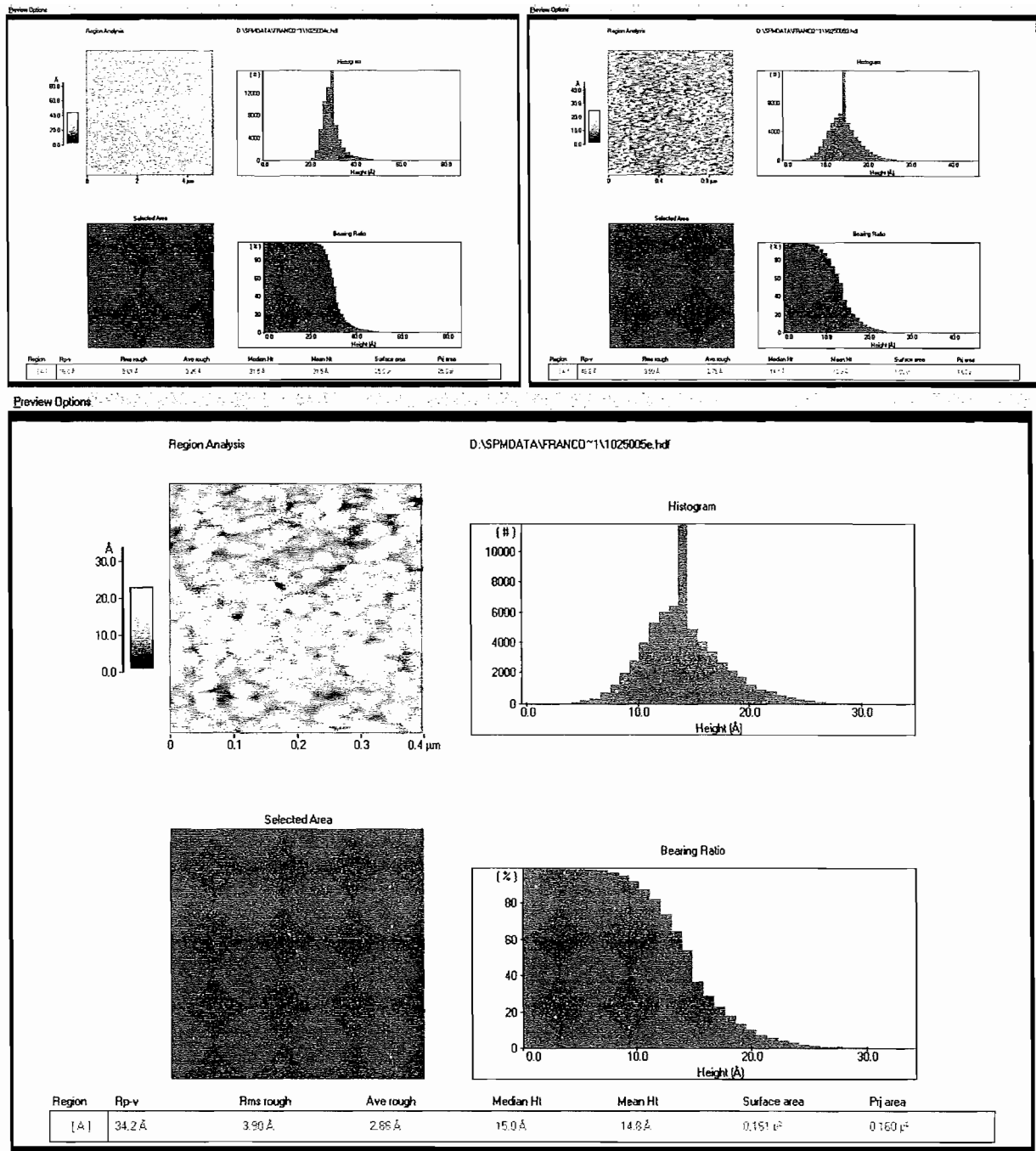


Figure 5-2 : Analyses de surface d'un échantillon silanisé CDSUM, pour les images de 5, 1 et 0,4 μm de côté. La RMS est de 3,9 Å sur les images de 0,4 et 1 μm et de 5 Å sur l'image de 5 μm.

Les figures 5-1 et 5-2 montrent des surfaces homogènes et de faible rugosité (RMS ~ 4-5Å). La surface semble couverte par des îlots de 20 à 40 nm de diamètre et d'une hauteur de 10 à 20 Å. Cette hauteur est à considérer avec précaution, les supports avant silanisation n'étant pas parfaitement plats (Rpv ~ 11 Å à une échelle de 1 μm après traitement piranha (voir D.1)). Une étude originale du suivi par AFM de formation de couches auto assemblées et de leurs propriétés a été conduite par Schönherr et al. (Schönherr 2000).

Des caractérisations par spectrométrie infrarouge de cette silanisation nous ont montré que l'ester de méthyle s'hydrolyse partiellement en acide (libération de HCl dans le milieu de silanisation, lors de l'hydrolyse du chloro-silane en hydroxy-silane, HCl catalyse l'hydrolyse de l'ester en acide). Les

caractérisations obtenues à cette étape, le sont sur une surface mixte composée d'extrémités esters et acides.

Procédé de réduction des esters de méthyle de surface

La réduction des fonctions carbonyle de l'ester de méthyle est obtenue par réaction dans une solution de borohydrure (BH_3) à 0,1 M dans du THF anhydre pendant 4 heures.

La réduction est suivie en infrarouge par la disparition des bandes carbonyles entre 1740 et 1710 cm^{-1} (Figure 5-3).

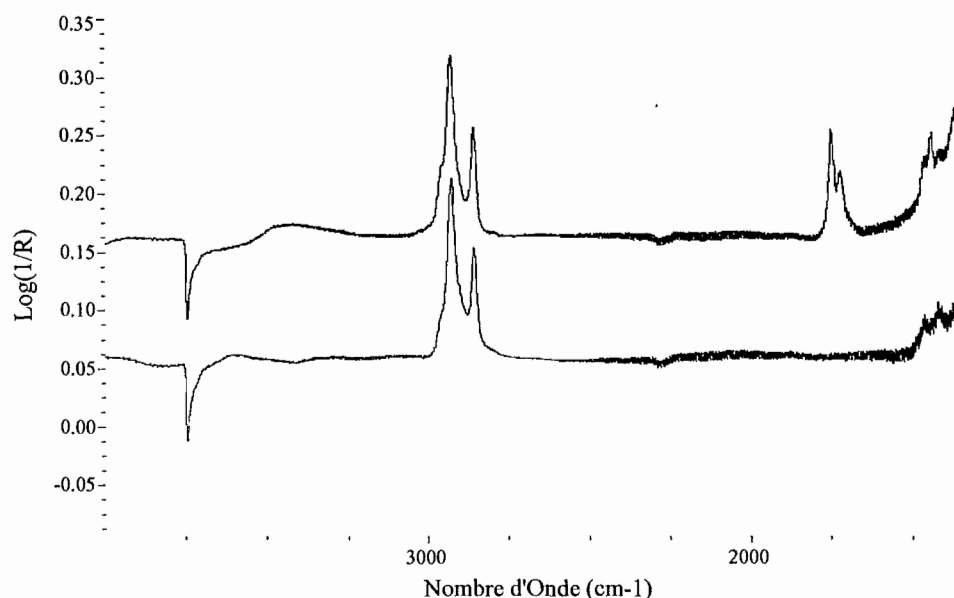


Figure 5-3 : Spectres infrarouges obtenus sur silicium poreux avant (en haut) et après (au milieu) réduction dans BH_3/THF (0,1M). En bas le spectre différentiel montre la disparition des pics carbonyles sans élimination de greffons.

Le spectre différentiel (Figure 5-3) permet de distinguer la disparition des bandes carbonyles associées aux modifications à 2923 cm^{-1} ($\nu\text{ CH}_3$) et vers 1450 cm^{-1} ($\delta\text{ CH}_2$).

En effet, au cours de la réduction, les substituants esters sont libérés de la surface. De même les groupements méthylènes proches du carbonyle changent d'environnement avec l'alcool, ce qui se traduit par des modifications à 1450 cm^{-1} .

La soustraction ne montre pas de disparition (pas de pic négatif 2820 et 2950 cm^{-1}) de greffons, la réaction n'altère donc pas le greffage chimique du silane.

La réduction des esters et acides par BH_3 dans le THF permet de transformer en totalité les groupements carbonyles en alcools, sans perturber la couche greffée.

Des synthèses d'ADN avec le dispositif « Macro » ont été effectuées sur ces supports réduits sans que l'on puisse obtenir de signaux d'hybridation. Deux causes peuvent expliquer ces échecs :

- Soit la synthèse n'a pas eu lieu.
- Soit l'hybridation n'a pas eu lieu.

Des expériences de silanisations et de synthèses menées à l'Université de Bordeaux I, en collaboration avec notre équipe, ont montré des résultats similaires. Leurs conclusions laissent à penser que sans zone hydrophile sous la fonction alcool, les synthèses d'ADN ne peuvent pas s'effectuer. La non-pénétration des réactifs de synthèse dans la couche hydrophobe constituée par les chaînes alkyles du silane semble être la raison de cette absence de réaction de synthèse.

6 MISE EN ŒUVRE D'UN AMINO-ESPACEUR

Nous avons surtout utilisé le CDSUM après greffage d'un amino-espaceur. Nous avons d'abord hydrolysé les esters de méthyle en acides, puis modifié ces acides avec du NHS en esters activés, selon le protocole décrit en annexe 6 (Dugas Thèse ECL 2001). Le greffage est réalisé dans du THF anhydre, à température ambiante, avec une concentration de 0,1 M de H₂N-POE (voir figure 6-1).

L' amino-espaceur (H₂N-POE) greffé est préparé au LMOPS (Mosquet 1997) de Solaize, par polymérisation contrôlée. Il comporte une extrémité amine primaire, une extrémité alcool primaire et une moyenne de 22 motifs d'oxyde d'éthylène (H₂N-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_n-OH avec n ≈ 22). Les différents avantages de cette étape sont de profiter d'une liaison covalente, stable et robuste, entre le silane et l'espaceur, et d'obtenir une fonction terminale alcool sur une sous-couche hydrophile du type polyéthylène glycol. Cette sous-couche a de bonnes propriétés pour limiter l'adsorption de l'ADN sur les surfaces. L'éloignement de l'ADN par rapport à la surface accroît sa liberté et lui permet de s'hybrider plus facilement (Shchepinov 1997, Chan 1998, Elaissari 1994, Ganachaud 1997, Ganachaud Thèse 1997).

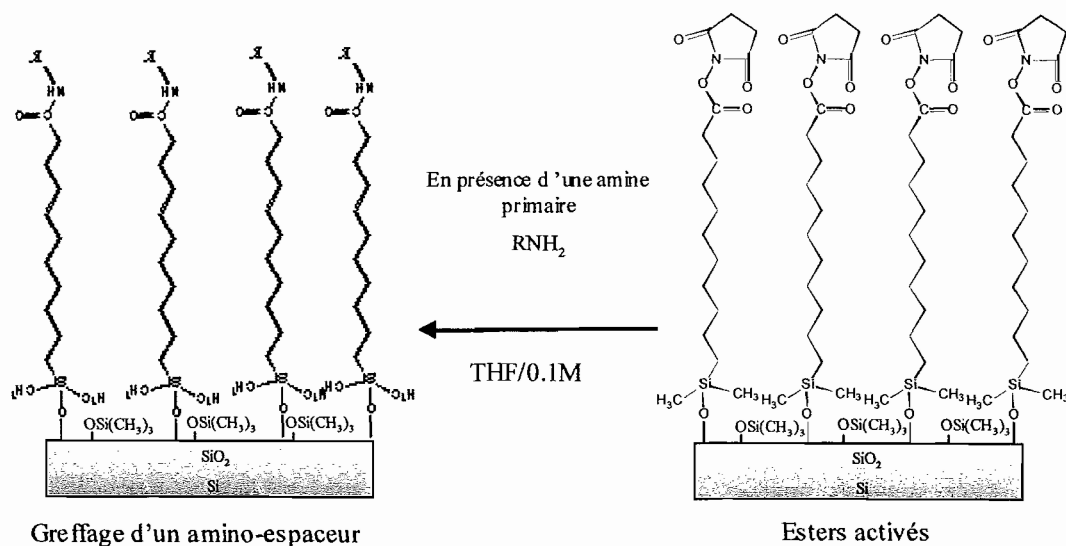
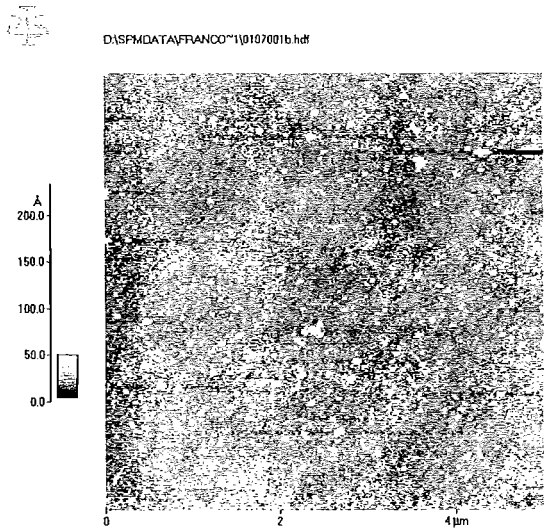


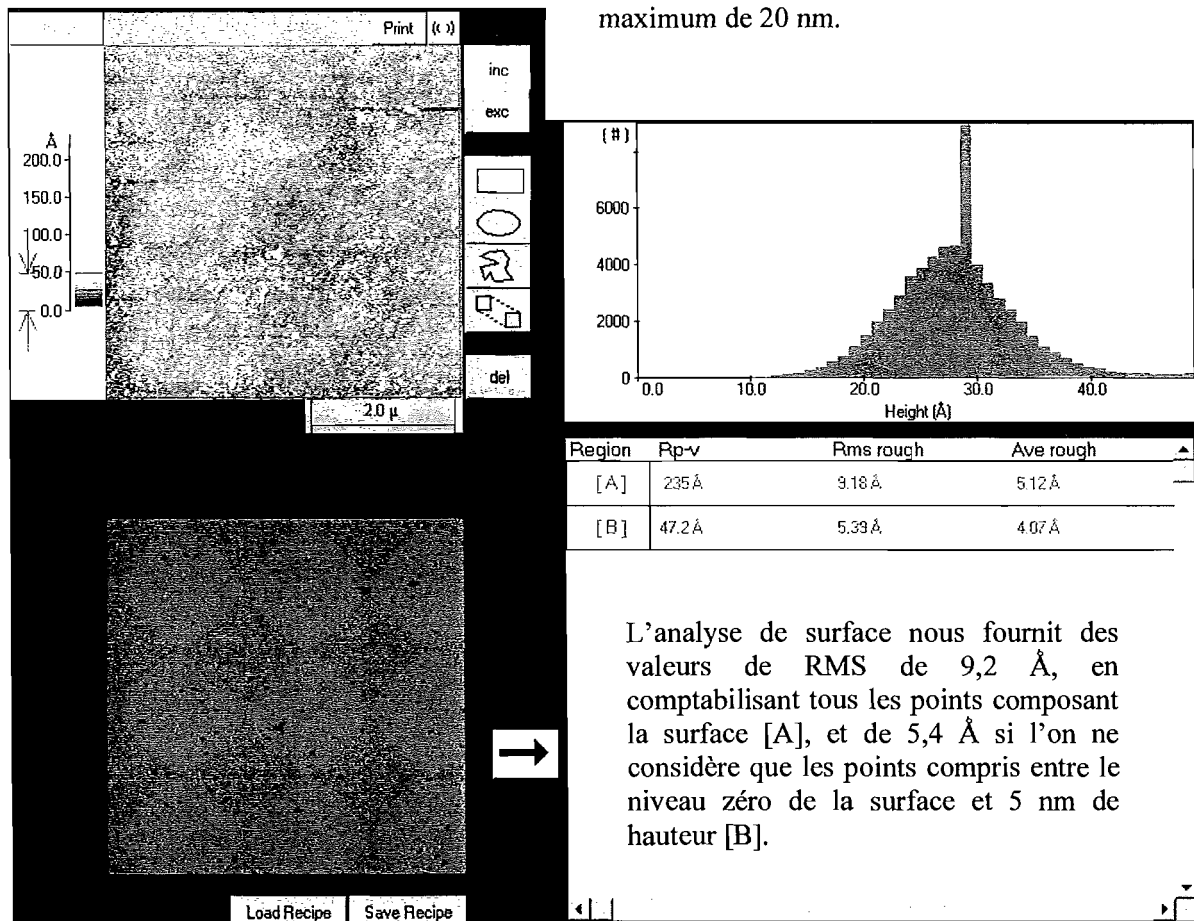
Figure 6-1 : Greffage d'un amino-espaceur sur un ester activé, selon V. Dugas, 2001.

Caractéristiques des couches obtenues avec le CDSUM greffé H₂N-POE :

*Microscopie à force atomique :

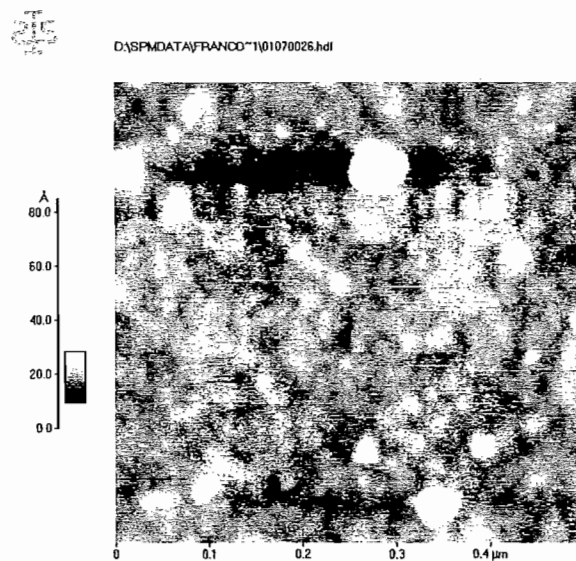
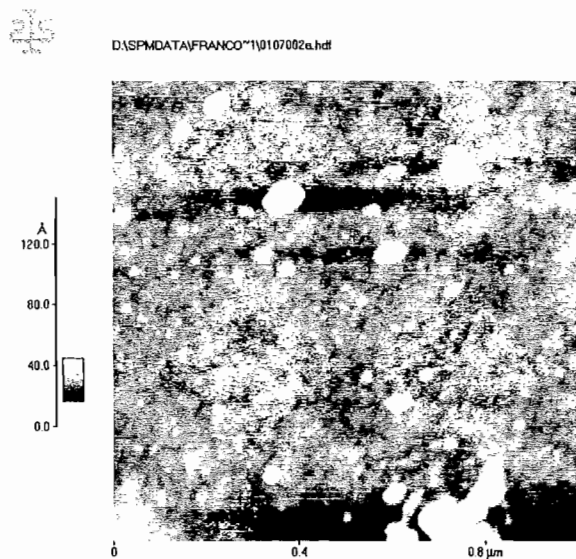
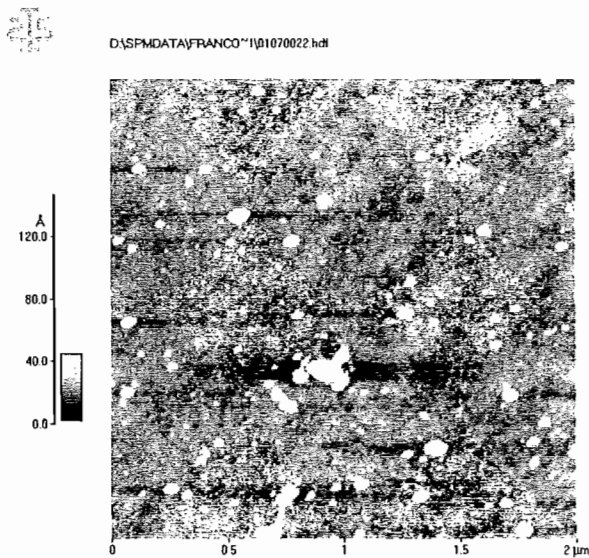


La surface de l'échantillon présente deux niveaux de topographie. On observe une couche relativement homogène, qui présente une RMS de 0.5 nm, partiellement recouverte ($\approx 5\%$) d'îlots de 20 à 200 nm de côté et d'une hauteur maximum de 20 nm.



L'analyse de surface nous fournit des valeurs de RMS de 9,2 Å, en comptabilisant tous les points composant la surface [A], et de 5,4 Å si l'on ne considère que les points compris entre le niveau zéro de la surface et 5 nm de hauteur [B].

Figure 6-2 : Image de 5 μm de côté d'une silice thermique silanisée ester (CDSUM), activée, greffée POE-NH₂. Cette série d'images a été réalisée en contact intermittent avec une amplitude de travail de 24 nm.



La présence des îlots à la surface peut provenir, soit du THF commercial, qui peut contenir des impuretés, soit des particules de H₂N-POE non solubilisées, qui s'adsorbent sur la surface, particules dues à une dissolution partielle du H₂N-POE. En effet ce produit est difficile à solubiliser, si l'on veut obtenir des concentrations proches de la mole par litre.

Figure 6-3 : Images de 2, 1 et 0,5 μm de côté d'une silice thermique silanisée ester, activée, greffée POE-NH₂.

Des exemples de mise en œuvre de cette fonctionnalisation sont présentés dans le chapitre des résultats expérimentaux (voir Chapitre IV).

7 CONCLUSION

Nous avons étudié trois silanisations à l'aide de silanes mono et trifonctionnels et le greffage d'un amino-espaceur sur le CDSUM. Les mesures d'angles de contact ont montré qu'il y a bien eu modification de surface. La microscopie à force atomique nous a renseignés sur la morphologie des couches préparées. Par la suite, nous avons établi que le meilleur compromis était la silanisation de type SAM's, couplée à la chimie des esters par greffage du H₂N-POE.

CHAPITRE IV

RESULTATS EXPERIMENTAUX : CARACTERISATION DE L'HYBRIDATION ET LECTURE DES PUCES

1 SPECTROMETRIE XPS

1.1 Introduction

La spectrométrie de photoélectrons (XPS) est décrite dans l'annexe 7. Il s'agit d'un outil de caractérisation des différents traitements faits sur les échantillons. Nous nous sommes proposé, en collaboration avec le LEOM, d'étudier si L'XPS pouvait aussi constituer une technique de lecture des puces, tout en sachant que cette technique risquait d'être onéreuse.

1.2 Résultats expérimentaux

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes attachés à vérifier la faisabilité ainsi que la sensibilité de l'XPS vis-à-vis des puces à ADN, aux différents stades de leur fabrication et de leur utilisation.

Afin de réaliser une étude comparative du processus d'hybridation sur support solide, nous avons préparé trois échantillons de Si/SiO₂ de 1 cm par 1 cm, que nous avons introduits simultanément dans la chambre d'analyse. Les échantillons ont été traités sur toute leur surface de façon homogène.

Nous avons étudié et comparé dans les mêmes conditions :

- Le premier échantillon fonctionnalisé au CDSUM et au H₂N-POE prêt à la synthèse, constituant une référence sans acides nucléiques (échantillon n°1).
- Un échantillon fonctionnalisé synthétisé (L185) et déprotégé à l'ammoniaque, prêt à l'hybridation (échantillon n°2).
- Un échantillon fonctionnalisé synthétisé (L185), déprotégé à l'ammoniaque, hybridé U185-CY3 après lavage au tampon tris 10 mM + NaCl 50 mM (échantillon n°3).

Les deux premiers échantillons ont été lavés abondamment à l'eau avant la série de mesures, ce qui n'était pas possible sur l'échantillon hybridé, car il aurait subi le processus de dénaturation.

Les caractéristiques des substrats utilisés dans cette série d'analyses sont les suivantes :

- Longueur d'un mono brin d'acide nucléique : 5 Å par base
- Longueur d'un double brin d'ADN : 3,5 Å par base
- Densité d'oligonucléotides hybridables sur nos substrats : $5 \cdot 10^{11}$ brin / cm² (estimation par radiomarquage ³²P*)
- L185 : TTCCTAACCGGGCGCAACCTAATCG(5')
- U185 : AAGGATTGGCCCGCGTTGGATTAGC(3')-CY3
- Composition des nucléotides : (1*P + 5*O + 5*C + 7*H) par base, plus les hétérocycles azotés
T : 2*N + 2*O + 5*C + 5*H
A : 5*N + 5*C + 4*H
C : 3*N + 1*O + 4*C + 4*H
G : 5*N + 1*O + 5*C + 4*H
- Composition du CY3 lié aux cibles : 1*P + 5*O + 2*N + 26*C + 37*H + 1*Cl
- Estimations pour des couches compactes ($5 \cdot 10^{11}$ brin / cm²).
Epaisseur de la couche type échantillon n° 2 : 125 Å
Epaisseur de la couche type échantillon n° 3 : 87,5 Å

Echantillon n° 2 :

$$(100 * P + 596 * O + 368 * N + 964 * C + 1120 * H) * 10^{17} \text{ atome/cm}^3$$

Echantillon n° 3 :

$$(291,4 * P + 1742,9 * O + 1091,4 * C + 1091,4 * N + 3324,6 * H + 5,71 * Cl) * 10^{17} \text{ atome/cm}^3$$

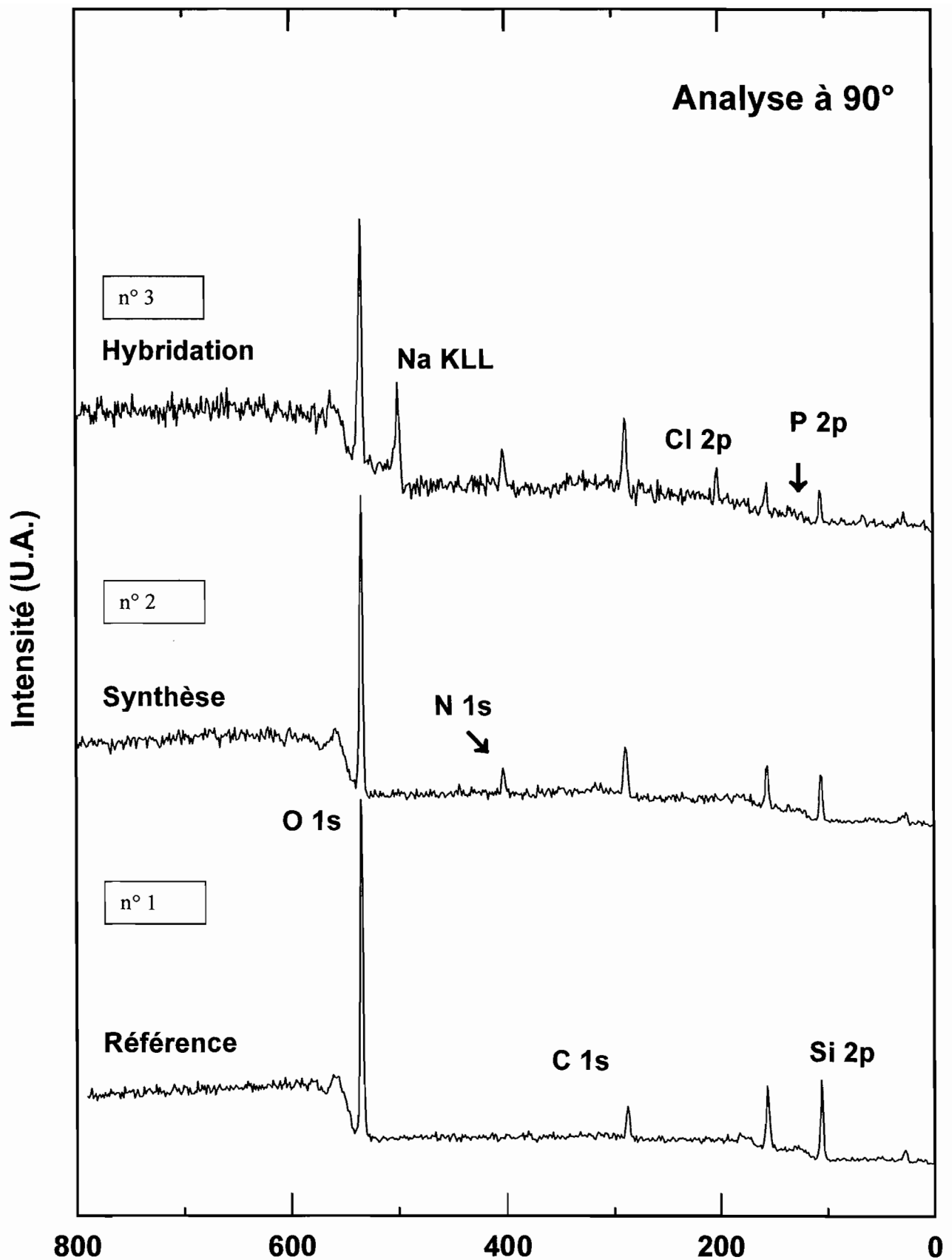


Figure 1.2-1 : Spectre général des trois échantillons à incidence de détection normale.

Dans la figure 1.2-1 sur le spectre de l'échantillon de référence (n°1), nous observons la présence de silicium (2s et 2p), d'oxygène (1s) et de carbone (1s).

Sur le spectre de l'échantillon synthétisé (n°2), nous observons la présence de phosphore (2p) et d'azote (1s), en plus des éléments présents sur le premier échantillon.

Sur le spectre de l'échantillon hybridé (n°3) nous observons la présence de chlore (2p) et de sodium (Na KLL, raie Auger caractéristique du sodium).

L'intensité des raies caractéristiques du silicium et de l'oxygène décroît de l'échantillon n°1 au n°3, ces raies étant dues à la silice du substrat ainsi qu'au silane et au POE. Cette décroissance est attribuable à la présence de nouvelles couches superficielles (oligonucléotides et duplex) formant un écran aux photoélectrons des couches inférieures.

La présence d'azote et de phosphore sur les échantillons n°2 et n°3 est caractéristique de la présence d'acides nucléiques.

La présence de sodium et de chlore sur l'échantillon n°3 provient du tampon d'hybridation et de rinçage, non complètement éliminé par un séchage « à la soufflette » sous flux d'azote. Un atome de chlore est également apporté par chaque brin cible hybridé (CY3 = chlorure organique).

L'intensité de la raie (1s) du carbone augmente de l'échantillon n°1 au n°3, dénotant une augmentation de la quantité de matière organique présente à la surface des échantillons.

Nous avons procédé à des acquisitions plus fines dans les régions caractéristiques des niveaux de cœur P 2p du phosphore, N 1s de l'azote et Si 2p du silicium (voir figure 1.2-2).

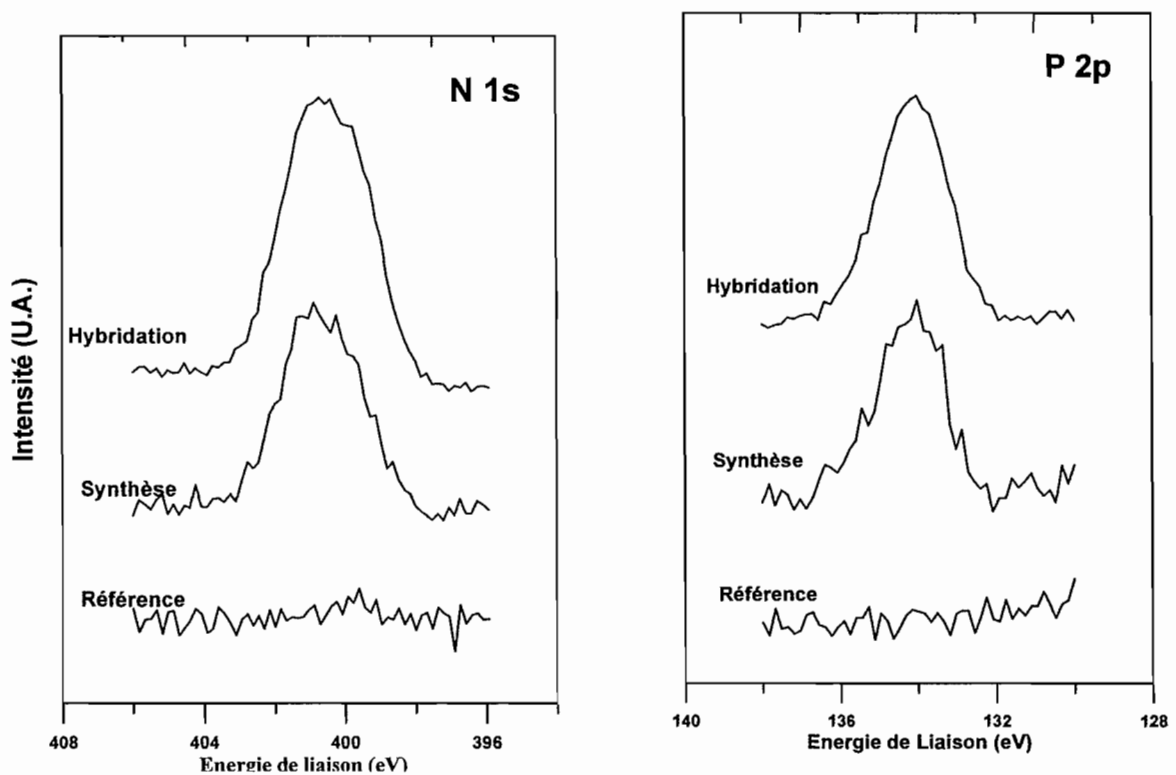


Figure 1.2-2 : Spectre des trois échantillons à incidence de détection normale des régions des niveaux de cœur N 1s de l'azote et P 2p du phosphore (angle d'analyse 90°).

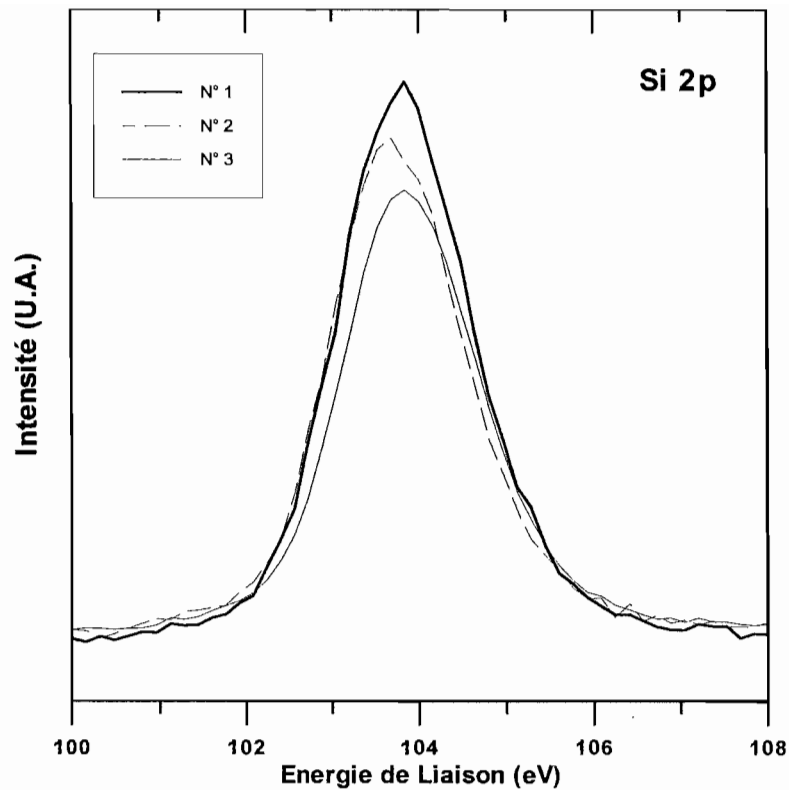


Figure 1.2-3 : Spectre des trois échantillons à incidence de détection normale des régions du niveau de cœur Si 2p du silicium (angle d'analyse 90°).

Les acquisitions spécifiques dans les régions des niveaux de cœur nous permettent d'augmenter la résolution des mesures par rapport aux spectres généraux.

Les trois séries de spectres des figures 1.2-2 et 1.2-3 nous montrent l'apparition et l'augmentation des raies caractéristiques des niveaux de cœur du phosphore et de l'azote et confirment l'atténuation du signal caractéristique du niveau de cœur Si 2p liée à l'augmentation de l'épaisseur de la couche organique superficielle.

Nous avons réalisé une analyse angulaire pour augmenter la réponse de la couche superficielle des substrats (profondeur moyenne sondée par l'analyse = $3\lambda\sin\theta$).

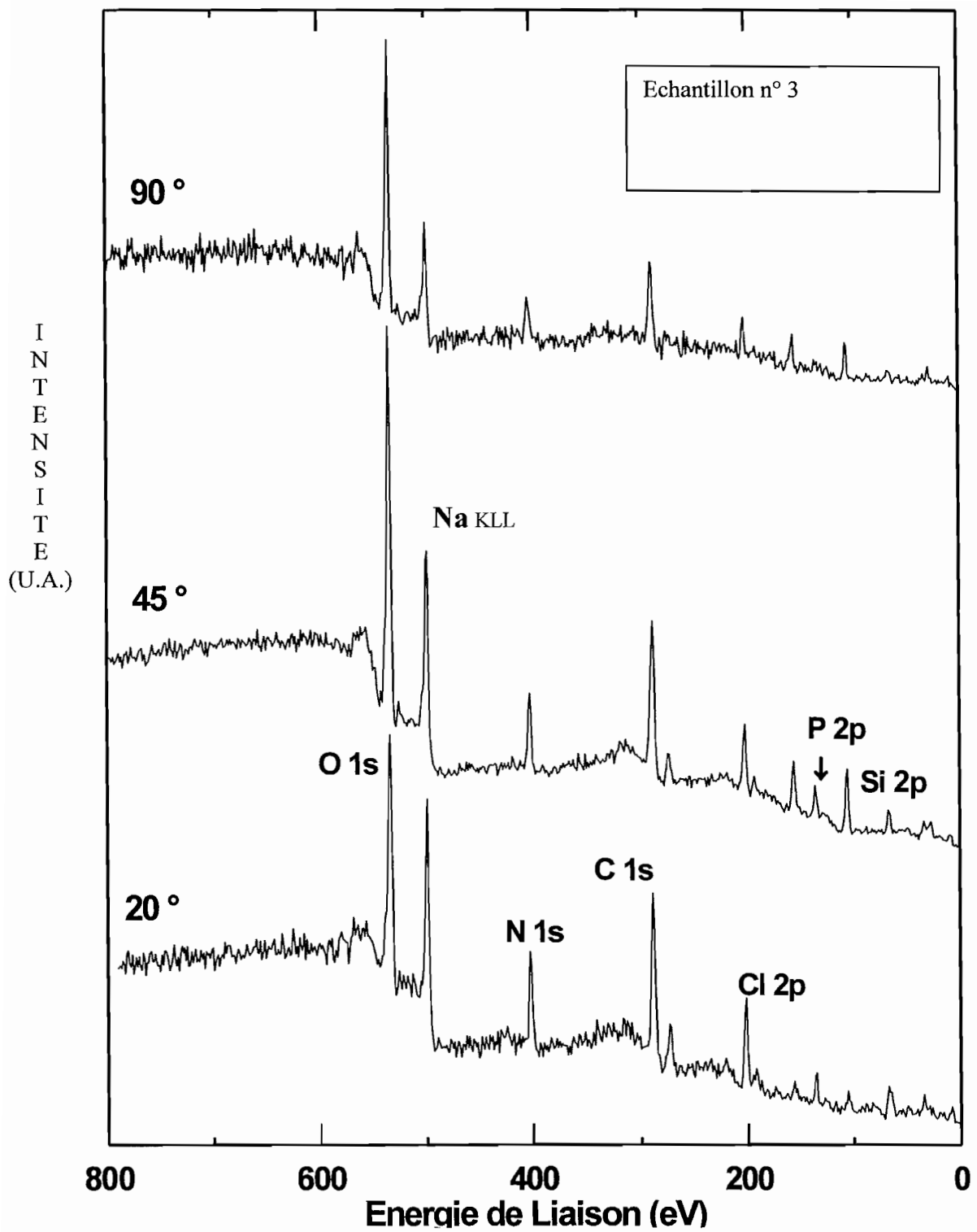


Figure 1.2-4 : Spectre général de l'échantillon n° 3 à différentes incidences de détection.

Sur la figure 1.2-4 nous observons l'échantillon n°3 à différentes incidences de détection. Nous notons la présence de silicium (2s et 2p), d'oxygène (1s), de carbone (1s), de phosphore (2p) d'azote (1s), de chlore (2p) et de sodium (Na KLL, raie Auger caractéristique du sodium). L'influence de l'épaisseur de matière soumise à analyse est particulièrement sensible entre 45° et 20°. En effet, à 90° et 45°, les pics Si 2p sont plus importants que le pic P 2p, contrairement aux analyses effectuées à 20°.

Nous avons pu obtenir des informations quantifiées sur l'aire des pics des photoélectrons grâce à un logiciel de traitement VSW :

- Aires brutes

Angle	Echantillon	Si 2p	N 1s	P 2p
90°	n° 1	0,865		
	n° 2	0,56	0,254	0,076
	n° 3	0,33	0,33	0,083
20°	n° 1	0,196		
	n° 2	0,061	0,141	0,03
	n° 3	0,026	0,204	0,059
45°	n° 2	0,33	0,19	0,64
	n° 3	0,16	0,27	0,08

- Rapports d'aires brutes

n° 3 / n° 2	Si 2p	N 1s	P 2p
90°	0,59	1,30	1,09
45°	0,48	1,42	1,25
20°	0,43	1,45	1,97

Les tendances données par les comparaisons d'aires brutes nous indiquent une augmentation des signaux caractéristiques de l'azote et du phosphore lors de l'étape d'hybridation. De plus, l'analyse angulaire montre l'augmentation de la sensibilité avec la diminution de l'épaisseur soumise à analyse.

Un problème pour l'interprétation des résultats est lié aux propriétés des acides nucléiques : en effet l'hybridation sur une surface correspond à un apport de matière, mais également à une diminution de l'épaisseur de la couche d'acide nucléique (formation de la double hélice du duplex). Ceci implique une augmentation de la densité de la couche d'ADN provoquant des variations de libres parcours moyens des photoélectrons dans cette couche de matière.

Sans pouvoir donner, avec précision, des résultats quantitatifs, pour lesquels la connaissance des libres parcours moyens est nécessaire, nous nous proposons de pondérer les rapports d'aires brutes par l'aire brute du pic 2p du silicium (Si 2p). L'atténuation du signal Si 2p entre les échantillons n°1 et n°2 et 3 est due aux couches d'acides nucléiques. De plus le pic Si 2p est énergétiquement proche, du pic P 2p ; les photoélectrons doivent donc avoir une atténuation d'intensité comparable dans ces couches.

- Aires pondérées Si 2p

Echantillon	Angle	N 1s / Si 2p	P 2p / Si 2p	P / N
n° 3	20°	7,85	2,27	0,289
n° 3	45°	1,687	0,444	0,259
n° 3	90°	1	0,251	0,25
n° 2	20°	2,31	0,49	0,213
n° 2	45°	0,576	0,192	0,334
n° 2	90°	0,453	0,136	0,299

- Rapports d'aires pondérées Si 2p

n° 3 / n° 2	N / Si	P / Si
90°	2,21	1,85
45°	2,93	2,31
20°	3,40	4,54

Ces derniers rapports, largement supérieurs à l'unité, montrent que l'on obtient une bonne détection de l'hybridation.

Ces expériences nous ont permis de valider les mesures XPS comme moyen de lecture des puces à ADN (mesures qualitatives et relatives). La difficulté pour rendre les mesures quantitatives sera de déterminer les libres parcours moyens et les « intensités infinies d'émission » pour des couches d'ADN de fortes épaisseurs ayant les mêmes structures et densité que sur les puces à ADN, dans le cadre normal de leurs utilisations (Tanuma 1994).

Il est à noter que la sensibilité des mesures XPS pour la lecture des puces à ADN serait grandement augmentée en choisissant des cibles de grande taille, par rapport à l'hybridation oligonucléotide contre oligonucléotide.

2 CARACTERISATION DES PUCES PAR MESURES ELECTROCHIMIQUES

Avant de prétendre à l'utilisation des mesures optoélectrochimiques pour la caractérisation locale de l'hybridation sur les puces, il apparaît nécessaire de vérifier les possibilités du dispositif de mesures en termes de reproductibilité, de sensibilité et de résolution spatiale. Ces vérifications font l'objet du paragraphe suivant.

La sensibilité de nos mesures dépend de facteurs intrinsèques aux substrats Si/SiO₂ et de facteurs externes. Les facteurs intrinsèques aux structures étudiées définissent une plage de potentiels, dans laquelle la structure est sensible (zone d'inversion). La dynamique de cette zone représente la sensibilité, qui est le rapport de la variation de photo-potentiel à la variation de polarisation. Les facteurs externes correspondent à la nature de la perturbation à détecter : charge ou effet capacitif d'un isolant.

Différents types de substrats ont été testés (n, p, p+, silicium poreux).

2.1 Sensibilité / reproductibilité / résolution

Afin de vérifier la reproductibilité des mesures, nous avons réalisé trois cartographies d'impédances optoélectrochimiques successives sur le même échantillon, à 24 heures d'intervalle. L'échantillon est une structure constituée de silicium type p, recouvert d'une couche de silice nue de 15 nm, avec un contact ohmique or-chrome sur la face arrière du silicium. Les trois cartographies ont

été effectuées sur une surface de 25*25 mm avec un pas de 200 μm (15625 points de mesure) dans un milieu Tris 10 mM + NaCl 50 mM au pH de 7,1, avec une polarisation par rapport à la contre électrode de $dV= 350 \text{ mV}$. Ces mesures ont été réalisées, à l'échelle microscopique, sur le banc de mesures qui est muni d'une contre électrode en platine.

La figure 2.1-1 présente les cartographies d'impédance en phase et en quadrature de l'échantillon. Elle montre que les mesures sont reproductibles ; les cartographies présentent les mêmes défauts situés aux mêmes positions sur l'échantillon. Ces défauts sont intrinsèques à l'échantillon. Il est également possible d'observer une légère augmentation des impédances en phase et en quadrature, au cours du temps. Cette augmentation peut être attribuée à une sensible modification superficielle de l'échantillon, due à une légère hydroxylation de la surface de silice au contact de la solution. Nous avons également observé ce phénomène par mesures d'impédances électrochimiques. Ces cartographies montrent que la reproductibilité intrinsèque au système de mesures est de l'ordre de 10^{-5} V et que la sensibilité est de l'ordre de 10^{-6} V.

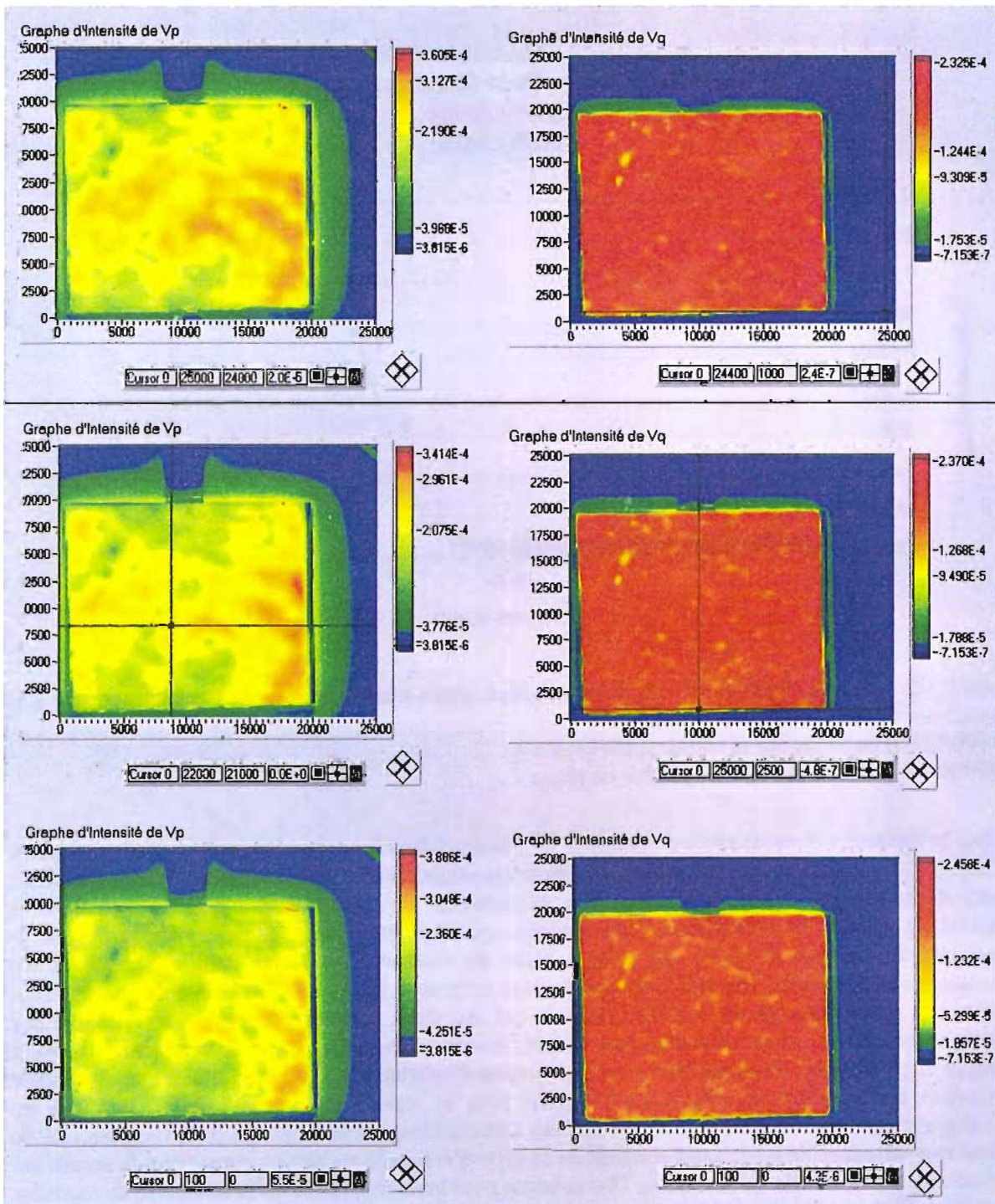


Figure 2.1-1 : Cartographies d'impédances optoélectrochimiques sur un échantillon type p, effectuées sur une période de 48 heures.

Sur la figure 2.1-2 deux caractéristiques donnant le photopotential (V_{ph}), en fonction de la polarisation, ont été réalisées sur deux zones de l'échantillon, présentant les réponses les plus différentes sur les cartographies (coordonnées 11400 / 8600 μm pour les courbes en rouge et 11000 / 3400 μm pour les courbes en vert).

Impédance optoélectrochimique
Tris 10 mM + NaCl 50 mM pH=7,1
-(11400/8600)
-(11000/3400)

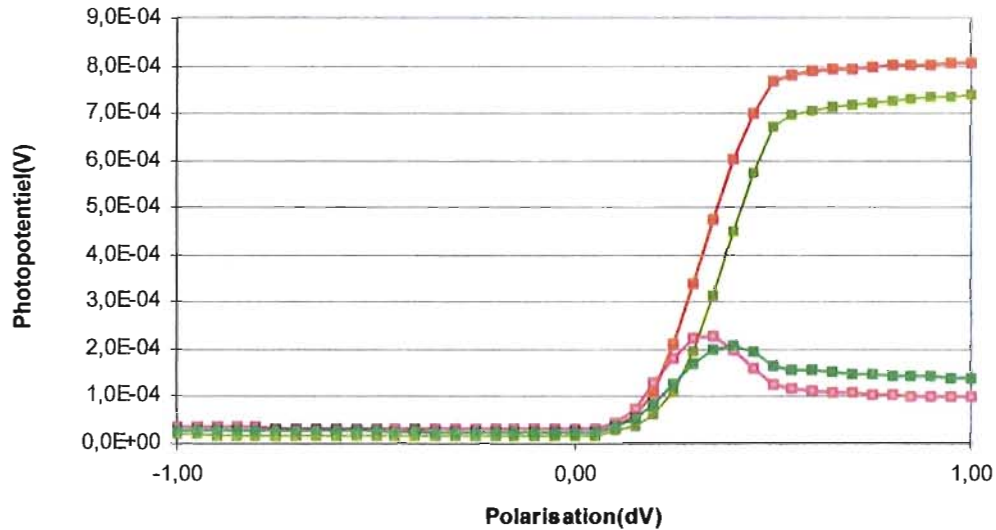


Figure 2.1-2 : Courbes $V_{ph}=f(dV)$ réalisées sur deux zones très différentes de l'échantillon (fig 2.1-1), montrant l'hétérogénéité de la surface.

- (11400/8600) en rouge sur la cartographie en phase

- (11000/3400) en vert sur la cartographie en phase

Sur la figure 2.1-2, on observe un décalage en potentiel dans les caractéristiques de ces deux zones de l'échantillon. Ce décalage est lié à la qualité électronique de l'interface silicium / silice (présence d'états d'interface) et traduit l'hétérogénéité du substrat. Ce phénomène a pour conséquence la difficulté de choisir le potentiel de cartographie, qui doit être placé dans des domaines de la dynamique de réponse $Z = f(V)$, en chaque point de l'échantillon. Cette dernière condition est nécessaire pour assurer la sensibilité du transducteur (structure EDS) sur l'ensemble de sa surface et permettre la lecture des puces à ADN. Dans le cas des deux courbes présentées, le décalage des caractéristiques en potentiel est supérieur à 55 mV, ce qui est du même ordre de grandeur et souvent supérieur aux variations de signal liées à un phénomène d'hybridation. Ceci rend d'autant plus délicate l'utilisation des impédances optoélectrochimiques pour la lecture des puces à ADN, que l'on ne dispose pas d'échantillons sans défauts d'interface. Cette hétérogénéité se traduit par l'impossibilité de réaliser une cartographie à potentiel constant de ce type d'échantillon, tout en conservant la sensibilité constante pour l'ensemble de la surface. Une solution pour surmonter cette difficulté serait de modifier le montage électronique d'acquisition du photopotentiel pour y ajouter une boucle de rétroaction, afin de pouvoir travailler à photopotentiel constant, en ajustant automatiquement le potentiel de polarisation. Dans ce cas, le décalage de potentiel de polarisation est directement lié au décalage de potentiel de bandes plates de la structure EDS.

Nous avons vérifié la résolution dimensionnelle du montage réalisé par des mesures sur des échantillons constitués par des substrats de silicium de type n (figure 2.1-4) et p (figure 2.1-3) recouverts d'une couche de 15 nm de silice supportant une couche de résine photolithographiée. Sur cet échantillon, les variations du photopotentiel observées sont dues à l'apport d'une couche de résine sur le comportement diélectrique de la surface de la structure.

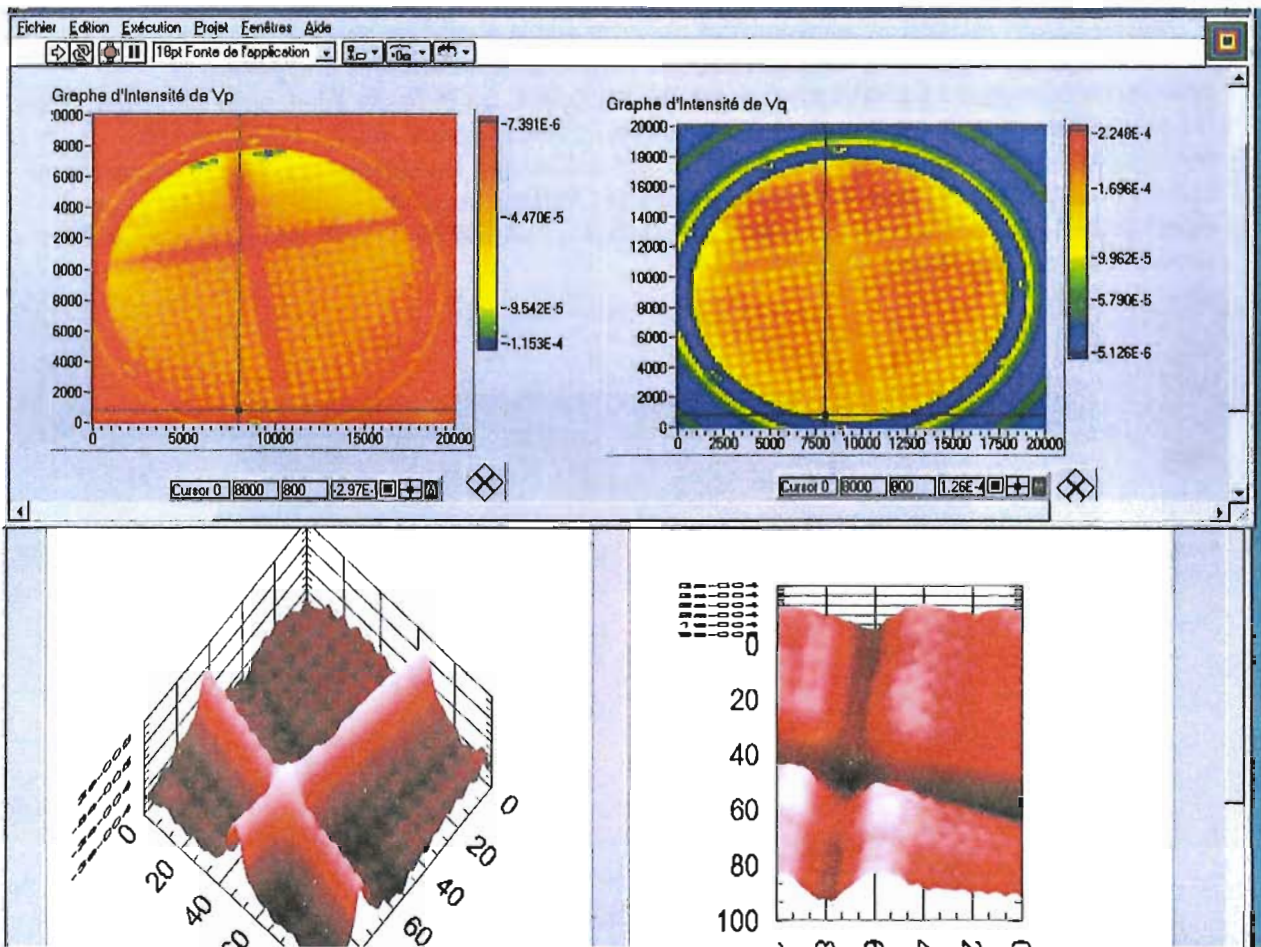


Figure 2.1-3 : Cartographie d'impédance optoélectrochimique d'un échantillon de type p après dépôts d'hexaméthylsilazane, de résine photosensible (AZ 5214) de $0,5 \mu\text{m}$ d'épaisseur, insolation et développement (MIF 726). La lithographie représente des zones circulaires ouvertes de $500 \mu\text{m}$ de diamètre.

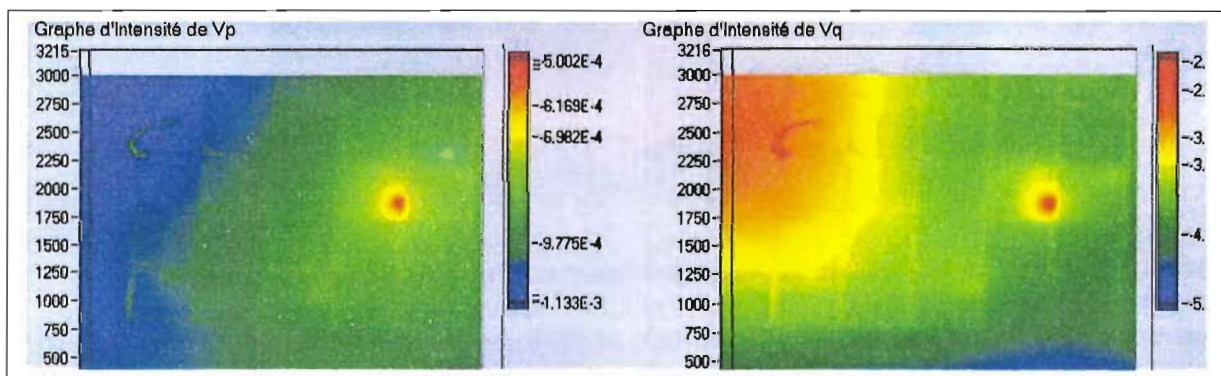


Figure 2.1-4 : Cartographies d'impédances électrochimiques d'un échantillon type n, recouvert de micro-puits de $400 \mu\text{m}$ de côté, réalisés par stéréolithographie laser, avec de la résine SU-8 (Albrespy, DEA 1998). La cartographie a été réalisée sur $3 * 3 \text{ mm}$, avec un pas de $20 \mu\text{m}$, soit 22500 points de mesure.

Sur les figures présentées, nous pouvons observer que la résolution obtenue est proche de la résolution optique du banc de mesures (20 μm), ce qui valide les mesures d'impédances optoélectrochimiques à l'échelle microscopique. Par contre, sur la figure 2.1-4, nous constatons que les substrats de silicium oxydés présentent une grande hétérogénéité, qui, à l'échelle de cette cartographie (3 * 3 mm), est nettement visible. Sur ces images, les impédances étant représentées en fausses couleurs, les dégradés de l'ordre de plusieurs millimètres, tout comme la tache rouge de diamètre 250 μm , correspondent à deux types de défauts, une dérive spatiale liée à l'épaisseur de la couche d'oxyde et un défaut ponctuel.

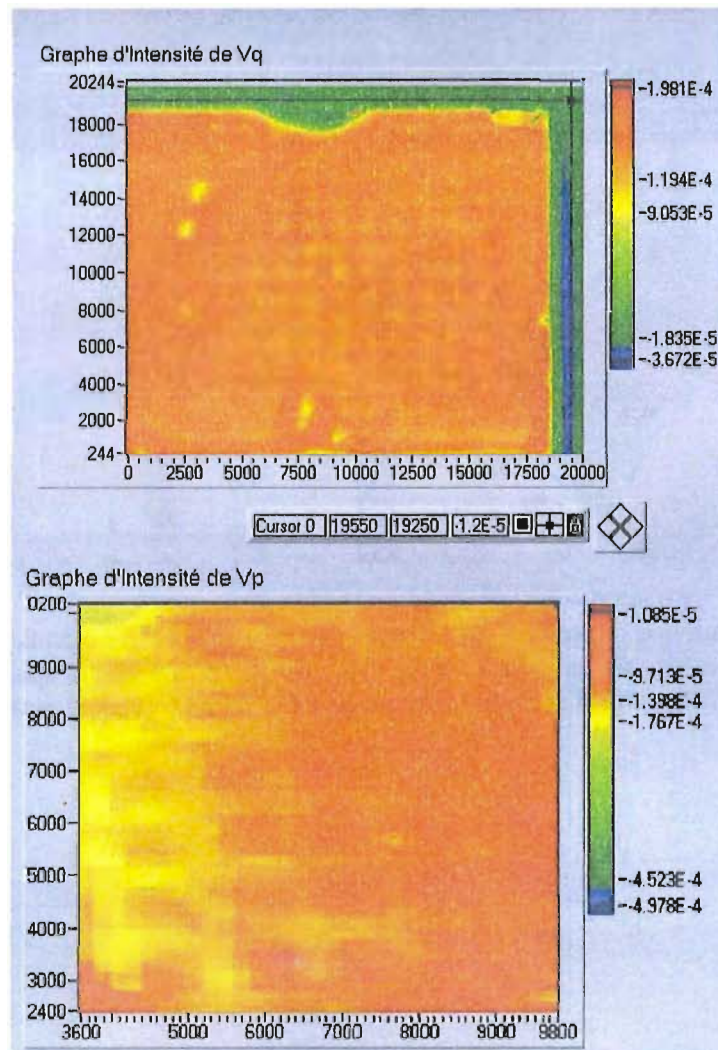


Figure 2.1-5 : Cartographies d'impédances électrochimiques d'un échantillon fonctionnalisé par micro-tamponnage avec de l'OTS (voir C.4). Le motif représente des carrés de 940 μm de côté, recouverts par l'OTS ; la périodicité du réseau étant de 1250 μm . (résolution d'une puce à 1024 plots).

Cette expérience constitue aussi un test de sensibilité, car le dépôt d'OTS est généralement formé d'une monocouche, qui n'est pas toujours parfaitement organisée par cette voie de dépôt. De plus la molécule d'OTS n'est pas chargée. Elle ne peut donc être détectée que par des effets capacitifs liés à la constante diélectrique de la couche. On observe des modifications de surface de la structure EDS : on discerne les zones fonctionnalisées à l'OTS (en rouge) des zones de silice nue (en jaune).

Ces expériences montrent la sensibilité et la résolution spatiale du montage d'impédance électrochimique à l'échelle microscopique.

2.1.1 Le silicium poreux

Les échantillons de silicium poreux se prêtent aux caractérisations par mesures d'impédances électrochimiques (Shen 1994). On retrouve des caractéristiques proches de celles des substrats bruts. Ainsi, nous avons étudié le comportement d'un substrat poreux sur silicium de type n préparé, après prétraitement à la solution piranha, par dissolution anodique. Nous avons testé la tenue d'un substrat poreux plongé dans une solution de tris 10 mM et NaCl 50 mM pendant 5 jours (Substrat de type n, 20 mA/cm² pendant 6 minutes, puis oxydé thermiquement à 500°C pendant 2 heures).

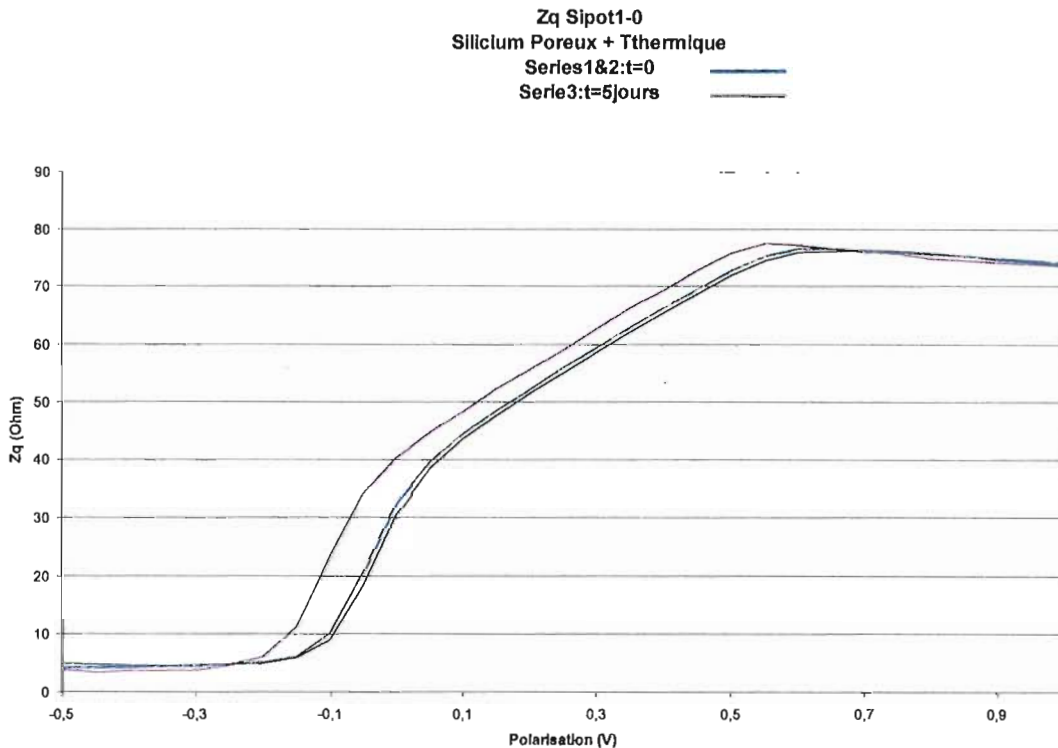


Figure 2.1.1-1 : Impédance électrochimique en quadrature d'un échantillon de silicium poreux type n.

La figure 2.1.1-1 présente les courbes de l'impédance en quadrature en fonction du potentiel de polarisation au début de l'expérience (courbes bleues) puis au bout de 5 jours (courbe violette). Les caractéristiques obtenues sont comparables à celles des échantillons bruts.

Les substrats de silicium poreux de type n oxydé ne présentent pas plus de défauts que les substrats bruts (à l'échelle de la cartographie de la figure 2.1.1-2) ; nous avons donc procédé à leur fonctionnalisation au CDSUM et au greffage d'un amino-espaceur permettant d'initier la synthèse d'ADN. Après avoir réalisé plusieurs synthèses localisées, nous avons effectué des caractérisations optoélectrochimiques.

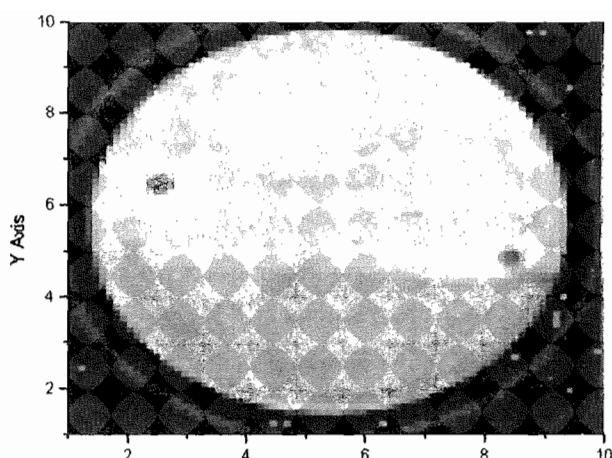


Figure 2.1.1-2 : Silicium poreux silanisé ester, activé et greffé au tris et synthétisé sur quatre plots, après déblocage à l'ammoniaque des oligonucléotides.

On observe, sur la figure 2.1.1-2, la présence des quatre plots de synthèse. La surface des plots diffère très peu du substrat ; seule la trace laissée par le joint d'étanchéité du montage « macro » permet de les distinguer (voir II.2).

Malheureusement, la résistance des substrats poreux n'a pas été suffisante pour poursuivre cette manipulation jusqu'aux essais d'hybridation.

2.1.2 Les différents silanes

La fabrication de puces à ADN robustes, et pouvant fonctionner de façon reproductible, implique la fonctionnalisation des supports ou substrats transducteurs, avant synthèse ou dépôt. Cette fonctionnalisation doit permettre la création de liaisons fortes, de type covalent, entre substrats et oligonucléotides. La couverture de la surface doit être la plus complète et homogène possible, pour maximiser le nombre de sites réactifs pour la synthèse ou l'immobilisation, et pour minimiser l'adsorption non spécifique sur les parties non couvertes de la surface. Cette étape de fonctionnalisation entraîne la modification des propriétés de surface des substrats. Cette modification peut être suivie par des mesures d'impédances électrochimiques, à travers l'étude de la réponse au pH des structures fonctionnalisées. Il est à noter que cette étape engendre fréquemment l'apparition de défauts supplémentaires, dus à l'hétérogénéité de la couverture de la surface. Ils sont visibles en cartographie d'impédance. Lors de la fonctionnalisation des substrats, la formation d'une couche organique dense, en surface des échantillons, isole les groupements silanols, se trouvant à la surface de la silice, de l'électrolyte. La réponse au pH des structures EDS étant liée aux interactions silice – électrolyte, une couverture totale de la surface devrait constituer une couche bloquante et inhiber la réponse au pH de la structure (Diot, Thèse 1984). Le suivi de la réponse au pH des substrats constitue donc une caractérisation intéressante lors de leurs fonctionnalisations.

Substrat & traitements	(n)Si/SiO ₂ + CHCl ₃ + US	Si/SiO ₂ après piranha 10 min	Si/SiO ₂ + Ester (CCl ₄) + 1 h à 105°C	Si/SiO ₂ + OTS + 1 h à 105°C	Si/SiO ₂ + GPTSaq + 1 h à 105°C + HCl 10 min
Réponse au pH (mV/pH)	40	52 (n)Si/SiO ₂ 47 (p)Si/SiO ₂	29	23	31

Substrat & traitements	poreux type n + Traitement thermique (TT)	poreux type n + TT + Ester (CCl ₄) + 1 h à 105°C	poreux type n + TT + Ester (hexane) + 1 h à 105°C	poreux type n + TT + OTS + 1 h à 105°C	poreux type n + GPTSaq + 1 h à 105°C + HCl 10 min
Réponse au pH (mV/pH)	33.5	26.9	24.4	0	22

Figure 2.1.2-1 : Réponses aux variations de pH de différents substrats.

Pour les caractérisations des réponses au pH, nous procédons par l'acquisition des caractéristiques d'un même échantillon dans différents tampons de mesures. Le décalage des caractéristiques selon l'axe des polarisations, en fonction du pH, constitue la réponse de la structure au pH. Quelques exemples de mesures sont donnés dans les figures suivantes.

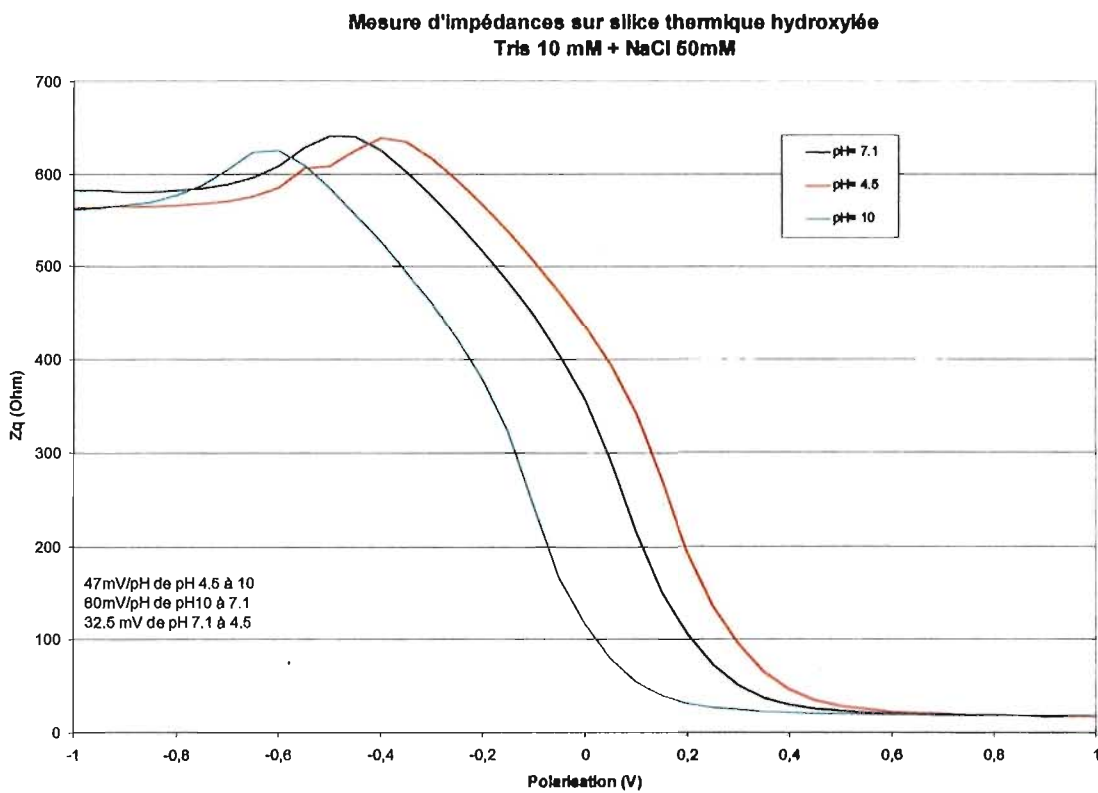


Figure 2.1.2-2 : Réponse au pH d'une structure Si/SiO₂, type p+, après traitement piranha.

Mesures d'impédances en fonction du pH
sur silicium poreux type n 20mA*6min
Tris 10mM + NaCl 50mM

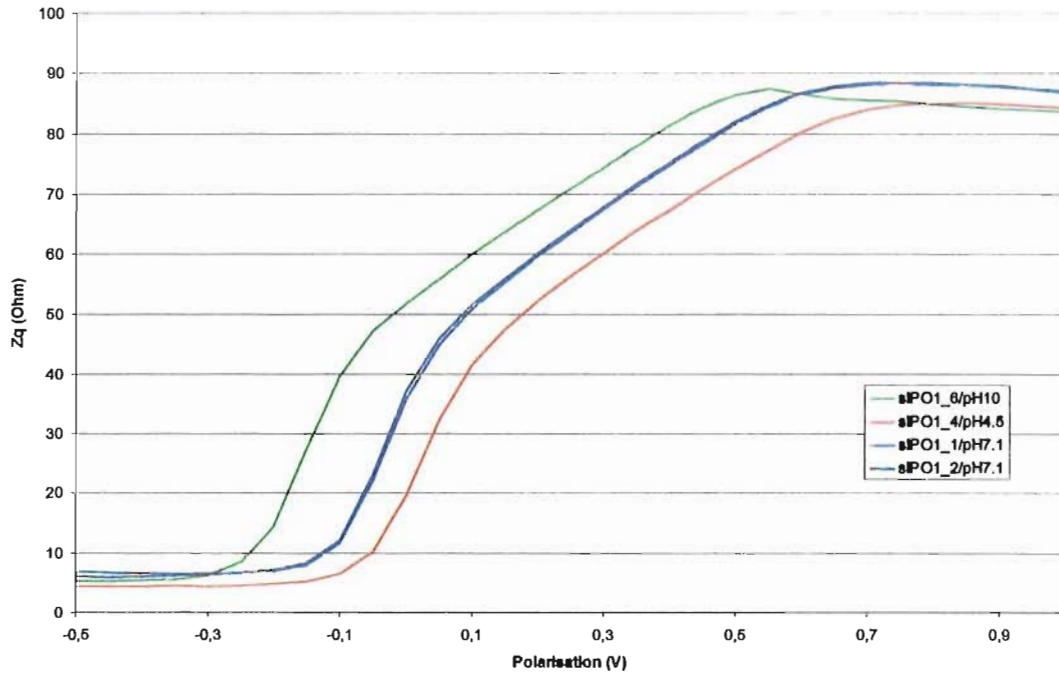


Figure 2.1.2-3 : Réponse au pH d'une structure Si/SiO₂/Silicium poreux n.

Les réponses au pH de la structure comprenant du silicium poreux n (Figure 2.1.2-3) sont de : 123 mV de pH=10 à pH=7,1, 61,5 mV de Ph=7,1 à pH=4,5. Soit 33,5mV/pH de pH=4,5 à pH=10, ou 42,4 mV/pH de pH=10 à pH=7,1 et 23,7 mV/pH de pH=7,1 à pH=4,5.

Caractéristiques du silicium poreux fonctionnalisé par silane Ester CCl₄
d(V)/d(pH)=113 mV / 4.2 = 26,9 mV/pH

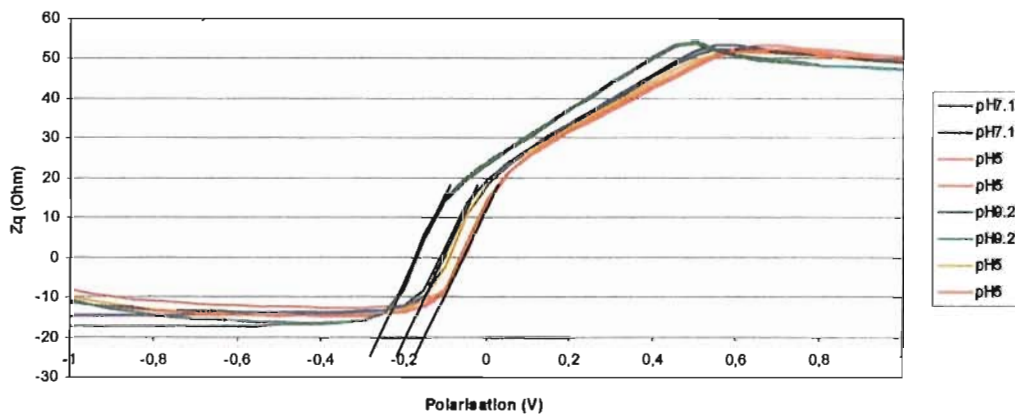


Figure 2.1.2-4 : Réponse au pH d'une structure Si/SiO₂/Silicium poreux n fonctionnalisé par le CDSUM dans le CCl₄.

Mesures d'impédances en fonction du pH sur silicium poreux silanisé Ester (Hexane)

Tris 10 mM + NaCl 50 mM

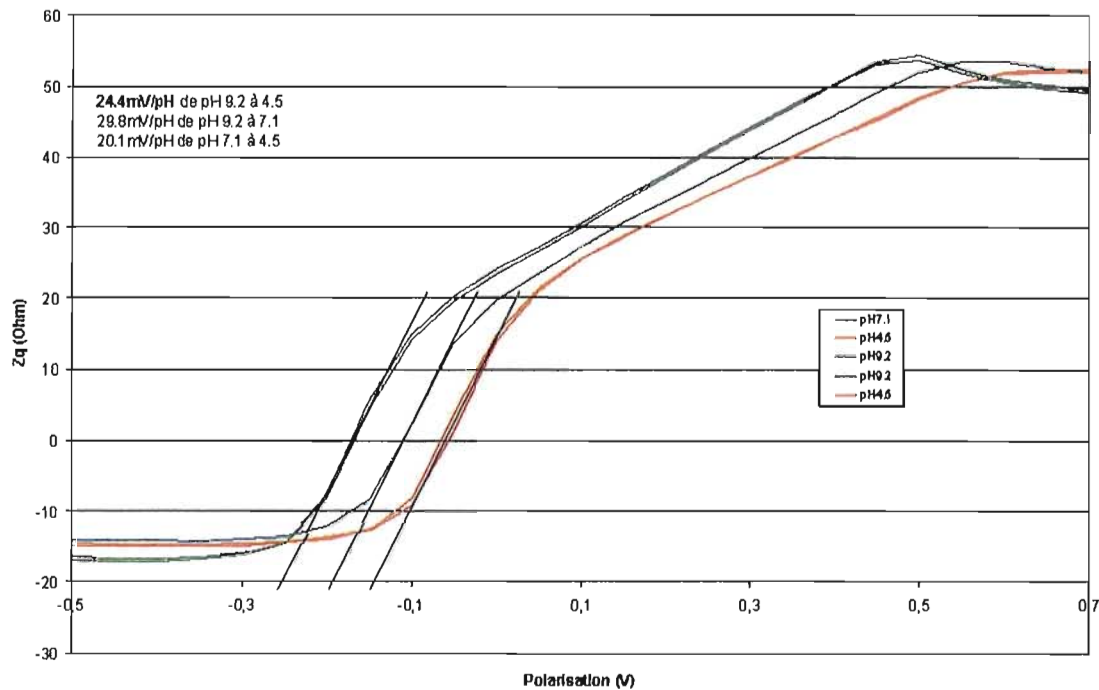


Figure 2.1.2-5 : Réponse au pH d'une structure Si/SiO₂/Silicium poreux n fonctionnalisé par le CDSUM dans l'hexane.

L'aptitude du silicium poreux aux mesures d'impédances prouve également que les pores sont accessibles aux molécules organiques comme les silanes monofonctionnels. Seul le silicium poreux silanisé par l'OTS, qui est un silane trifonctionnel, n'a pas répondu aux variations de pH.

2.1.3 Les dépôts d'ADN sur SiO₂ + hybridation

Pour contrôler la sensibilité de nos structures vis-à-vis de l'ADN, nous avons réalisé des dépôts d'oligonucléotides sur des échantillons de silice hydroxylée à la solution piranha. L'adsorption a été favorisée par séchage des gouttes déposées. Nous avons constaté dans la zone de dépôt un décalage des courbes $V_{ph}=f(V)$ vers les potentiels négatifs, caractéristiques de la présence des oligonucléotides adsorbés à la surface.

- Premier échantillon :

Le premier échantillon a subi le prétraitement à la solution piranha, un rinçage abondant à l'eau, avant d'être séché, pour être monté dans la cellule de mesures et immédiatement recouvert par la solution électrolytique de mesures. La première cartographie présentée a été réalisée à ce stade. Après cela, l'échantillon a été séché puis un dépôt d'oligonucléotides U185 a été effectué avec une micropipette sur une zone circulaire centrale de cet échantillon (figure 2.1.3-1).

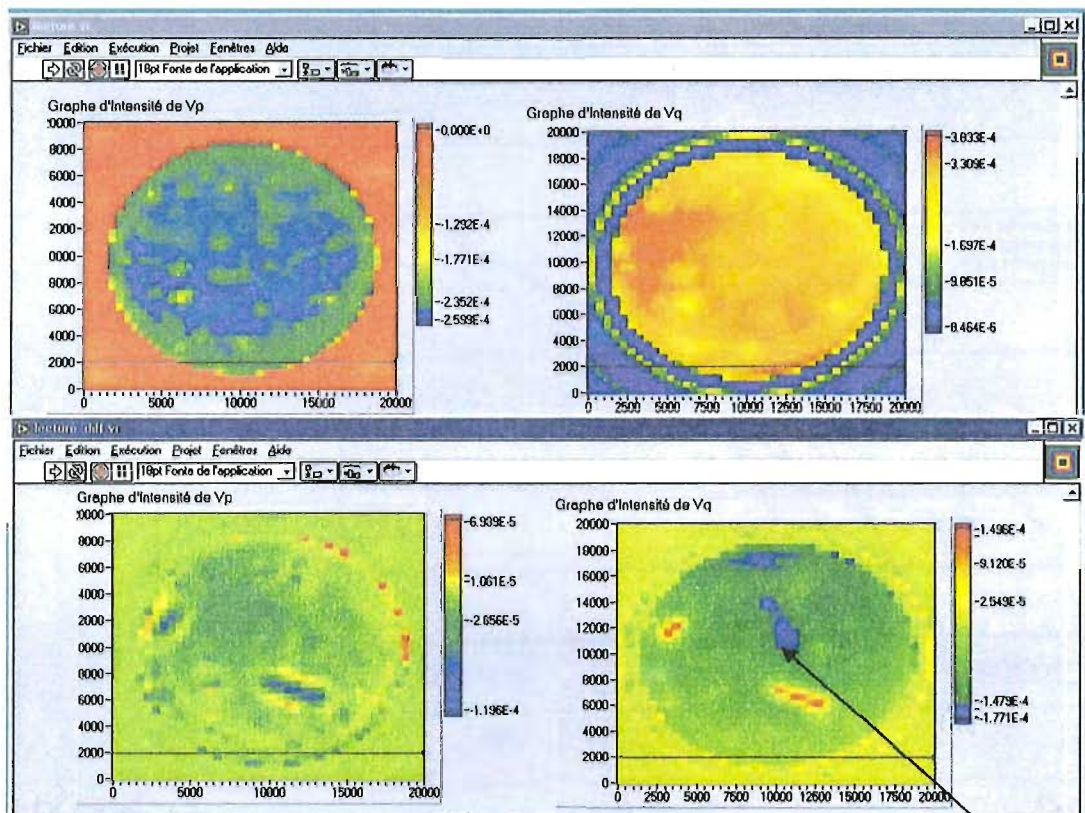
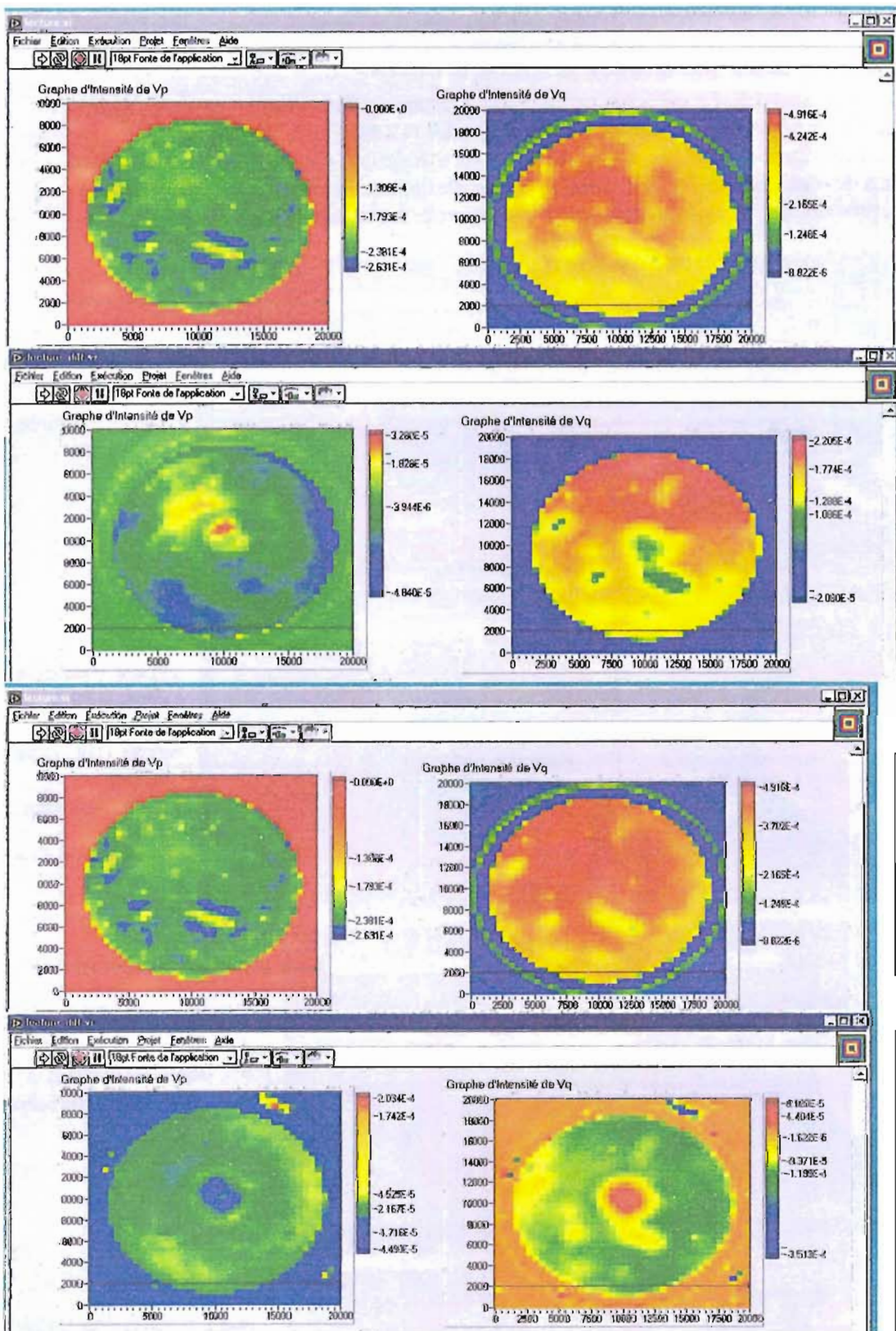


Figure 2.1.3-1

Dépôt U185

La deuxième étape de contrôle de sensibilité nous a amenés à mettre au contact de tout l'échantillon une solution diluée d'oligonucléotides, complémentaires de la séquence préalablement adsorbée localement, puis, après rinçage, à procéder à une nouvelle cartographie dans les mêmes conditions que celles de la figure 2.1.3-1 et à observer les variations de potentiel des courbes $V_{ph}=f(V)$ vers les potentiels négatifs.



Type n + piranha
+ dépôt U185

Cartographie différentielle :
(Type n +
piranha + dépôt
U185)-(Type n
+ piranha +
dépôt U185
+hybridation
L185)

Type n + piranha
+ dépôt U185

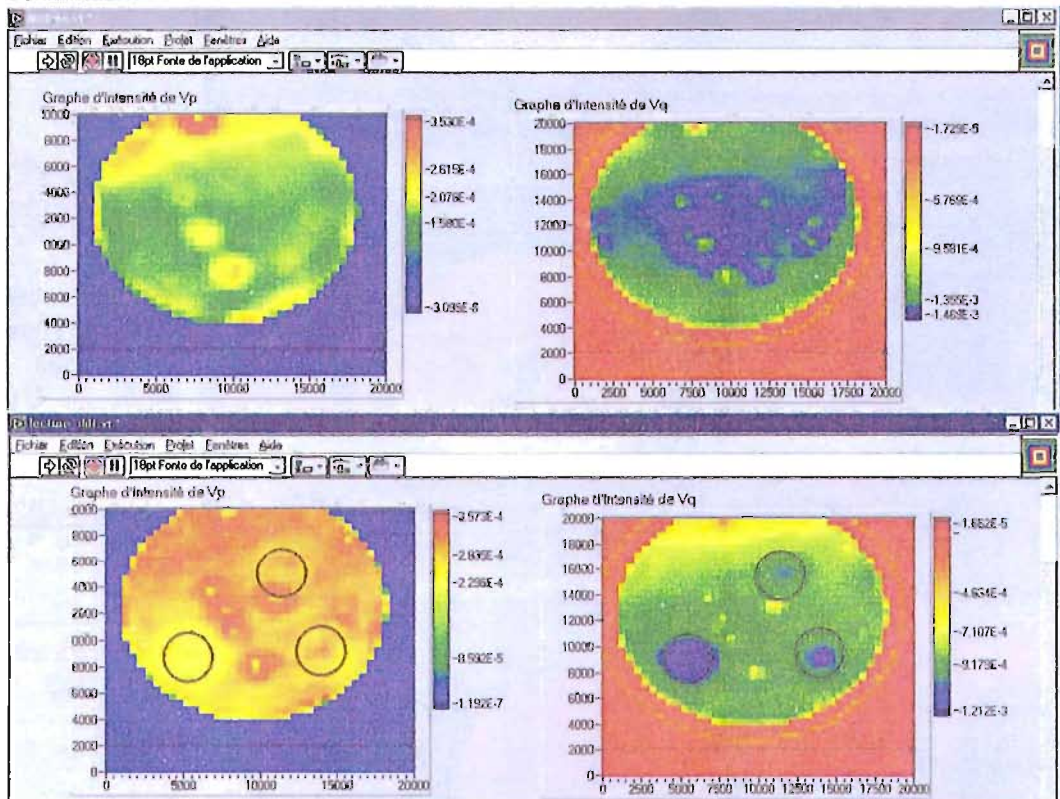
Cartographie différentielle :
(Type n + piranha
+ dépôt U185 +
hybridation I185)-
(Type n + piranha
+ dépôt U185 +
hybridation I185
+dilution du
milieu de mesures
par dix)

Figure 2.1.3-2 Cartographies d'impédances optoélectrochimiques

La figure 2.1.3-2 présente les images de la cartographie du photopotential après l'étape d'hybridation et après une dilution du milieu électrolytique de mesures par dix. L'adsorption d'oligonucléotides sur la surface de silice de la structure EDS est révélée par les cartographies différentielles.

- Deuxième échantillon :

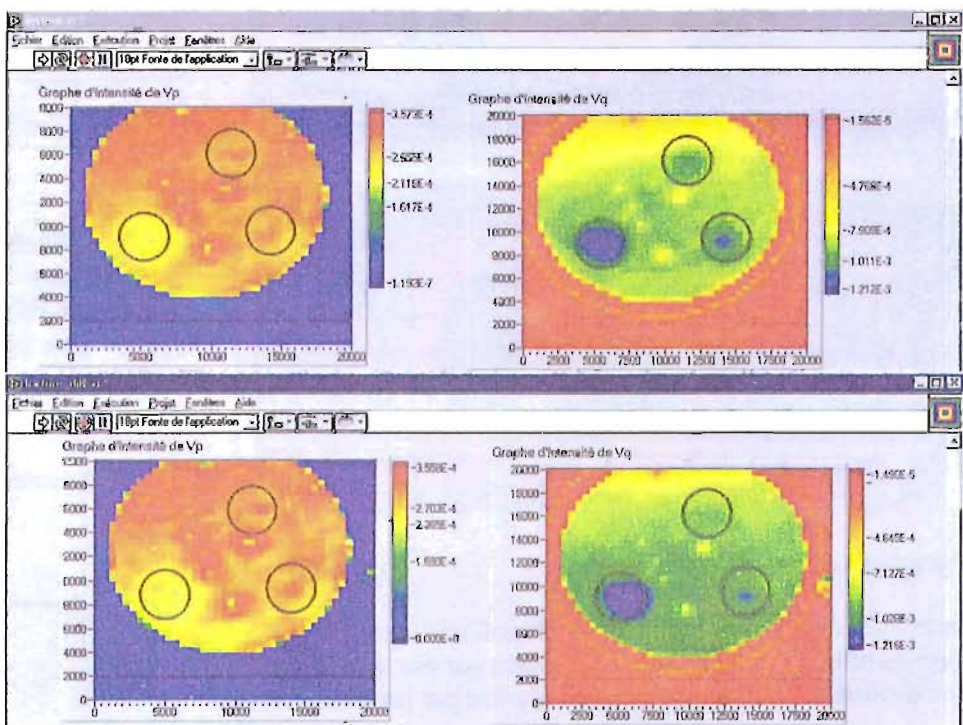
Le deuxième échantillon a subi le prétraitement à la solution piranha, un rinçage abondant à l'eau, avant d'être séché pour être monté dans la cellule de mesures et immédiatement recouvert par la solution électrolytique de mesures. La première cartographie présentée a été réalisée à ce stade. Après cela, l'échantillon a été séché, puis trois dépôts d'oligonucléotides (U185, L185, U226) ont été effectués avec une micropipette sur des zones circulaires de cet échantillon (figure 2.1.3-3). Enfin nous avons mis au contact de tout l'échantillon une solution diluée d'oligonucléotides, complémentaires de la séquence, puis, après rinçage, nous avons procédé à une nouvelle cartographie dans les mêmes conditions.



Type n + piranha

Type n + piranha +

- dépôt L185 (à gauche)
- dépôt U185 (haut droite)
- dépôt U226 (bas droite)



Type n + piranha +

- dépôt L185 (à gauche)
- dépôt U185 (haut droite)
- dépôt U226 (bas droite)

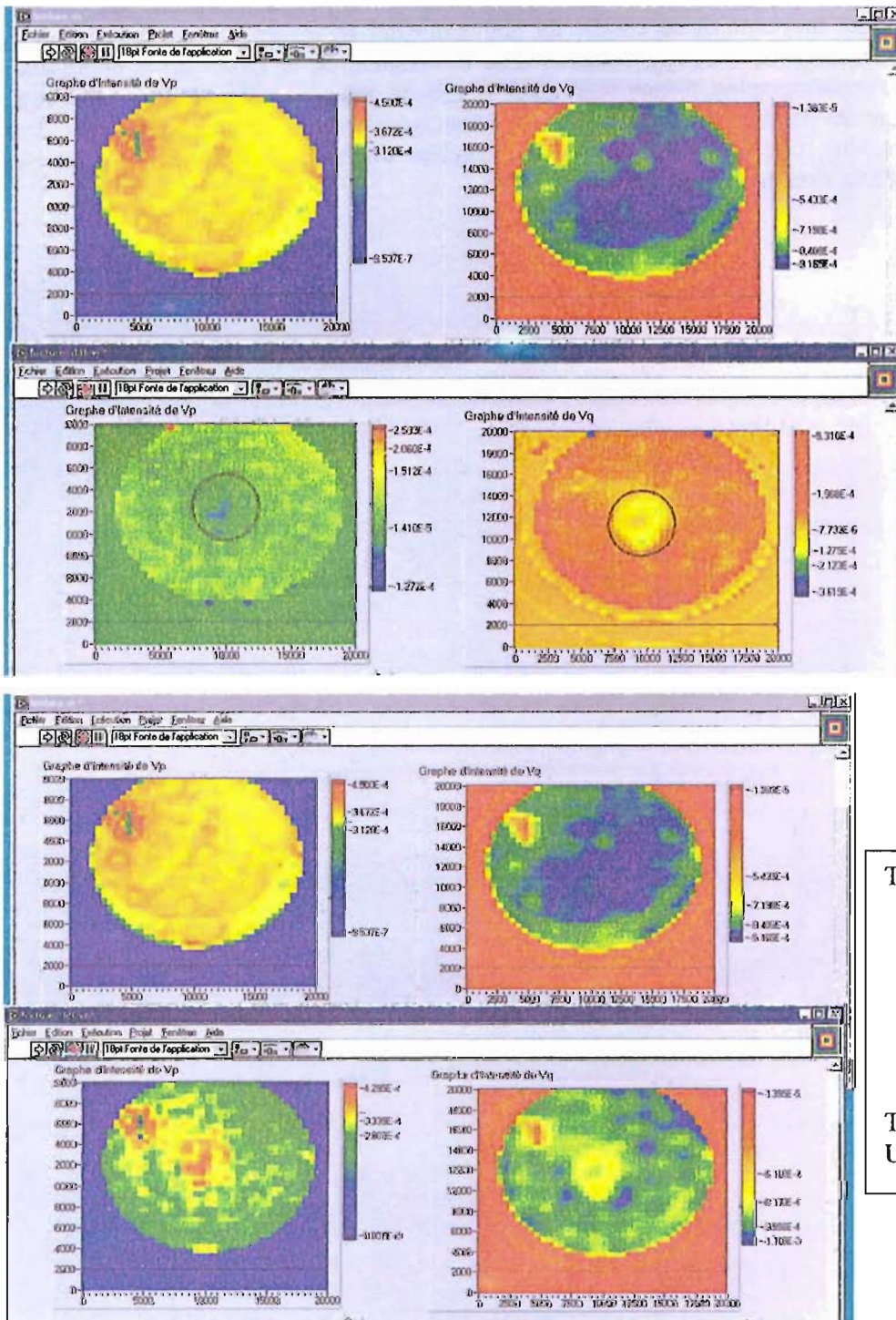
idem+hybridation U185
(complémentaire du L185)

Figure 2.1.3-3 Cartographies d'impédances optoélectrochimiques du deuxième échantillon.

Sur les cartographies à potentiel de polarisation constant, la zone de dépôt est caractérisée, par rapport au reste de l'échantillon, par des valeurs de photo-potential plus faibles pour les substrats de type p, plus forts pour les substrats de type n. Cela provient du décalage du potentiel de bandes plates du semiconducteur vers les potentiels négatifs lié à l'apport des charges négatives apportées par les oligonucléotides cibles fixés à la surface. Les valeurs du décalage en potentiel peuvent être évaluées en connaissant la pente moyenne de la courbe du photopotential en quadrature en fonction de la polarisation de la structure, $V_q = F(V_p)$, mesurée dans le domaine de la valeur de la polarisation imposée au cours de la cartographie. Néanmoins ces décalages de potentiel restent toujours faibles au regard des variations de potentiel apportées par les inhomogénéités des structures. Ils sont donc difficilement observables, même en procédant à une analyse différentielle qui oblige à réaliser, préalablement à l'hybridation, une analyse cartographique.

- Troisième échantillon :

Le troisième échantillon a subi le prétraitement à la solution piranha, un rinçage abondant à l'eau, avant d'être séché pour être monté dans la cellule de mesures et immédiatement recouvert par la solution électrolytique de mesures. La première cartographie présentée a été réalisée à ce stade. Après cela, l'échantillon a été séché puis un dépôt d'oligonucléotide U185 a été effectué avec une micropipette sur une zone circulaire centrale de cet échantillon (figure 2.1.3-4)



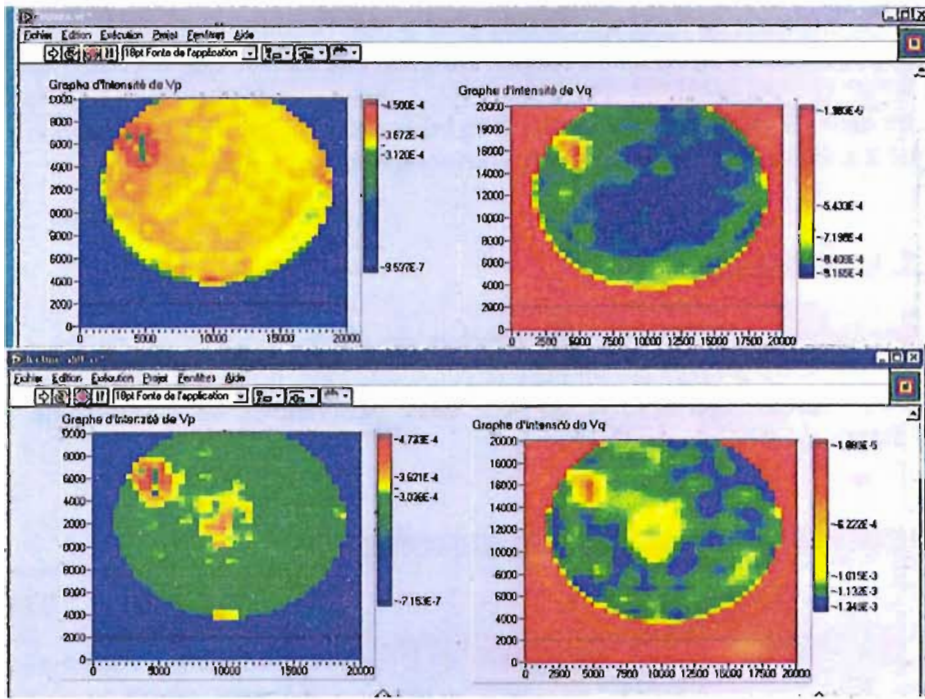
Type n +piranha

Type n + piranha + dépôt U185

Type n +piranha

Type n +piranha +dépôt U185 +Hybridation L185

Figure 2.1.3-4 : Cartographie d'impédances optoélectrochimiques du troisième échantillon.

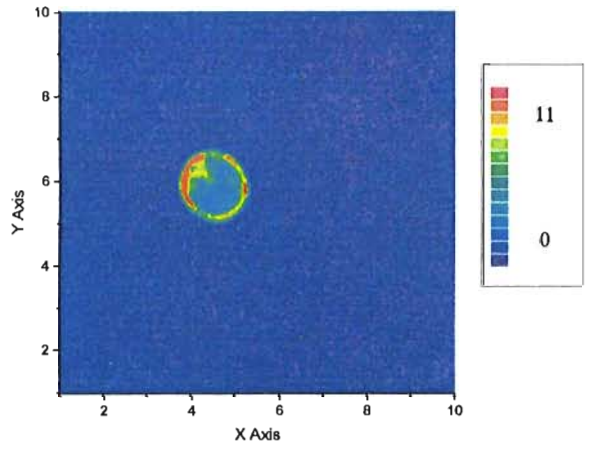


Type n + piranha

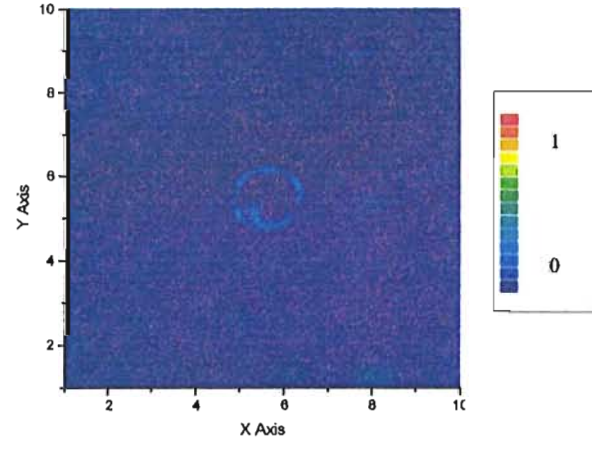
Cartographie différentielle :
 (piranha)-(dépôt + hybridation)

Figure 2.1.3-5 : Cartographie d'impédances optoélectrochimiques du troisième échantillon.

Ces trois contrôles permettent de valider la sensibilité des substrats non fonctionnalisés. Afin de vérifier si le processus d'hybridation était effectif sur le troisième échantillon, nous avons réalisé une caractérisation par cartographie de fluorescence.



Adsorption de U185 puis hybridation 1 nuit dans le tris 10mmol/ NaCl 500mmol avec L185Cy3 : mesure d'optoelectronique puis de fluorescence



Dénaturation NaOH 2 min puis H2Oup 1 nuit

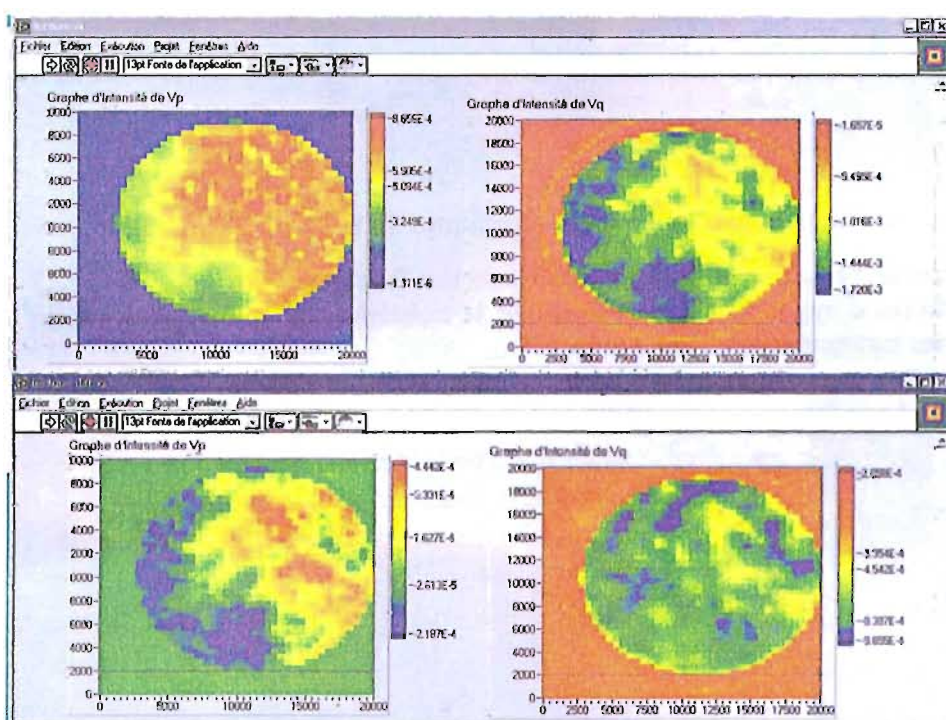
Figure 2.1.3-6 Cartographies de fluorescence sur l'échantillon pour vérifier la présence des oligonucléotides marqués au CY3 sur l'échantillon.

La figure 2.1.3-6 montre que l'hybridation de l'oligonucléotide cible a bien lieu sur le plot supportant l'oligonucléotide sonde avec le protocole d'hybridation adopté. De plus, elle montre que le processus de dénaturation est efficace.

Il est donc vraisemblable que dans l'expérience précédente, l'hybridation de la sonde a bien eu lieu mais que ce processus n'apporte aucun effet observable sur les cartographies de photopotential.

2.1.4 Les dépôts d'ADN sur silane + espaceurs

Les dépôts et l'adsorption d'oligonucléotides sur des couches de silanes organisées, du type SAM's, greffées avec un amino-espaceur du type amino-poly-oxyde d'éthylène, n'ont pas entraîné de décalage de potentiel dans les courbes $V_{ph}=f(V)$ et ne sont donc pas visibles en cartographie d'impédance optoélectrochimique.



Echantillon type n fonctionnalisé par le CDSUM, hydrolysé, activé, puis greffé par un amino-espaceur (H_2N -POE)

Cartographie différentielle :
 (Echantillon fonctionnalisé)
 –(Echantillon fonctionnalisé + dépôt U185)

Figure 2.1.4-1 : Cartographie d'impédances optoélectrochimiques.

- L'échantillon a évolué au cours du temps mais le plot de dépôt d'oligonucléotides n'apparaît pas.
- Soit la couche silane greffée H_2N -POE ne permet plus à la structure EDS de répondre à l'apport de charges, par effet d'écran ou par éloignement de la surface (Stahlberg 1995, [7]).
 - Soit la surface ne permet pas ou très faiblement l'adsorption des oligonucléotides.

Sur le GPTSaq hydrolysé en diol par HCl 0,1 M pendant 10 minutes après synthèse et déblocage, nous avons pu observer par mesures d'impédances macroscopiques, les effets de l'hybridation de séquences de 15 bases de long (656 et 654) et de la dénaturation des duplex.

Suivi d'hybridation
Sith1 GPTSaq+HCl+656+NH4OH
Hybridation : oligo 654 à 18 µg/ml dans TRIS 10mM +NaCl 50 mM
Dénaturation NaOH 0.1M

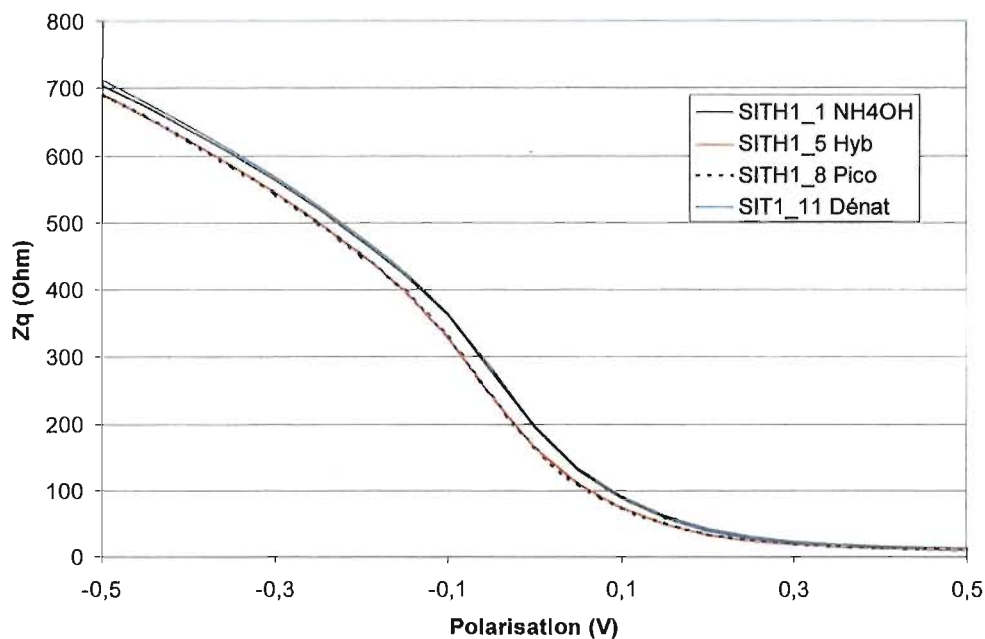


Figure 2.1.4-2 : Suivi d'hybridation sur une structure EDS fonctionnalisée.

Sur la figure 2.1.4-2, la réponse à l'hybridation s'est traduite par un décalage de 20 mV de la caractéristique en quadrature de l'échantillon, alors qu'après dénaturation et mise en équilibre de l'échantillon dans le Tris, la structure a retrouvé ses caractéristiques initiales.

Nous avons renouvelé cette expérience sur un échantillon similaire, mais en hybridant des brins d'ADN de 1500 bases de long, obtenus par PCR.

Suivi d'hybridation PCR sur SiO2 thermique
GPTSaq+HCl+Synthèse 656+NH4OH
Hybridation : fragment PCR 654 0.09 nmol/ml 1,5 kB

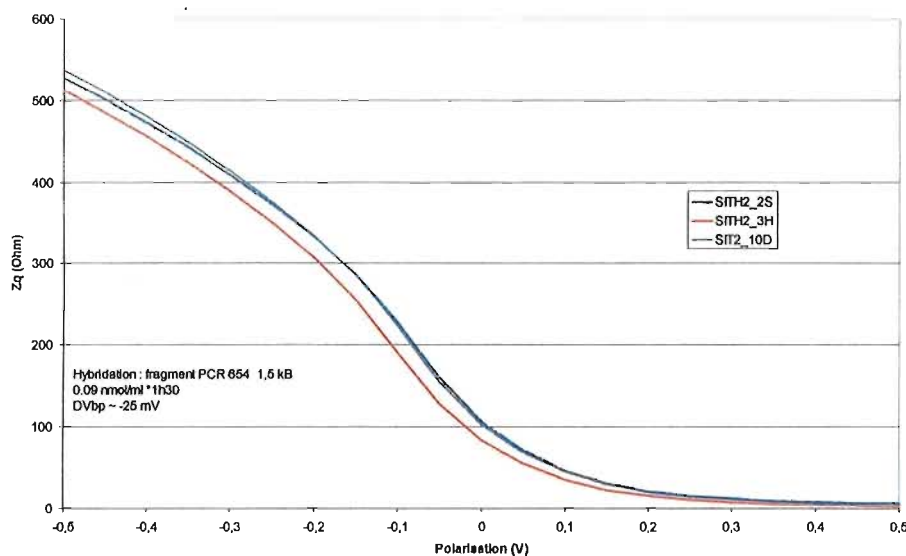


Figure 2.1.4-3 : Suivi d'hybridation PCR sur une structure EDS fonctionnalisée.

Sur la figure 2.1.4-3, la réponse à l'hybridation s'est traduite par un décalage de 25 mV de la caractéristique en quadrature de l'échantillon, alors qu'après dénaturation et mise en équilibre de l'échantillon dans le Tris, la structure a retrouvé des caractéristiques proches de celles obtenues initialement.

Nous avons effectué la même préparation pour un échantillon destiné aux mesures optoélectrochimiques, mais en réalisant trois plots de synthèse différents sur l'échantillon : un plot synthétisé de séquence 5C+L185, un deuxième de séquence 5C+U226 et un troisième où les réactifs de synthèse ont circulé mais sans les phosphoramidites (fausse synthèse).

- GPTSaq + HCl 0,1 N * 10 min
 °Plot 1 : L185 + 5C
 °Plot 2 : U226 + 5C
 °Plot 3 : Fausse synthèse
 - A/ Après synthèse
 - B/ Après NH₃conc * 2 h
 - C/ Après Hybridation U185

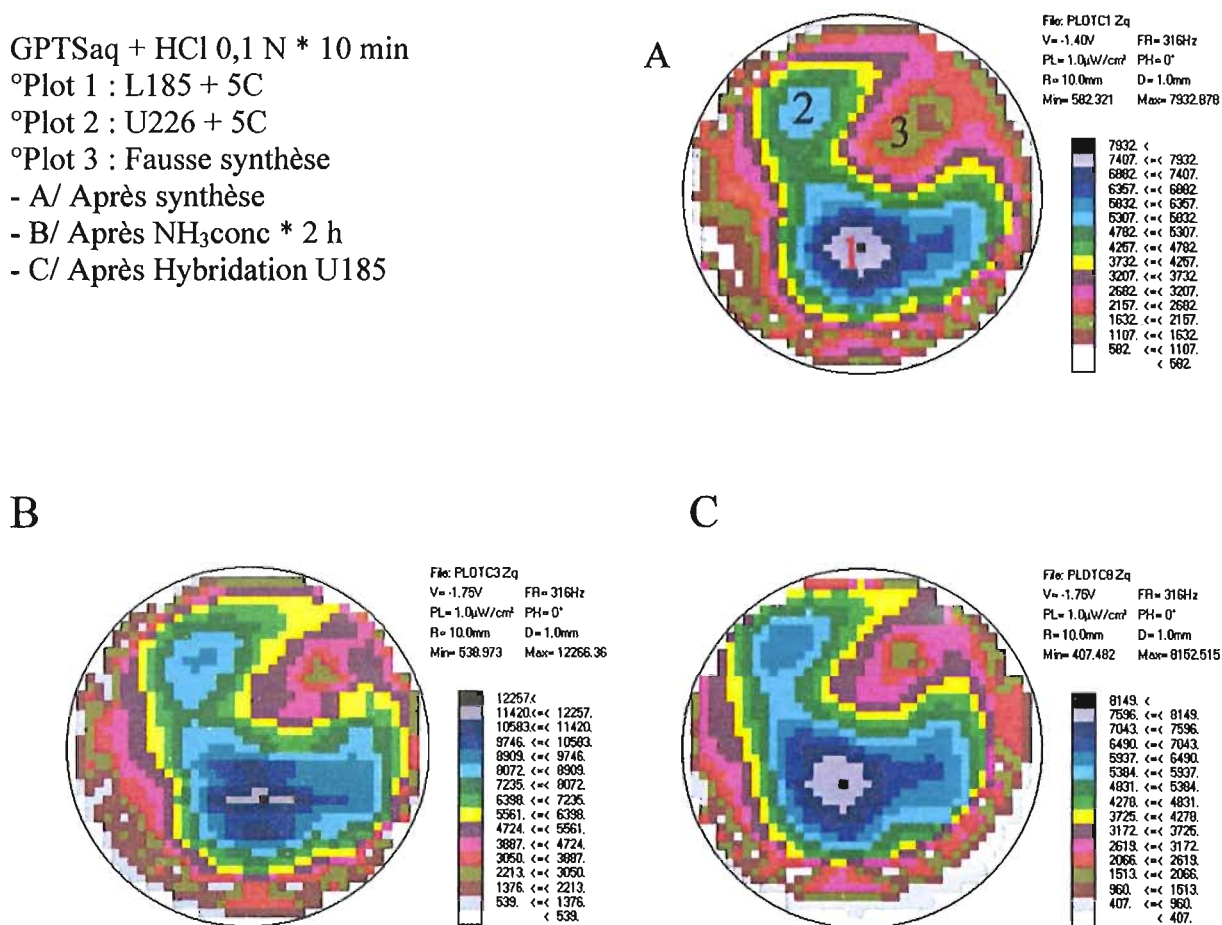


Figure 2.1.4-4 : Cartographie d'impédance optoélectrochimique d'une structure EDS fonctionnalisée.

GPTSaq + HCl 0,1 N * 10 min

°Plot 1 : L185 + 5C

°Plot 2 : U226 + 5C

°Plot 3 : Fausse synthèse

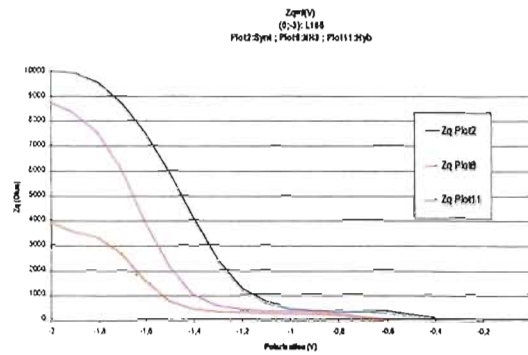
- A/ Après synthèse

- B/ Après NH₃conc * 2 h

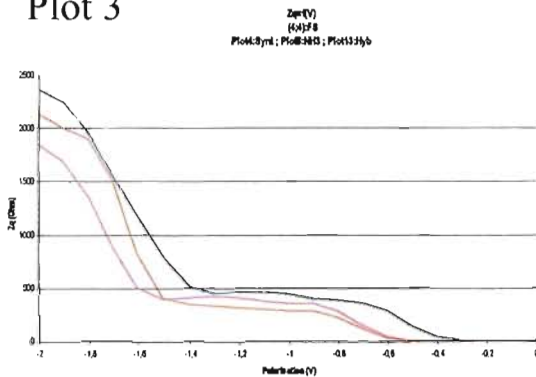
- C/ Après Hybridation U185

Traitement en 1/C2	Plot 1	Plot 2	Plot 3
dV (NH ₃ / Synt) (mV)	-162,8	-191	-100
dV (Hyb / NH ₃) (mV)	-123,9	54	96

Plot 1



Plot 3



Plot 2

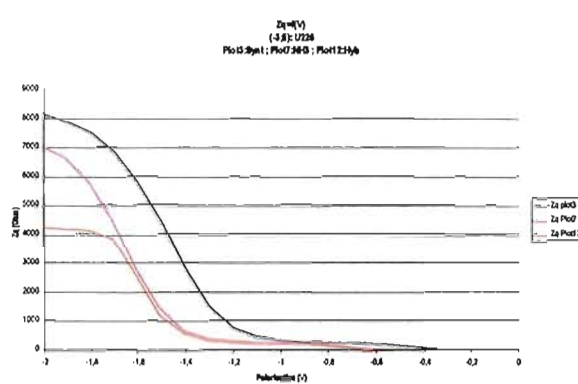


Figure 2.1.4-5 : Caractéristiques de l'échantillon au cours de son utilisation sur le banc de mesures macroscopiques.

Cette fois encore la dégradation de l'échantillon a interrompu l'expérience.

La faible sensibilité au processus d'hybridation constatée, associée au manque de reproductibilité de ces expériences et à la forte hétérogénéité de la qualité électronique des substrats, ne nous ont pas permis d'obtenir, à ce jour, des résultats exploitables.

Les travaux réalisés sur la fonctionnalisation des structures EDS avaient pour principal objectif d'optimiser le taux de greffage, les synthèses et hybridations d'ADN sur nos supports. Les options retenues ont, cependant, eu l'inconvénient d'atténuer la sensibilité des structures aux variations de répartition des charges au voisinage de la structure. Notre démarche nous a amenés à produire des puces optimisées et fonctionnelles pour des lectures par mesures de fluorescence ou de radiomarquage, mais peu favorables à la lecture électrochimique par mesures d'impédances.

Les résultats obtenus sur les expériences de mesures des impédances optoélectrochimiques, nous conduisent à émettre les hypothèses suivantes. Le fait d'immobiliser ou de synthétiser les oligonucléotides sur des couches structurées et parfaitement contrôlées ont, en limitant les processus d'adsorption, conduit à éloigner de la surface, les oligonucléotides cibles et donc les charges qu'ils supportent. D'autre part, l'éloignement des oligonucléotides permet aux contre-ions de s'approcher de la surface et de jouer un rôle d'écran. Ces deux effets complémentaires contribuent à diminuer la sensibilité de la structure aux effets de charges électriques apportées par les oligonucléotides cibles lors du processus d'hybridation.

La connaissance de cette divergence et la maîtrise d'étapes clés de l'élaboration des puces aux niveaux de la chimie de surface, de la multifonctionnalisation, des technologies d'adressage, pourront faciliter et orienter de futurs travaux sur la lecture opto-électrochimique.

Les principales voies à explorer, pour ce faire, seraient :

- les effets de l'incorporation de charges positives dans la couche Silane/espaceur (N⁺, C⁺ ...)

- De limiter l'effet d'écran en diminuant les charges électriques près de la surface, par exemple, en utilisant des sondes PNA.
- les silanes courtes chaînes monofonctionnels avec l'utilisation d'espaceurs courts (défavorables à l'hybridation de longs fragments)
- les silanes courtes chaînes trifonctionnels avec l'utilisation d'espaceurs courts et un « capping » du type triméthylsilane contre l'adsorption.

3 LE SILICIUM POREUX : UTILISATION COMME SUPPORT POUR LES PUCES A ADN

Le silicium poreux présente une grande surface spécifique, parfois accessible, qui favorise l'obtention de concentrations surfaciques importantes. Ces propriétés peuvent être mises à profit pour servir de support à des puces à ADN.

La fonctionnalisation du silicium poreux oxydé est effectuée selon les mêmes protocoles que pour les échantillons plans. Les couches d'accrochage modifient les propriétés des surfaces, et selon le type de ces couches on peut augmenter la résistance des structures poreuses aux agressions externes (Buriak [1]&[2] 1999&1998).

Les échantillons de silicium poreux de type n ont été caractérisés par AFM après l'ensemble des étapes de fabrication d'une puce à ADN.

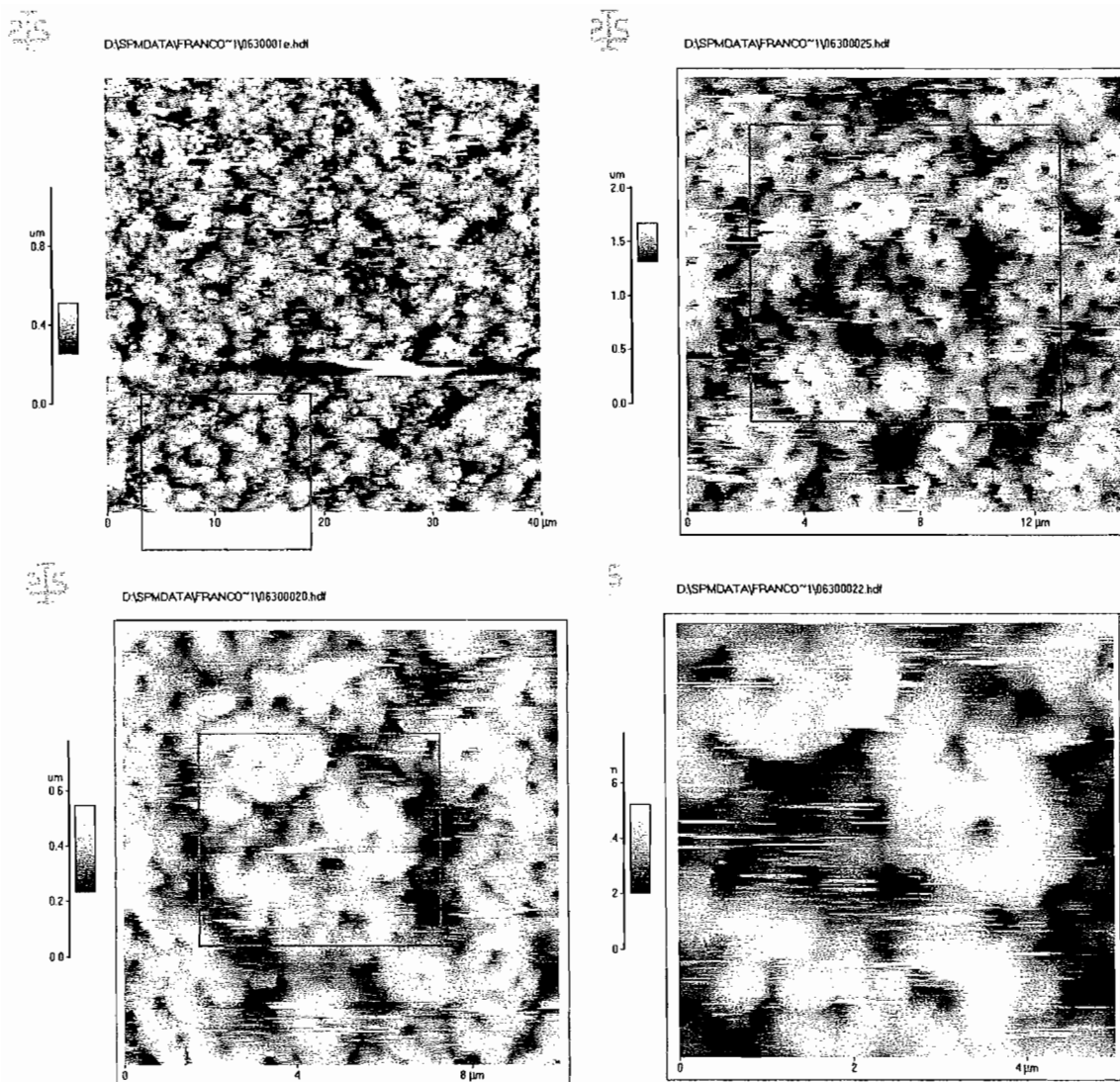


Figure 3-1 : Images de 40, 15, 10 et 5 μm de silicium poreux de type n (20 mA * 6 min) après traitement thermique, silanisation GPTSaq, ouverture des époxydes par HCl 0,1 M, synthèse chimique d'ADN (656) et déprotection à l'ammoniaque concentrée pendant 12 heures.

Sur la figure 3-1, on peut observer dans la couche poreuse deux types de pores : les plus gros de 2 μm de diamètre interne moyen, dans lesquels la pointe AFM peut détecter des profondeurs de 250 à 300 nm. La paroi externe des plus grands pores est constituée de silicium poreux dont le diamètre interne des pores est compris entre 150 et 700 nm. La pointe AFM y détecte des profondeurs allant jusqu'à 200 nm.

En observant l'image de 5 μm , on pourrait penser que la paroi de chacun des petits pores est elle-même composée de structures poreuses de taille inférieure.

L'importante surface spécifique accessible de nos substrats nous a permis de réaliser des caractérisations infrarouge de routine de toutes les étapes de fonctionnalisation, d'activation et de transformation chimique des couches fonctionnelles. La sensibilité de l'appareillage FTIR nexus de Nicolet nous permet d'analyser les échantillons en réflexion spéculaire, en réflexion diffuse, ou en transmission après dissolution du contact ohmique par l'eau régale, grâce à la transparence du silicium dans l'infrarouge.

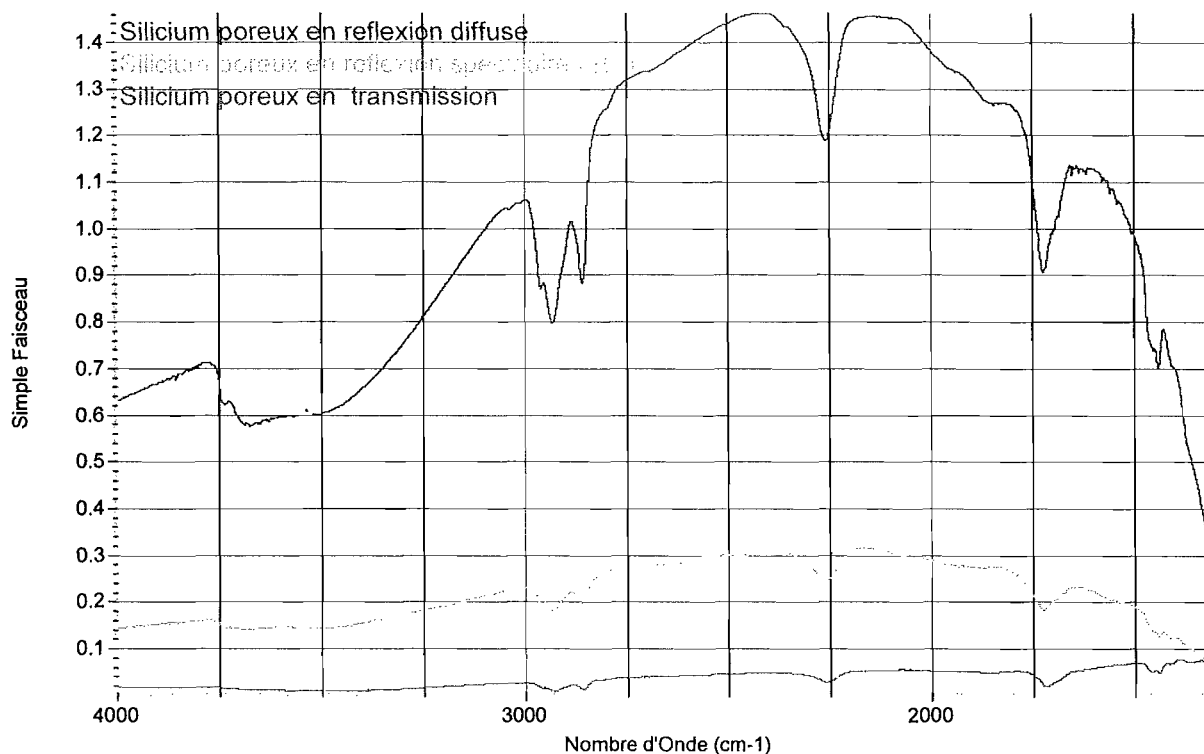


Figure 3-2 : Spectres infrarouge de silicium poreux fonctionnalisé au CDSUM.

La figure 3-2 présente trois spectres infrarouge de silicium p+ oxydé, fonctionnalisé par le chlorodiméthylsilyl undécanoate de méthyle dans CCl_4 à froid, puis recuit à 105°C pendant 2 heures. Ces spectres du même échantillon obtenus en transmission, en réflexion spéculaire et en réflexion diffuse, sont présentés à échelle commune. Ils montrent, d'une part, les bandes C-H des greffons de silane entre 2820 et 2970 cm^{-1} (ν CH_2 et CH_3) et entre 1450 et 1350 cm^{-1} (δ CH_2 et CH_3) ainsi que les pics des carbonyles C=O entre 1750 et 1715 cm^{-1} , et, d'autre part, les bandes de la silice à 2250 cm^{-1} (O-Si-H).

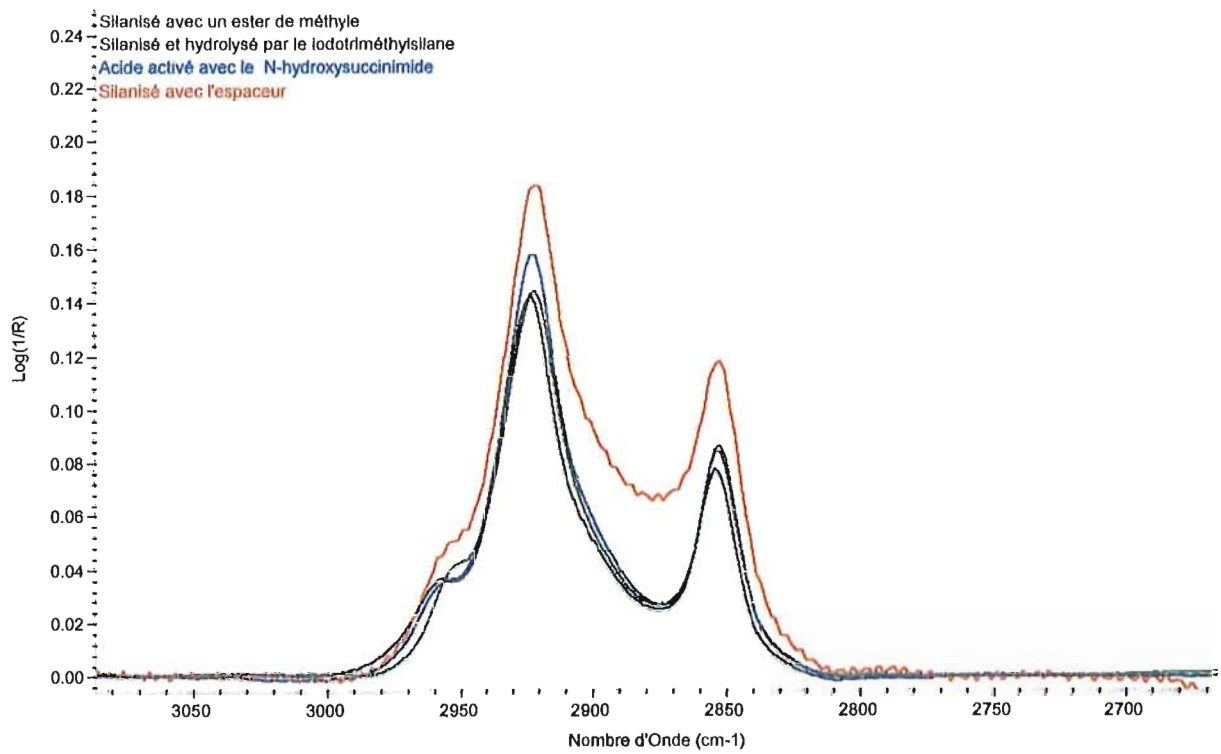


Figure 3-3 : Spectre infrarouge d'un échantillon de silicium poreux p+ oxydé au cours des étapes de fonctionnalisation.

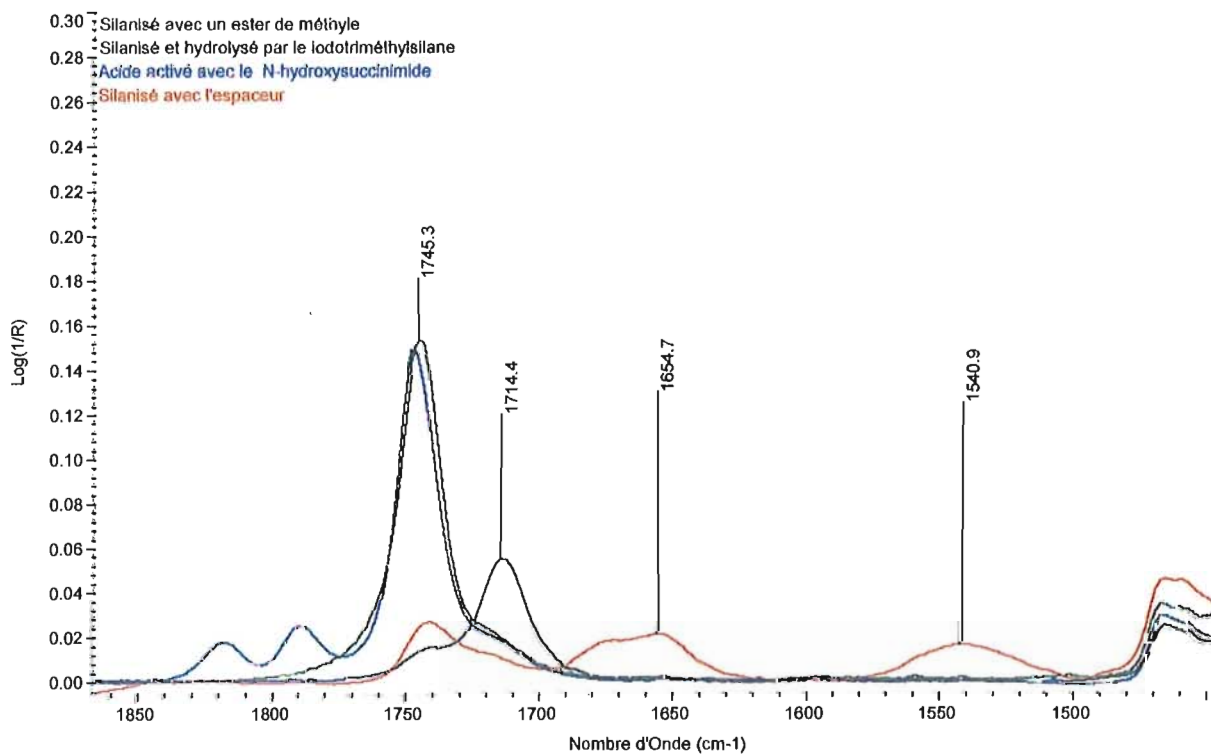


Figure 3-4 : Spectre infrarouge d'un échantillon de silicium poreux p+ oxydé au cours des étapes de fonctionnalisation.

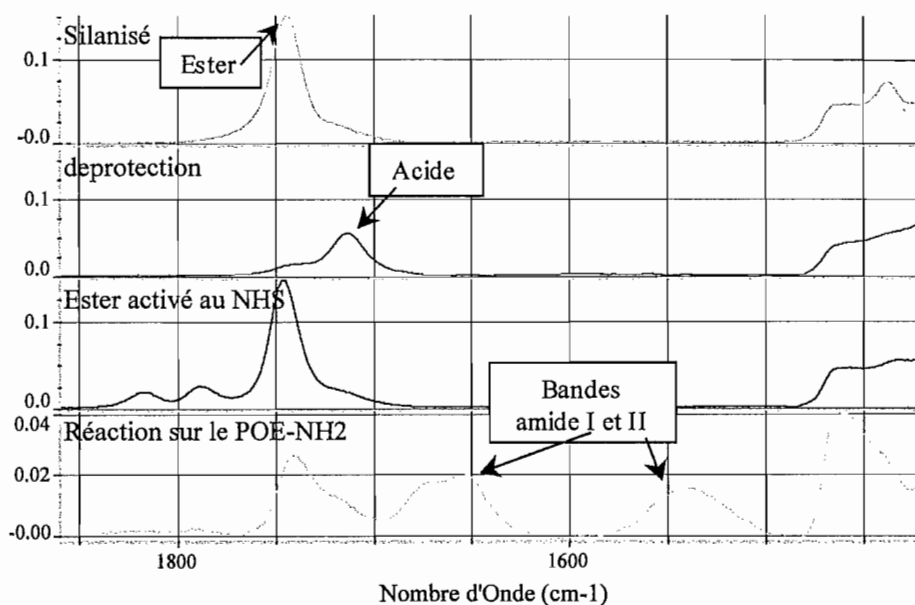


Figure 3-4(bis) : Suivi en infrarouge des bandes carbonyles d'un substrat de silicium poreux oxydé au cours des étapes de fonctionnalisation (silanisation, déprotection de l'ester, activation au NHS et greffage du POE-NH₂).

Les figures 3-4 et 3-3 montrent des spectres réalisés en réflexion spéculaire (15°) sur silicium poreux p+ silanisé. On voit l'ensemble des étapes de l'élaboration du support. La figure 3-3 présente l'évolution des bandes C-H. On constate l'augmentation des pics C-H après greffage du H₂N-POE, ce qui est normal en raison de l'apport important de matière. Sur la figure 3-4, la déprotection de l'ester de méthyle n'est pas totale et laisse apparaître un petit pic ester à 1730 cm⁻¹ en plus du pic caractéristique de l'acide à 1715 cm⁻¹. L'activation de la fonction acide se caractérise par les trois pics des hétéroesters (1820, 1790 et 1750 cm⁻¹). Après réaction sur le POE-NH₂ il est possible de caractériser la réaction de l'amine sur l'acide activé par les deux bandes à 1650 et 1535 cm⁻¹ correspondant aux bandes amides I et II. Ces bandes amides prouvent le caractère covalent du greffage. Cependant il reste un pic à 1730 cm⁻¹ avec un épaulement à 1715 cm⁻¹.

Lors de l'activation au NHS l'épaulement à 1715 cm⁻¹ indique que toutes les fonctions acides n'ont pas été activées.

La réaction d'un amino-alcool (POE-NH₂) sur les acides activés mis au point pour l'immobilisation de brins synthétisés "ex-situ" (Dugas thèse 2001) permet d'apporter en surface les fonctions alcools nécessaires pour la synthèse d'oligonucléotides directement sur le support (voir D.6).

Cette méthode de caractérisation sur silicium poreux, utilisant l'infrarouge, nous a permis d'effectuer un suivi de chaque lot d'échantillons, lors de leur fonctionnalisation, et ainsi de les valider.

Les substrats de silicium poreux restent, même après oxydation thermique, plus fragiles que les substrats en silicium massif. Lors de mesures d'impédances, nous avons pu observer la transformation des couches poreuses. L'échantillon p+, préparé selon le protocole standard (ci-dessus), a été fonctionnalisé avec du GPTS en milieu aqueux puis, après ouverture de l'époxyde par HCl 0,1 M, synthèse d'ADN, déblocage à l'ammoniaque, hybridation (dans du tampon Tris 10 mM et NaCl 50 mM), l'échantillon a subi deux cycles de mesures d'impédance électrochimiques avant démontage et observation. Nous avons pu remarquer visuellement un changement d'aspect de la zone de mesure.



Figure 3-5 : Image de silicium poreux p+, fonctionnalisé, après mesures d'impédances électrochimiques. L'image a été obtenue avec un objectif X 40, filtre polarisant et filtre interférentiel Nomarsky.

La nature géométrique de cette surface (Figure 3-5) nous laisse supposer que cette dégradation est liée à une attaque sélective. La comparaison de ce phénomène avec celui rencontré lors des dissolutions anodiques prolongées (voir figure C.1.4.2-1) nous indique que cette dégradation pourrait être d'ordre électrochimique. Ce phénomène est une limite à l'utilisation du silicium poreux comme substrat modèle pour les études électrochimiques.

Après les réactions de synthèses d'ADN et de déprotection finale des oligonucléotides nous avons pu caractériser la fonctionnalité des structures poreuses par hybridation moléculaire des séquences complémentaires à celles synthétisées. Pour la caractérisation de l'hybridation nous avons utilisé des cibles marquées au $^{32}\text{P}^*$ (Laboratoire d'écologie microbienne des sols, Lyon I, lecture phosphorimageur) ou avec un groupement fluorophore CY3 (lecture banc PLSCAN).

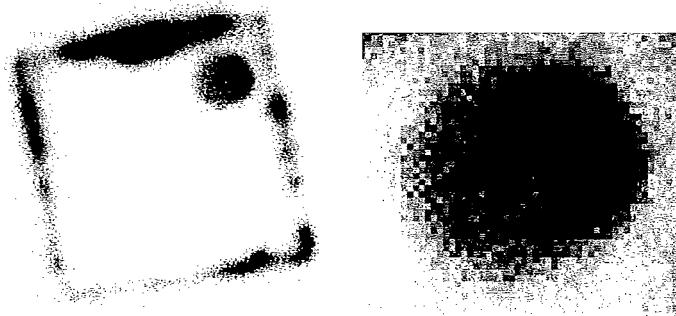


Figure 3-6 : Image d'un échantillon 22*22 mm après fonctionnalisation, greffage POE-NH₂, synthèse de quatre plots (2* L185 et 2* U226), hybridation U185 marqué $^{32}\text{P}^*$.

Sur la figure 3-6, seul un plot sur deux s'avère fonctionnel, l'échantillon avait déjà subi d'autres caractérisations (cycles hybridation / dénaturation) qui ont partiellement dégradé sa surface, les caractérisations par fluorescence de cet échantillon sont présentées ci-dessous :

Hybridation U185-CY3

Hybridation L226-CY3



Figure 3-7 : Images d'hybridation en fluorescence d'un support poreux greffé POE-NH₂ et possédant 4 plots de synthèse in situ.

L'image de gauche représente le signal d'hybridation de la séquence complémentaire du L185.

La figure de droite représente le signal d'hybridation de la séquence complémentaire du U226

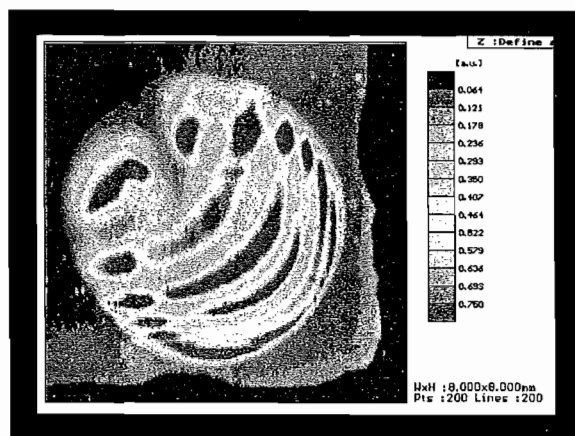
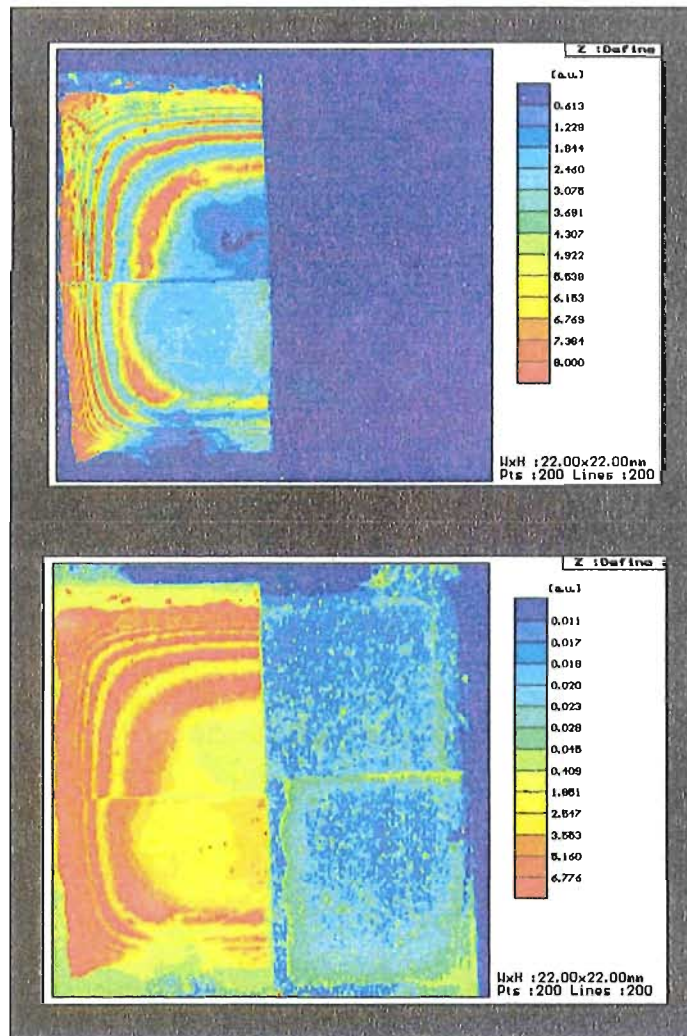


Figure 3-8 : Image à fort grossissement d'une partie de l'échantillon 22*22 mm après fonctionnalisation, greffage POE-NH₂, synthèse de quatre plots (2* L185 et 2* U226), hybridation U185 marqué CY3.

Echelle linéaire
d'intensité de
fluorescence



Echelle par
population
d'intensité de
fluorescence

Figure 3-9 : Image d'un échantillon 22*22 mm après fonctionnalisation, greffage POE-NH₂, clivage de l'échantillon, synthèse sur les quatre morceaux, directement dans les cellules de synthèse du synthétiseur d'ADN (2* L185 et 2* U226), hybridation U185 marqué CY3.

La première image de la figure 3-9 représente la cartographie des quatre échantillons avec une échelle linéaire d'intensité, la deuxième avec une échelle par population pour pouvoir visualiser la réponse non spécifique des morceaux synthétisés U226 (~ 0,03 u.a. par rapport ~ 8 u.a. au maximum des morceaux synthétisés L185).

Sur les cartographies de fluorescence sur silicium poreux p+, on observe une absence d'homogénéité spatiale de la fluorescence, qui part du centre de l'échantillon et forme des franges en direction des bords. Cet effet est attribué à une hétérogénéité de l'épaisseur et de la structure de la couche poreuse, ce qui se traduit par des effets d'interférences. Ceci nous a permis d'envisager l'optimisation des substrats pour les mesures de fluorescence par accord des épaisseurs des couches de silicium poreux ou de silice thermique avec les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation des groupements fluorophores ($e = \lambda/4n$) (voir II.6).

Le silicium poreux présente donc une grande surface spécifique permettant une augmentation des signaux lors d'analyses de surface. Nous avons déterminé les paramètres critiques de la formation des couches poreuses pour notre application. Les résultats sont satisfaisants et nous ont permis de travailler en infrarouge comme par mesures d'impédance. Ils nous ont également amenés à optimiser les caractéristiques des substrats pour les mesures de fluorescence par la prise en compte des effets d'interférences.

4 LECTURE DES PUCES A ADN PAR MESURES DE FLUORESCENCE

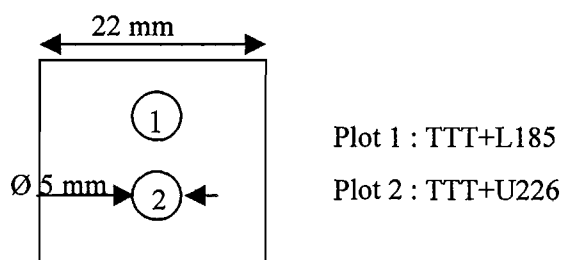
4.1 Etude sur les macropuces – Synthèse in-situ sur H₂N-POE

Nous présentons ci-dessous les résultats de la caractérisation de trois puces élaborées selon les protocoles mis au point au cours de notre travail. Les tests réalisés ont eu pour objectif l'étude de la reproductibilité, de la sélectivité et de la sensibilité des puces vis-à-vis du processus d'hybridation.

4.1.1 Etude de la reproductibilité : puce FVP1

La puce FVP1 a été réalisée sur un substrat de type p, pourvu d'une couche de silice thermique de 15 nm. Après prétraitement à la solution piranha, silanisation avec le chlorodiméthylsilyl undécanoate de méthyle, recuit, hydrolyse de l'ester en acide par le iodotriméthylsilane, activation au NHS et greffage du NH₂-POE, deux plots de synthèse d'ADN ont été réalisés avec le montage « Macro » couplé au synthétiseur « Expedite ».

Plan de synthèse :



La puce FVP1 a été réalisée pour tester le banc de mesures optoélectrochimiques. Elle a été mise en œuvre dans la cellule de mesure d'impédance dans du tampon tris 10 mM additionné de 50 mM de NaCl. Elle y a subi de nombreux cycles de polarisation lors des mesures I(V) (8) et des cartographies (4), au cours desquels une première hybridation U185 a été réalisée. Après démontage et dénaturation, la puce a été utilisée pour une série de mesures de fluorescence. Les hybridations ont été réalisées dans du tampon d'hybridation classique (voir annexe I). Une série de 22 cycles d'hybridation U185 / dénaturation, suivie de mesures de fluorescence, a été réalisée (M. Bras thèse 2001).

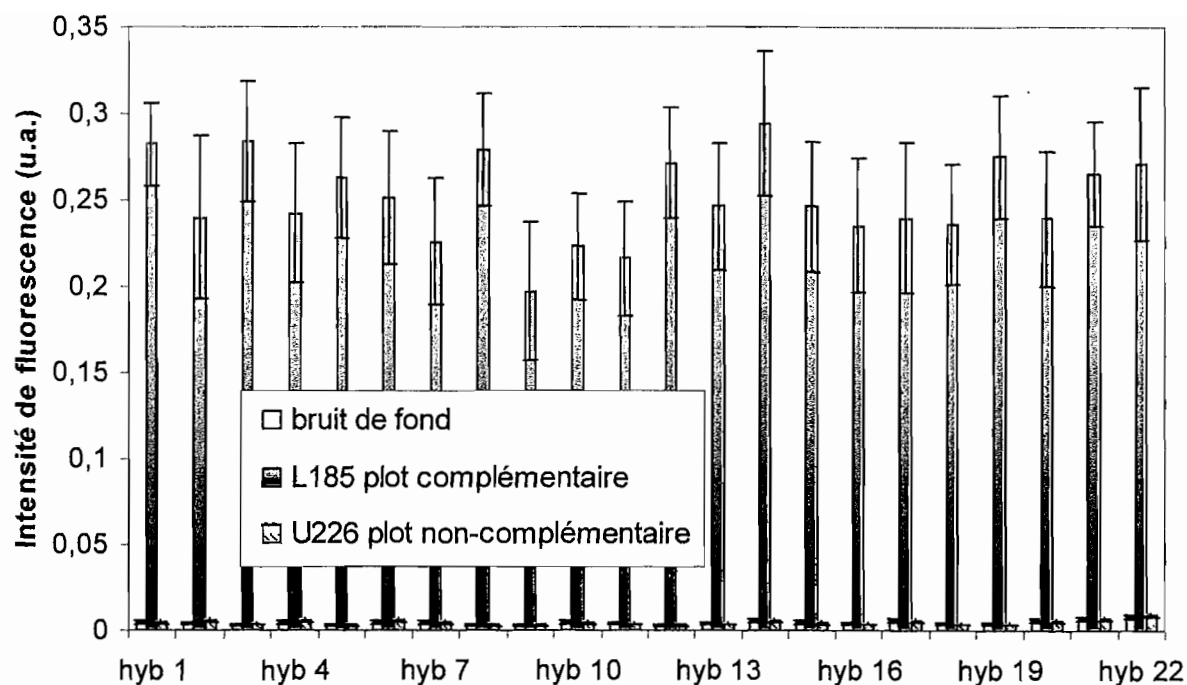


Figure 4.1.1-1 Intensités de fluorescence (u.a.) mesurées sur les deux plots et sur une zone de la puce n'ayant pas subi de synthèse d'ADN, afin de mesurer le bruit de fond.

La figure 4.1.1-1 présente les résultats des mesures de fluorescence obtenues au cours de cycles d'hybridation et dénaturation successifs avec l'oligonucléotide complémentaire de la sonde L185 marqué avec le fluorophore CY3. Pour chaque cycle sont portées les intensités de fluorescence du bruit de fond de la puce en dehors des plots, du signal sur le plot de la sonde complémentaire L185 puis du signal sur le plot non complémentaire U226.

Le rapport du signal complémentaire / non-complémentaire est en moyenne de 54 sur ces 22 hybridations. L'écart type de l'intensité de fluorescence du plot complémentaire représente moins de 10% du signal sur ces 22 hybridations. Il est d'ailleurs probable que cette dispersion des résultats résulte d'une mauvaise reproductibilité, due essentiellement à la non reproductibilité du positionnement de la puce sur le système de lecture.

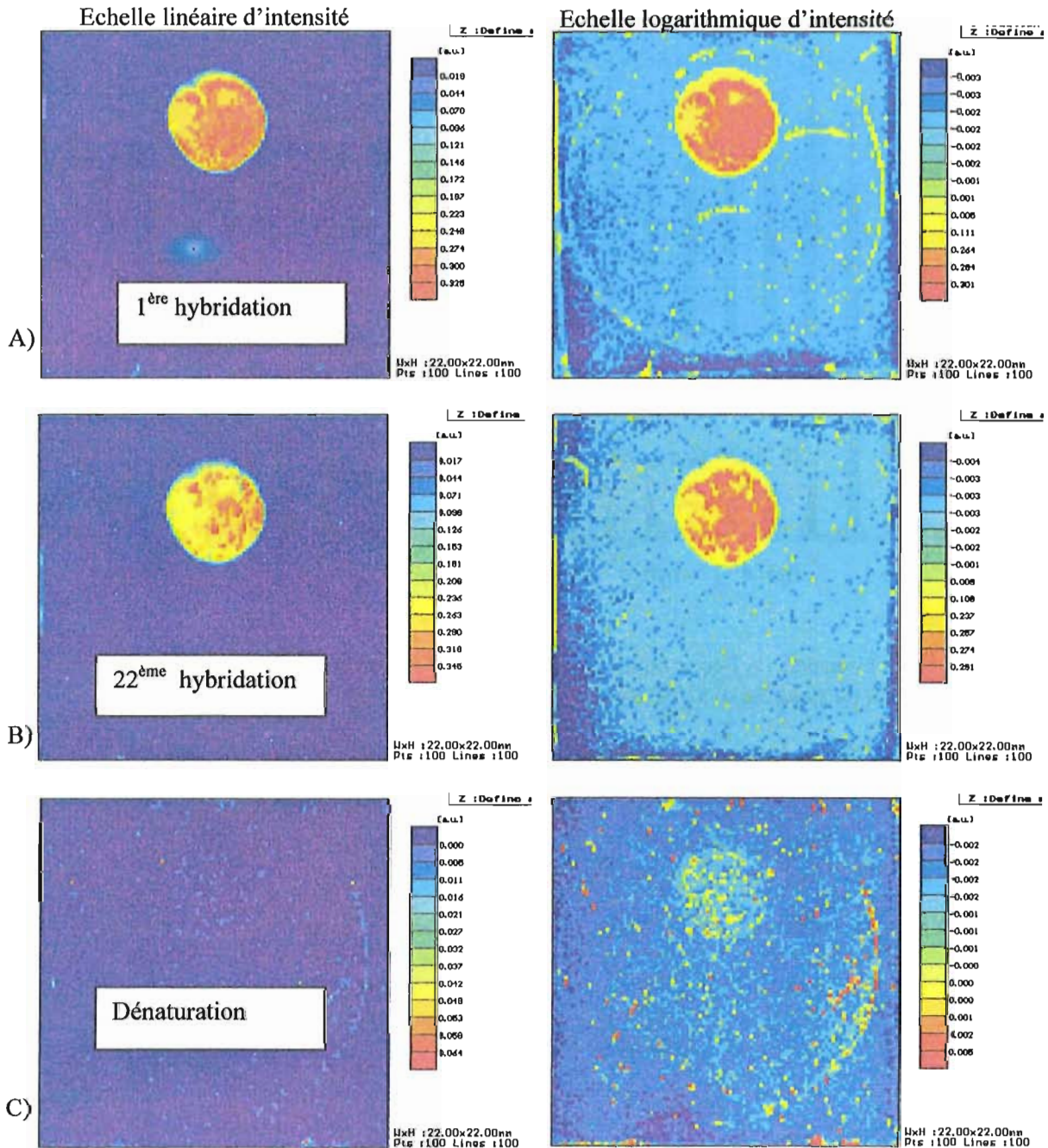


Figure 4.1.1-2 Cartographies de fluorescence de la puce FVP1 (PL = 50 mW)

A) Cartographie de la puce après la 2^{ème} hybridation U185-CY3 30 minutes à 47°C et lavage SSC 2X pendant 30 minutes.

B) Cartographie de la puce après la 22^{ème} hybridation U185-CY3 30 minutes à 47°C et lavage SSC 2X pendant 30 minutes.

C) Cartographie de la puce après une dénaturation NaOH 0,1 M pendant 1 minute.

La représentation en échelle par populations nous permet d'observer la trace du joint torique de la cellule de mesures optoélectrochimiques ainsi que la persistance d'un faible signal après dénaturation.

La figure 4.1.1-2 présente les cartographies de fluorescence, obtenues après hybridation sur la puce FVP1 après la deuxième hybridation, puis après la 22^{ème} hybridation en échelle linéaire sur les images de gauche, et en échelle par classe de population sur les images de droite. Ce dernier mode de représentation permet d'exalter les faibles niveaux de fluorescence. La troisième série d'images présente la puce après l'étape de dénaturation. L'image par classe de population permet de montrer

que la dénaturation n'est pas parfaitement réalisée. L'étape d'hybridation a été réalisée en mettant la puce au contact de 5 ml d'une solution d'oligonucléotides à la température ambiante. Avant la lecture de fluorescence une étape de lavage est réalisée à l'aide d'une solution SSC 2X pendant 30 mn à la température de 47°C, puis la puce est séchée sous flux d'azote.

Cette série d'expériences a duré plus de 22 jours et a pris fin alors que la puce était toujours fonctionnelle. La réutilisation de cette puce, sans perte de signal, montre la robustesse de sa structure. Cette robustesse est due à la formation de liaisons fortes entre la monocouche de silane et la silice, d'une part, et à la formation d'une liaison peptidique entre le silane et l'espaceur porteur de l'oligonucléotide.

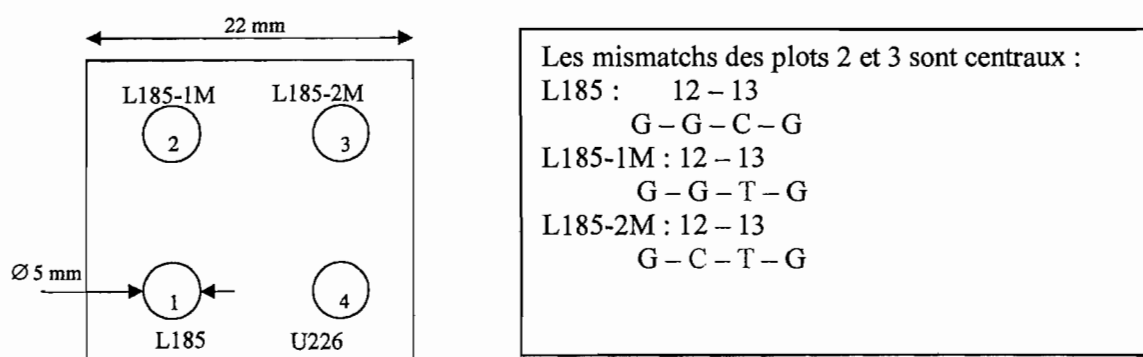
4.1.2 Etude de la sélectivité : puce MM

La puce MM a été réalisée pour caractériser la sélectivité des puces optimisées, en vue de détecter des SNP (single nucleotide polymorphisme).

La puce est constituée de silicium de type n, recouvert de 80 nm de silice thermique, épaisseur optimisée pour les mesures de fluorescence (Annexe 2) avec le groupement fluorophore CY3. Après prétraitement à la solution piranha, silanisation avec le chlorodiméthylsilyl undécanoate de méthyle (CDSUM), recuit, hydrolyse de l'ester en acide par le iodotriméthylsilane, activation au NHS et greffage du NH₂-POE, quatre plots de synthèse d'ADN ont été réalisés avec le montage couplé au synthétiseur « Expedite ».

Plan de synthèse :

Quatre synthèses ont été réalisées sur la puce MM. La longueur des oligonucléotides synthétisés est de 28 bases de long. Trois bases thymine (T) sont ajoutées, pour amorcer la synthèse, aux 25 dernières bases, qui constituent les séquences sondes de la puce. Les plots 1 et 4 sont pourvus des séquences sondes habituelles (L185 et U226). Les plots 2 et 3 comportent la séquence L185 modifiée, qui contient un mismatch central, pour le plot 2, et deux mismatches centraux, pour le plot 3, ceci afin de tester la sélectivité de l'hybridation sur les puces :



Plot 1	Plot 2	Plot 3	Plot 4
TTT - L185	TTT - L185 - 1Mis	TTT - L185 - 2Mis	TTT - U226

Après déblocage à l'ammoniaque concentrée, les hybridations ont été réalisées dans un thermomixeur à 47°C (400 tr/min) dans du tampon d'hybridation pour les oligonucléotides (U185 et L226). Pour les brins PCR, la solution de tampon d'hybridation contenant 1 nM d'ADN est portée à ébullition juste avant d'être mise en contact avec la puce. Ceci a pour effet de dénaturer les brins PCR afin que les brins monocaténaïres puissent s'hybrider avec les brins sondes de la puce. La puce est

maintenue à 47°C au contact du mélange pendant 30 minutes avant d'être lavée. Les lavages sont effectués dans le thermomixeur à 47°C (400 tr/min) pendant 30 minutes dans du SSC 2X ou 1,5X.

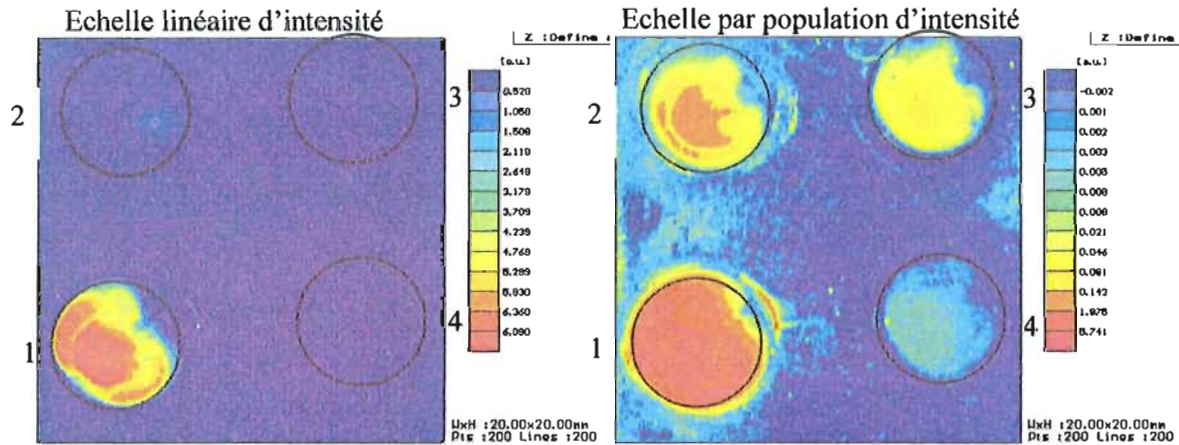


Figure 4.1.2-1 : Cartographie de fluorescence (PL = 10 mW) de la puce après hybridation U185-CY3, 30 minutes, à 47°C et lavage au SSC 2X pendant 30 minutes à 47°C. La représentation en échelle par population nous permet d'observer visuellement la réponse des plots ayant 1 et 2 mismatches (en haut, à gauche et à droite respectivement) et le plot non complémentaire U226 (en bas).

Plot	1	2	3	4
Séquence	TTT - L185	TTT - L185 - 1Mis	TTT - L185 - 2Mis	TTT - U226
Intensité (U.A.)	6,822	0,174	0,087	0,006
Rapport au non-complémentaire	1137	29	15	1

Hybridation U185-CY3	Complémentaire / non-complémentaire : Plot 1 / Plot 4	Complémentaire / 1 mismatch : Plot 1 / Plot 2	Complémentaire / 2 mismatches : Plot 1 / Plot 3	1 mismatch / 2 mismatches : Plot 2 / Plot 3
Rapport d'intensité	1137	39	78	2

Figure 4.1.2-2 : Tableaux des intensités de fluorescence mesurées et de leurs rapports pour la première hybridation de la puce MM avec des oligonucléotides U185-CY3.

Sur les cartographies de la figure 4.1.2-1, les plots de synthèse apparaissent déformés. Ce problème provient de la fluidique du système de synthèse. Dans les tableaux de la figure 4.1.2-2, les valeurs d'intensité, fournies par le logiciel Plscan, ont été mesurées sur la même surface de base de 3 mm de diamètre pour tous les plots (zone centrale des plots, la plus homogène).

L'optimisation de l'épaisseur de la couche d'oxyde thermique nous a permis de gagner en sensibilité. Nous avons dû diviser la puissance d'excitation lumineuse par 2,5 (20 mW), tout en restant près de la saturation du tube photomultiplicateur. Ainsi, sur cette puce optimisée, à la première hybridation, le rapport complémentaire / non-complémentaire est de 1137, valeur à comparer à la valeur de 54, obtenue sur la puce FVP1. La spécificité de reconnaissance de notre puce, vis-à-vis d'un SNP, est également montrée par un rapport de 39 pour un mismatch central et de 78 pour deux mismatches centraux, avec une séquence sonde de 25 bases de longueur. Ce dernier résultat aurait

certainement pu être amélioré en procédant à des lavages supplémentaires, comme la suite de cette expérience le montre.

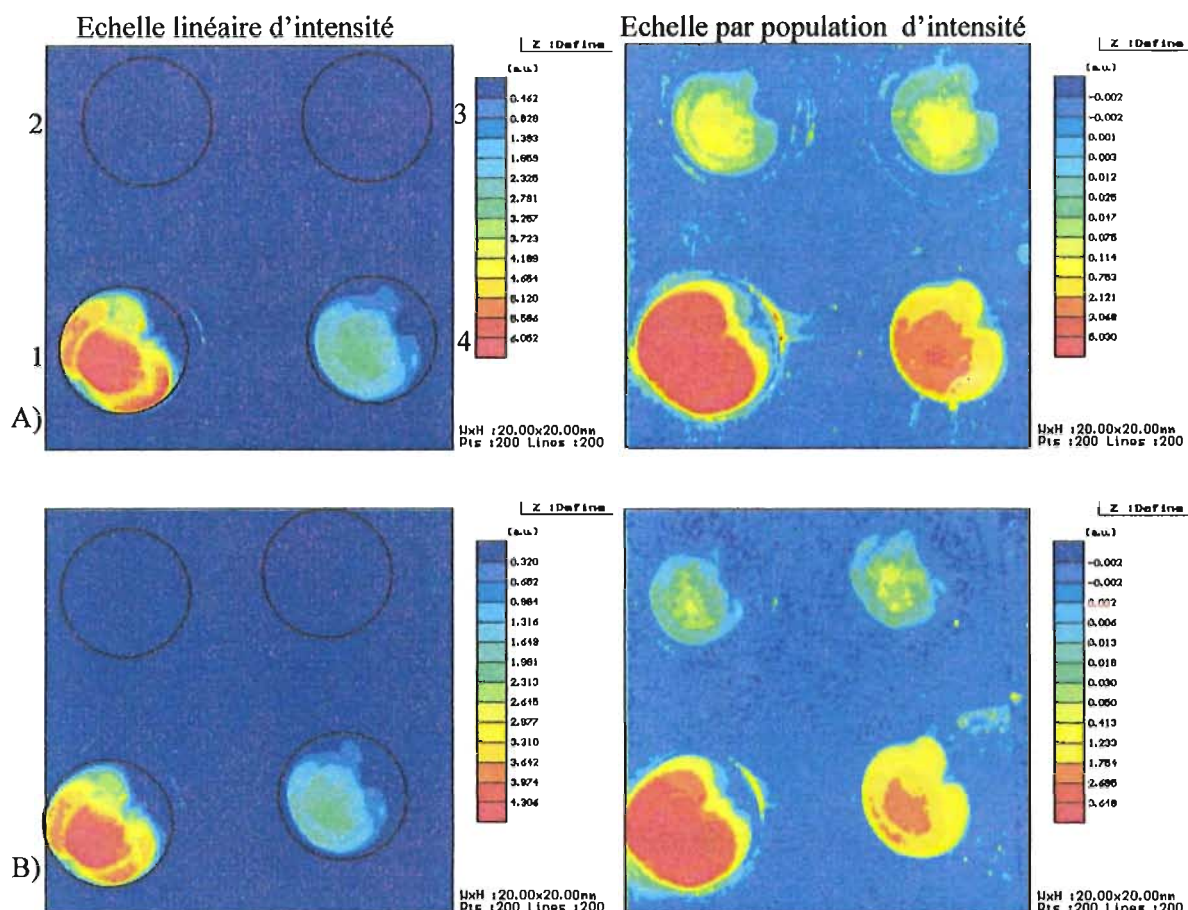


Figure 4.1.2-3 : Cartographies de fluorescence (PL = 10 mW) de la puce après hybridation L226-CY3, 30 minutes à 47°C et A) lavage au SSC 2X pendant 30 minutes à 47°C; B) deuxième lavage SSC 1,5X pendant 30 minutes à 47°C.

Une seconde hybridation (L226-CY3) a été effectuée sans avoir procédé à une dénaturation préalable de la première hybridation. La représentation en échelle par populations nous permet d'observer visuellement la réponse de tous les plots.

Plot		1	2	3	4
Intensité (U.A.)	A)	5,908	0,098	0,090	2,720
	B)	4,189	0,031	0,038	1,850

Hybridation L226-CY3		L185 / U226 Plot 1 / Plot 4	L185 / 1 Mis Plot 1 / Plot 2	L185 / 2 Mis Plot 1 / Plot 3	1 Mis / 2 Mis Plot 2 / Plot 3
Rapport d'intensité	A)	2,17	60	65	1,09
	B)	2,26	135	110	0,82

L'hybridation du plot U226 par L226-CY3 se traduit par une intensité plus de deux fois inférieure à celle du plot L185 par U185-CY3. Les deux séquences ont pourtant la même température de fusion, mais la différence peut s'expliquer par la formation de structures secondaires et ne traduit pas un dysfonctionnement de ce plot. Pour les trois autres plots, cette nouvelle hybridation (non-complémentaire) et les lavages qui l'ont suivie, ont eu pour effet d'augmenter la sélectivité de la première hybridation, puisqu'on observe des rapports supérieurs à 100 pour un ou deux mismatches.

Ces résultats valident ainsi la sensibilité de nos puces dans le cadre d'hybridations oligonucléotides contre oligonucléotides. La suite logique de cette expérience était de tester l'hybridation d'une cible de grande taille après dénaturation de la puce.

Des brins PCR d'une longueur d'environ 1500 bases ont été préparés au LEMS (Lyon I). Ils comprennent : 354 A, 340 C, 468 G, 305 T.

Des désoxyribo-uracile-triphosphate (dUTP) ont été utilisés pour marquer les brins, 35% des dUTP étaient marqués au CY3 pendant la PCR.

La séquence de ces brins PCR comprend une fois la séquence de 25 bases du U185, complémentaire des sondes L185.

La puce a été hybridée dans 250 µl de tampon additionné de brins PCR à la concentration de 1 nM.

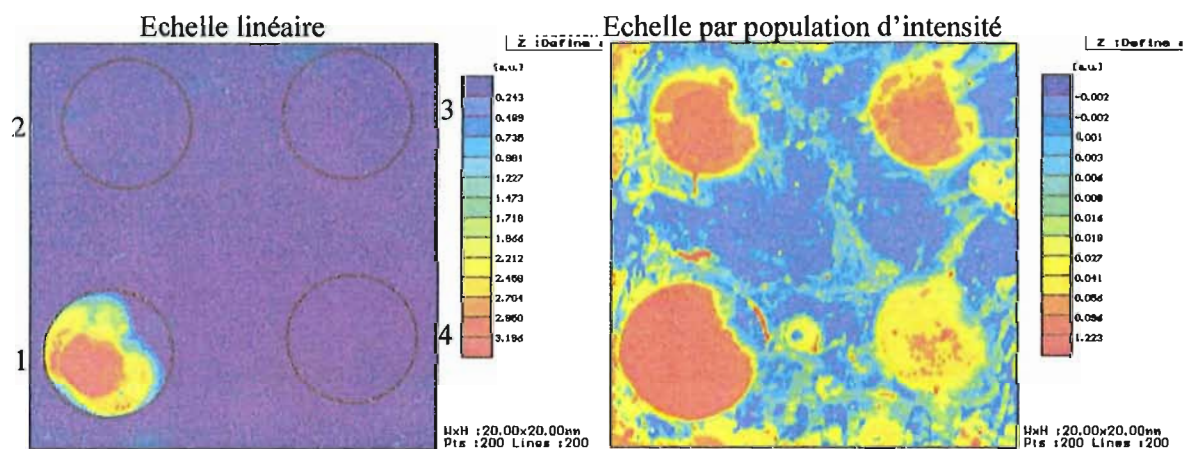


Figure 4.1.2-4 : Cartographie de fluorescence (PL = 20 mW) de la puce après dénaturation NaOH 0,1 M pendant 5 minutes, puis hybridation avec des fragments PCR de 1500 bases 30 minutes à 47°C et lavage au SSC 2X pendant 30 minutes à 47°C. La représentation en échelle par population nous permet d'observer visuellement la réponse des plots ayant 1 et 2 mismatches (en haut, à gauche et à droite respectivement) et le plot non complémentaire L226 (en bas).

Plot	1	2	3	4
Intensité (U.A.)	3,037	0,117	0,111	0,054
Rapport au non-complémentaire	56	2,17	2,05	1

	Complémentaire / non-complémentaire : Plot 1 / Plot 4	Complémentaire / 1 mismatch : Plot 1 / Plot 2	Complémentaire / 2 mismatches : Plot 1 / Plot 3	1 mismatch / 2 mismatches : Plot 2 / Plot 3
Rapport d'intensité	56	26	28	1,05

La spécificité de reconnaissance de la puce est montrée, pour des brins PCR de grande taille, par des rapports d'intensité de fluorescence de : 56 entre les plots complémentaire et non-complémentaire, de 26 pour un mismatch central et de 28 pour deux mismatches centraux. Ces derniers résultats auraient certainement pu être améliorés en procédant à des lavages supplémentaires. En effet, on peut observer sur les cartographies en échelle par populations, que, proportionnellement, les brins de grande longueur multi-marqués s'adsorbent plus sur les surfaces libres interplots que les oligonucléotides de 25 bases mono-marqués (comparer figures 4.1.2-3 et 4.1.2-4, images de droite).

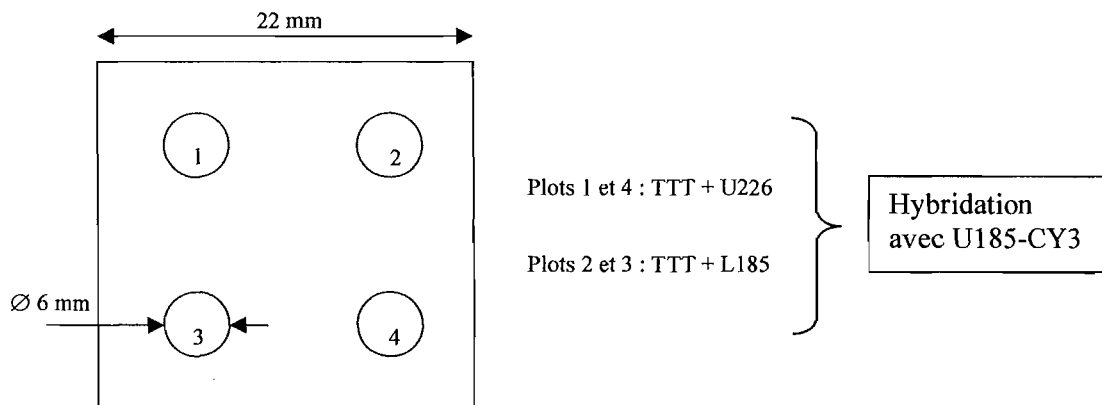
En conclusion, ce type de puces est caractérisé par une sélectivité satisfaisante, y compris avec de très longs brins d'ADN. Cette sélectivité a été obtenue avec des protocoles ordinaires, dans des conditions d'utilisation de routine.

4.1.3 Etude de la sensibilité : Puce S8

Nous avons réalisé des expériences avec des puces optimisées pour la détection par mesures de fluorescence, afin de tester leur sensibilité à l'hybridation, aux faibles concentrations en cibles. L'ensemble de ces expériences, ainsi que leurs conclusions, sera rapporté par M. Bras dans sa thèse (dynamique de réponses, limites de détections en fonction des supports...).

Ici est présentée la puce S8, issue de synthèses in situ d'ADN, sur support Si/SiO₂ (80 nm de silice), silanisée au chlorodiméthylsilylundécanoate de méthyle dans l'hexane, après traitement thermique, hydrolyse de l'ester en acide par le iodotriméthylsilane, activation de l'acide au NHS et greffage du H₂N-POE dans le THF.

Plan de synthèse de la puce S8 :



Nous présentons la caractérisation par mesures de fluorescence de la puce S8, après sa deuxième hybridation avec 5 ml de tampon, contenant 10 aM (soit 30000 molécules) d'oligonucléotides U185-CY3 (la première hybridation avait été effectuée avec 3000 molécules (1 aM) dans 5 ml de tampon d'hybridation sans donner de réponse lors de la lecture par fluorescence).

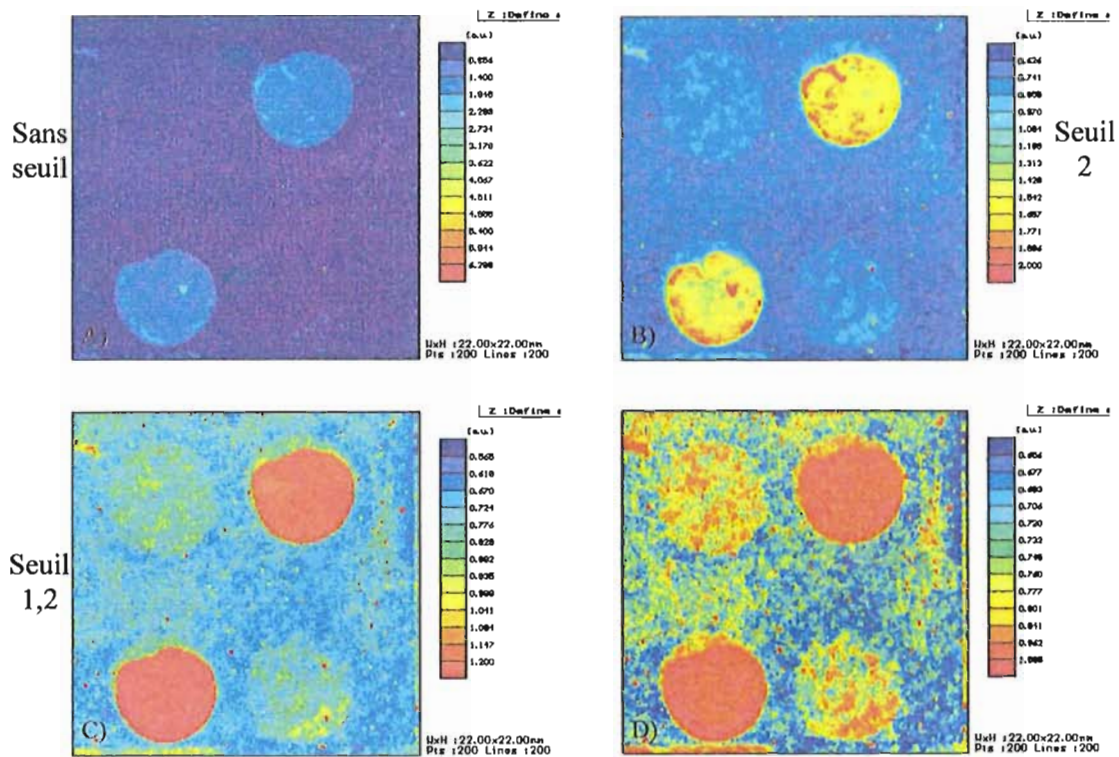


Figure 4.1.3-1 : Cartographies de fluorescence de la puce S8 après hybridation U185-CY3 10 aM et lavage SSC 2X pendant 30 minutes (PL = 50 mW, Gain 50).

- A) Cartographie en pleine échelle linéaire de mesures.
- B) Cartographie en échelle linéaire « seuillée » à 2 (U.A.).
- C) Cartographie en échelle linéaire « seuillée » à 1.2 (U.A.).
- D) Cartographie en pleine échelle par populations

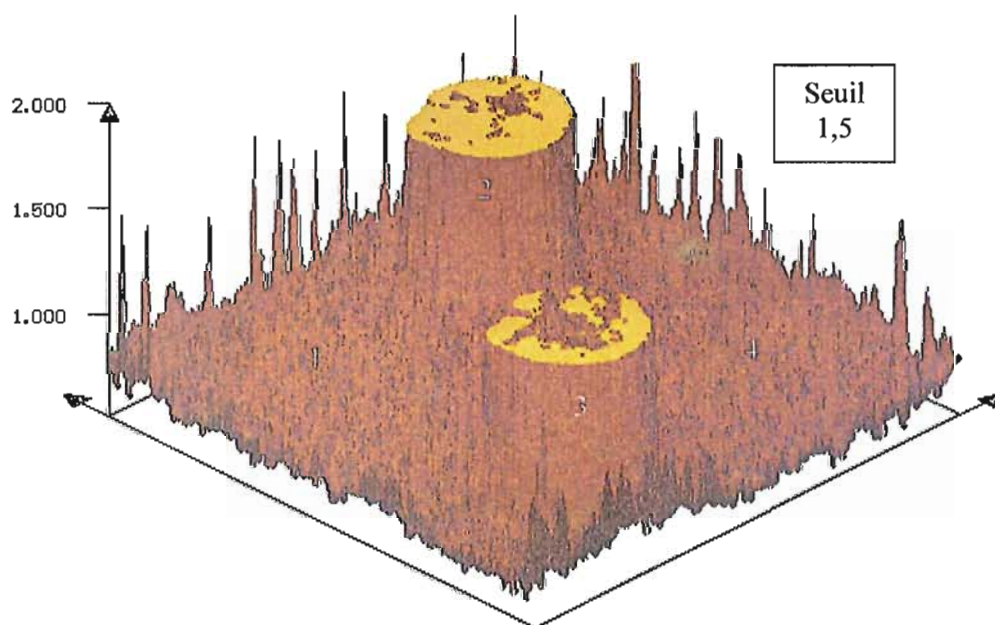


Figure 4.1.3-2 : Cartographie en trois dimensions, « seuillée » à 1.5 (U.A.) de la puce S8 après hybridation U185-CY3 10 aM et lavage SSC 2X pendant 30 minutes (PL = 50 mW, Gain 50).

Plot	1	2	3	4	fond
Intensités de fluorescence (U.A.)	0,808	1,623	1,570	0,806	0,719

Complémentaire / Non complémentaire	Complémentaire - Fond	Non complémentaire - Fond	Complémentaire - Fond / Non complémentaire - Fond
2	0,878	0,088	10

Figure 4.1.3-3 : Tableau des intensités de fluorescence (u.a.) ainsi que de leurs rapports, obtenus sur une base de diamètre 6 mm, sur chacun des plots, ainsi qu'au centre de l'échantillon, pour la mesure du bruit de fond.

Les cartographies de fluorescence de la figure 4.1.3-1 et de la figure 4.1.3-2 montrent les deux plots L185 hybridés U185-CY3. Les cartographies A et B révèlent la fluidique interne du système de synthèse. La cartographie C a été « seuillée » à 1,2 et la cartographie D est représentée en échelle, par populations, afin de visualiser le bruit de fond et la réponse des plots non complémentaires. Les valeurs d'intensité, présentées dans le tableau 4.1.3-3, sont obtenues sur la puce en effectuant la moyenne des intensités sur une base de 6 mm. La puissance lumineuse excitatrice est de 50 mW à la sortie du laser et la chaîne de détection est amplifiée avec un gain de 50. Les rapports d'intensité brute sont de 2 pour le rapport complémentaire / non complémentaire. Si l'on soustrait le bruit de fond aux mesures, ce rapport complémentaire / non complémentaire atteint une valeur de 10. Cette expérience a été effectuée avec une solution d'hybridation 10 aM pour la caractérisation de nos puces ; la réponse étant spécifique, cette quantité de matière détectée constitue donc une limite de détection mesurée. Les deux plots hybridés ont un diamètre de 6 mm, soit une surface totale de $56,5 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$, le nombre maximum de brins hybridés est de 30000. On obtient une limite de détection de $5,3 \cdot 10^{-4}$ brins/ μm^2 (soit 530 brins/ mm^2).

Ces résultats sont très intéressants, bien qu'ils aient été obtenus dans des conditions idéales (oligonucléotides contre oligonucléotides, sans interférants). Grâce à la miniaturisation des plots et à la sensibilité de ces substrats, il est possible d'envisager l'utilisation directe des puces à ADN, sans les étapes d'amplification PCR souvent nécessaires à la lecture de séquences d'ADN.

4.2 Optimisation des substrats

4.2.1 Puce mixte : optimisation optique de substrats – comparaison de la synthèse in situ et de l'immobilisation ex situ d'oligonucléotides

La puce « Mixte » a pour but de mettre en œuvre, sur une même surface les deux voies de fonctionnalisation biologique (accrochage de brins présynthétisés (ex situ) et synthèse d'ADN (in situ) et de comparer leur comportement.

Le substrat utilisé est du silicium de type n pourvu de 80 nm d'oxyde thermique, épaisseur optimisée pour la détection par fluorescence du CY3. La couche d'oxyde de cet échantillon a été usinée par attaque chimique, après lithographie, pour que des plots de 500 μm de diamètre soit protégés lors de l'attaque de la silice par HF tamponné. On obtient un réseau de plots de 500 μm de diamètre à 80 nm d'épaisseur de silice, séparés par des zones de 250 μm d'oxyde natif. Cet usinage va nous permettre de caractériser l'efficacité de l'optimisation des épaisseurs. Ce type d'échantillon peut être destiné par exemple à la réalisation de puces par adressage, par jets, et est sensé améliorer la lecture de la puce.

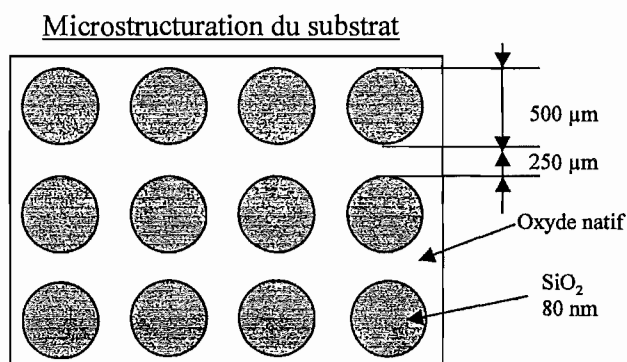
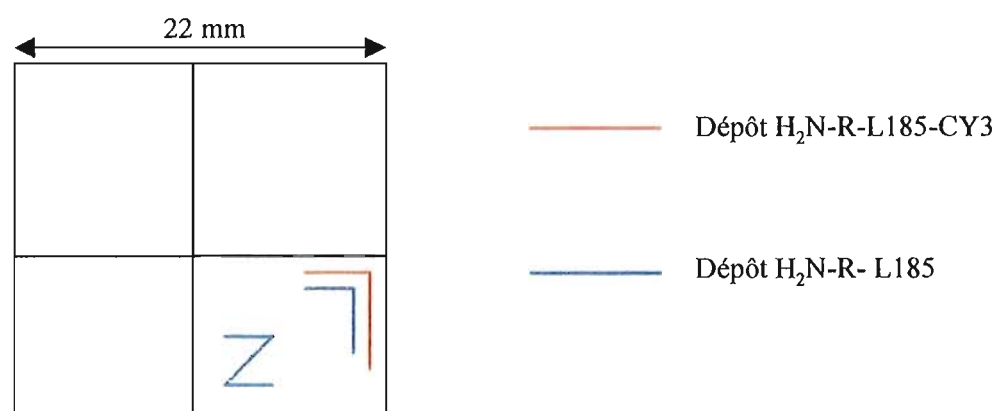


Figure 4.2.1-1 : Détail de la surface micro-usinée de la puce Mixte.

Pour la fonctionnalisation de cette puce, après prétraitement à la solution piranha, silanisation avec le chlorodiméthylsilyl undécanoate de méthyle, recuit, nous utilisons le protocole d'activation mis au point par V. Dugas (thèse ECL 2001). Après hydrolyse de l'ester en acide par le iodotriméthylsilane, activation de l'acide au NHS, des oligonucléotides présynthétisés pourvus d'un amino-espaceur sont fixés en créant une liaison amide (voir Annexe 6). Des oligonucléotides sont déposés à la micropipette sur certains plots (plan de dépôt ci-dessous). Puis le reste de la puce est couvert de $\text{H}_2\text{N-POE}$ pour initier des synthèses directes (plan de synthèse ci-dessous).

En général, l'immobilisation des oligonucléotides est suivie par une étape de désactivation des acides activés n'ayant pas réagi avec des amino-espaces, par greffage de chaînes aliphatiques inertes. (V. Dugas a mis au point une méthode originale de désactivation en phase gazeuse, dans laquelle la puce est mise en présence de diméthylamine). Pour cette puce, après dépôt à la main d'oligonucléotides pourvus d' amino-espaces, nous avons procédé à la désactivation des acides par greffage de l'aminopolyoxyde d'éthylène (H_2N-POE) sur les acides activés restant sur la puce. Cela nous a également permis d'effectuer des synthèses in situ d'oligonucléotides sur cette même puce, grâce à la fonction terminale alcool primaire du H_2N-POE .

Plan de dépôt :



Juste après l'immobilisation et la désactivation au $POE-NH_2$, nous avons caractérisé l'immobilisation des brins $H_2N-R-L185-CY3$ par mesure de fluorescence.

Les dépôts ont été effectués à l'aide de pipettes Pasteur, préalablement chauffées et étirées en capillaire pour obtenir des gouttes les plus petites possible. Les volumes et le positionnement des gouttes ne sont pas très reproductibles, car le dépôt a été fait à la main. Les cartographies et l'analyse de section (Figure 4.2.1-3) confirment qu'une goutte a été déposée à cheval sur deux plots (troisième goutte en partant du bas de la puce). Cette erreur révèle l'efficacité de l'optimisation de l'épaisseur de silice. En effet l'intensité, sur les bords de la goutte se trouvant sur les plots, atteint des valeurs de 0,675 (u.a.), alors que le centre de cette goutte, qui se trouve sur de l'oxyde natif de faible épaisseur (≈ 1 nm), présente des intensités n'excédant pas 0,075 (u.a.). La taille des pixels élémentaires pour les analyses de section est de $50 \mu m$.

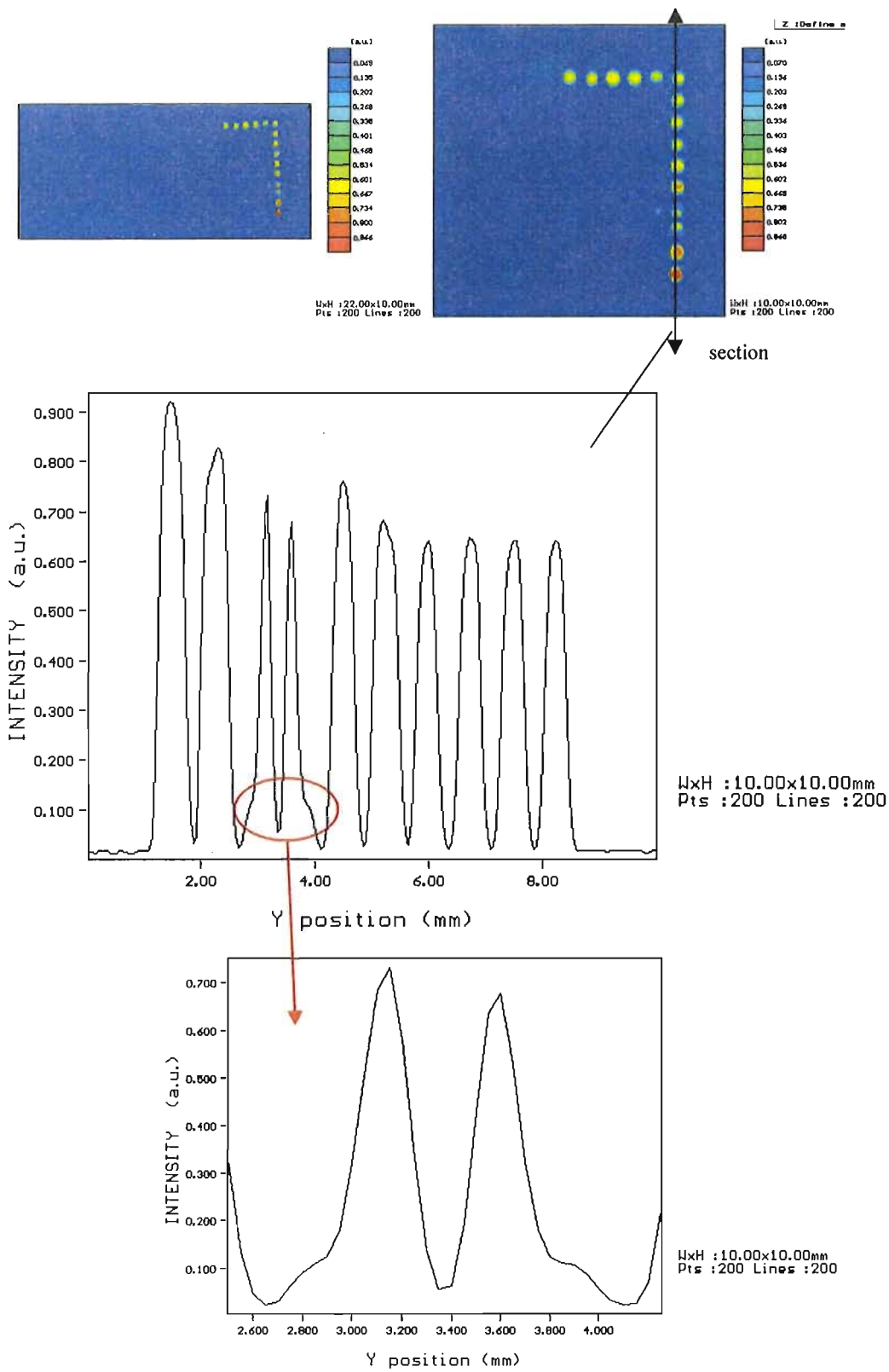


Figure 4.2.1-3 : Cartographies de fluorescence et analyses de sections sur la puce mixte après immobilisation (PL = 50 mW).

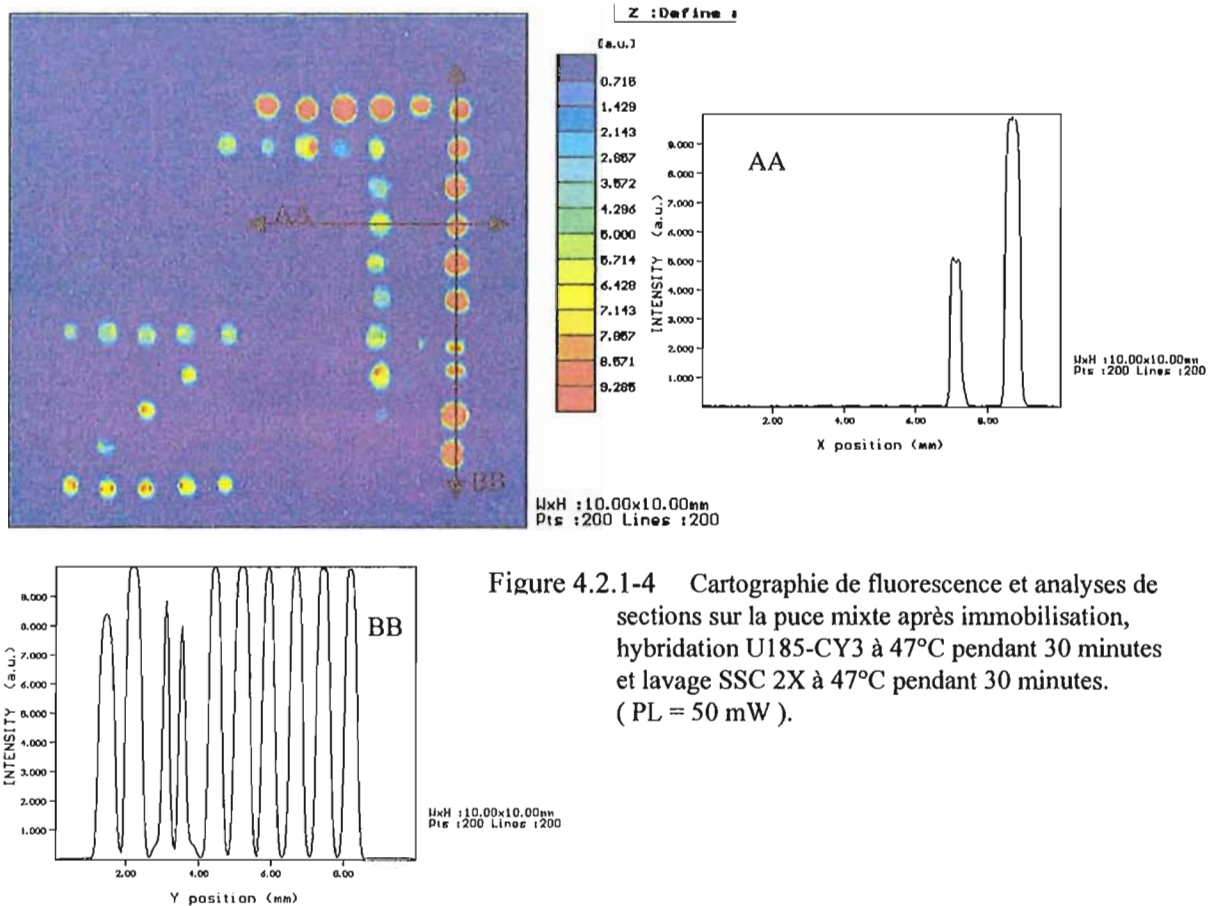
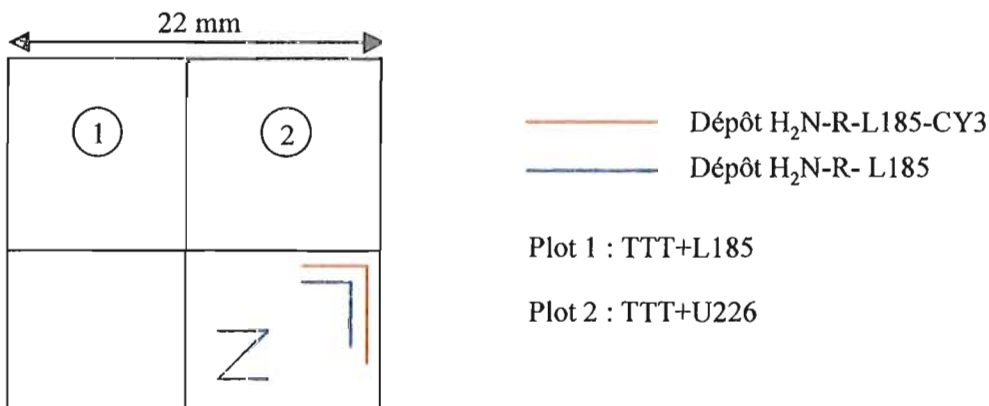


Figure 4.2.1-4 Cartographie de fluorescence et analyses de sections sur la puce mixte après immobilisation, hybridation U185-CY3 à 47°C pendant 30 minutes et lavage SSC 2X à 47°C pendant 30 minutes. (PL = 50 mW).

Après l'hybridation U185-CY3 tous les plots sont visibles. Les plots où du H₂N-R-L185-CY3 avait été déposé, présentent des intensités de fluorescence environ 1,7 fois supérieures aux autres plots (moyenne effectuée sur dix plots), pour lesquels seule la fluorescence due au U185-CY3 est présente (voir section AA de la figure). Ce rapport inférieur à deux peut s'expliquer par la dégradation des groupements fluorophores des brins H₂N-R-L185-CY3, soumis à des insulations, après dépôt, et préalables à l'hybridation (Figure 4.2.1-4), ou par le fait que les volumes et les concentrations des dépôts ont été différents.

Après ces analyses, l'échantillon a été dénaturé dans de la soude 0,1 M pendant 5 minutes, puis deux synthèses directes d'ADN ont été réalisées sur le haut de l'échantillon :

Plan de synthèse de la puce mixte :



Après déblocage des oligonucléotides synthétisés à l'ammoniaque concentrée pendant deux heures, hybridation U185-CY3 et lavage au SSC 2X, on procède à de nouvelles cartographies de fluorescence en diminuant la puissance lumineuse d'excitation de 50 mW à 20 mW.

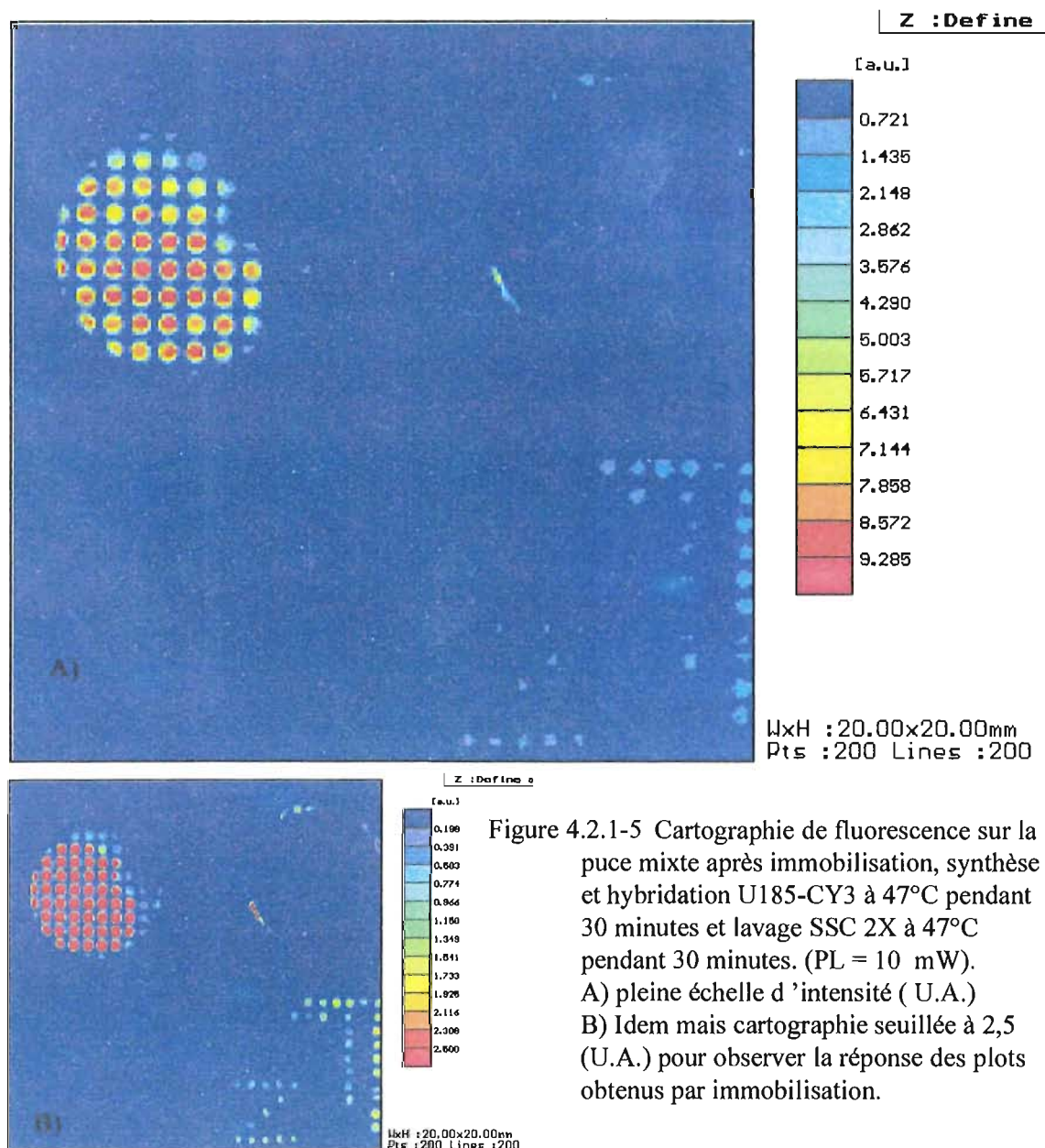


Figure 4.2.1-5 Cartographie de fluorescence sur la puce mixte après immobilisation, synthèse et hybridation U185-CY3 à 47°C pendant 30 minutes et lavage SSC 2X à 47°C pendant 30 minutes. (PL = 10 mW).
A) pleine échelle d'intensité (U.A.)
B) Idem mais cartographie seuillée à 2,5 (U.A.) pour observer la réponse des plots obtenus par immobilisation.

Figure 4.2.1-5

Les plots portant des oligonucléotides L185 synthétisés in situ présentent des intensités de fluorescence plus de 8 fois plus importantes que celles des plots immobilisés H₂N-R-L185 et plus de 5 fois plus importantes que celles des plots immobilisés H₂N-R-L185-CY3. Pour cette deuxième hybridation, le rapport entre les plots pourvus d'oligonucléotides présynthétisés H₂N-R-L185-CY3 / H₂N-R-L185 de 1,63 est presque identique à celui de la première hybridation (1,7), mais dénote quand même une dégradation du fluorophore porté par les brins immobilisés. Le rapport complémentaire / non complémentaire pour les plots de synthèse directe est supérieur à 68. Enfin le rapport complémentaire / bruit de fond hors plot est supérieur à 1000.

Après cette hybridation nous avons vérifié la fonctionnalité du plot 2 par hybridation avec des brins L226-CY3, sans dénaturation préalable.

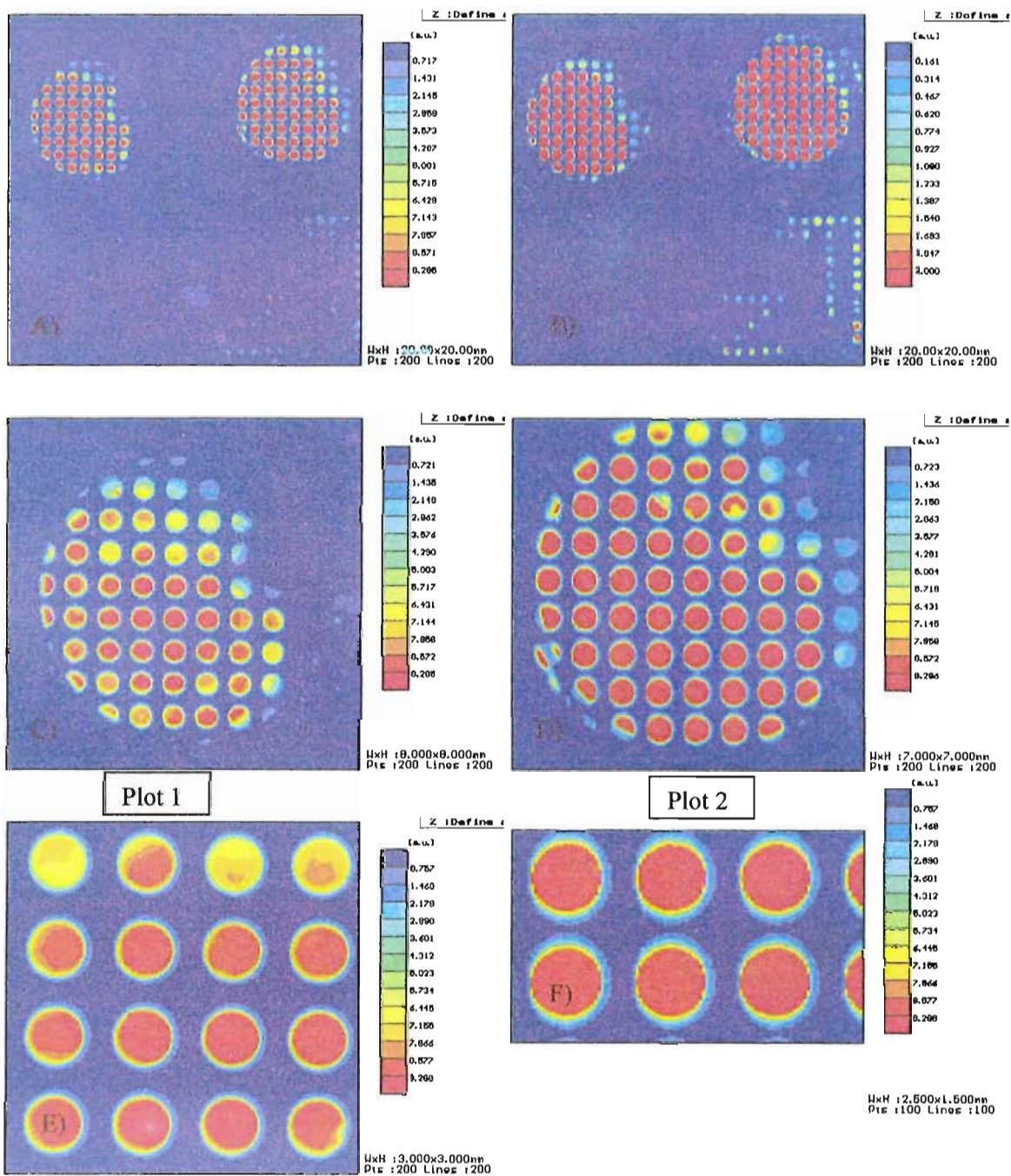


Figure 4.2.1-6 : Cartographie de fluorescence sur la puce mixte après hybridation L226-CY3 à 47°C pendant 30 minutes et lavage SSC 2X à 47°C pendant 30 minutes. (PL = 20 mW).

- A) Pleine échelle d'intensité (u.a.)
- B) Idem mais cartographie seuillée à 2 (u.a.) pour observer la réponse des plots obtenus par immobilisation.
- C) et E) ZOOMS sur le plot 1 (synthèse L185).
- D) et F) ZOOMS sur le plot 2 (synthèse U226).

Le bon fonctionnement du plot 2 valide la spécificité de réponse de la puce mixte lors des premières hybridations U185-CY3. Les cartographies C), D), E) et F) montrent l'efficacité de l'optimisation des épaisseurs de silice. En effet l'intensité des plots optimisés atteint les valeurs de saturation de la chaîne de détection : 9,999 (u.a.), alors qu'entre les plots sur de l'oxyde natif de faible

épaisseur (≈ 1 nm) les intensités varient entre 0,05 et 0,125 (u.a.) ce qui donne un rapport compris entre 80 et 200, le processus d'hybridation étant à l'identique.

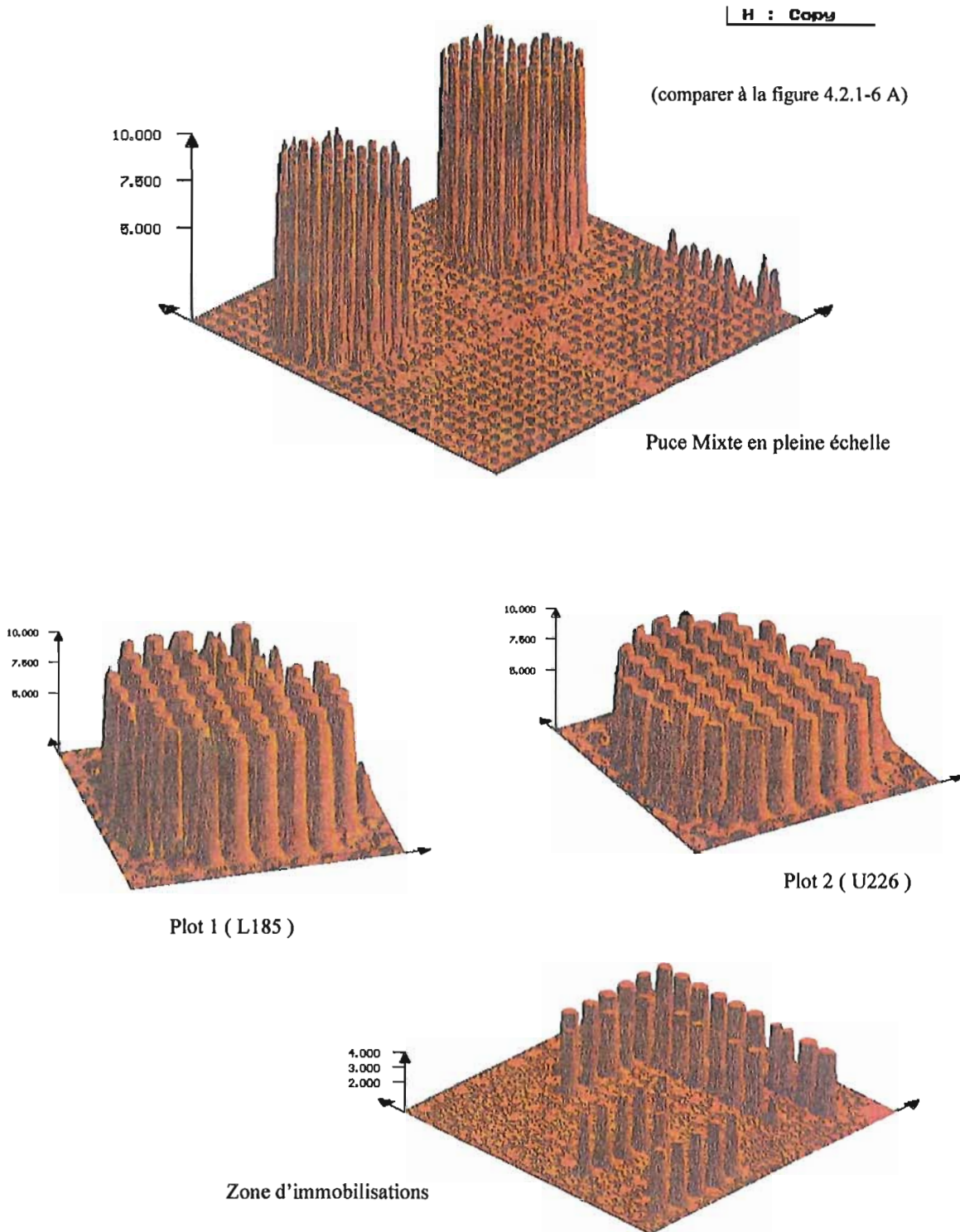


Figure 4.2.1-7 : Images en trois dimensions des cartographies de la puce Mixte. Cette représentation permet d'éviter d'utiliser des dégradés de couleurs dans les cartographies 2D, pour représenter les intensités.

Ces expériences ont montré l'intérêt et l'efficacité de l'usinage des supports, en ce qui concerne la lecture par fluorescence de l'hybridation sur des brins présynthétisés immobilisés ou sur des brins issus de synthèse directe.

Par ailleurs, nous avons observé que nous obtenons de meilleurs résultats d'hybridation en utilisant la méthode de fonctionnalisation par greffage du H₂N-POE, suivi de synthèse, plutôt qu'en utilisant la méthode d'immobilisation d'oligonucléotides présynthétisés, munis d'un amino-espaceur.

4.2.2 Puce Pointe : optimisation de la fluorescence par « effet d'antenne »

L'optimisation des mesures de fluorescence par l'adaptation des substrats nous a aussi amenés à tester des échantillons susceptibles d'exalter, par effet d'antenne, les champs perçus par les fluorophores et d'amplifier les champs électromagnétiques de fluorescence émis. Les études sur le SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) ainsi que sur la microscopie optique de champ proche (NFOM near field optical microscope) ont montré les effets de structures de petite taille (voisine des longueurs d'onde étudiées) sur l'exaltation locale des champs électromagnétiques. Les deux principales causes invoquées pour cet effet sont les plasmons de surface et l'exaltation locale par un objet de forme géométrique aiguë (pointe) (lightning rod mechanism). L'apparition des plasmons de surface est obtenue en SERS (longueurs d'onde proches du visible) sur des métaux ayant une partie imaginaire de leur indice de réfraction la plus grande possible comme dans le cas de l'argent. Pour le deuxième effet, l'exaltation locale est due à un mécanisme lié à l'interaction entre une pointe et un groupement fluorophore se trouvant dans l'espace soumis aux champs proches générés par la pointe.

Ce mécanisme symétrique provoque, à partir de l'énergie de la source excitatrice, la polarisation directe du groupement fluorophore, ainsi que celle de la pointe qui, par ses caractéristiques géométriques constitue une antenne. La polarisation de la pointe entraîne la polarisation du groupement fluorophore qui se trouve dans son espace d'influence de champs proches. Réciproquement les émissions radiatives du système pointe-groupement fluorophore résultent de la combinaison des ondes électromagnétiques émises directement par le groupement fluorophore avec celles émises par la pointe ayant subi la polarisation induite par l'émission directe du groupement fluorophore qui lui est accolé.

Dans ce cas la pointe s'assimile à l'antenne d'un récepteur et à celle d'un émetteur.

Azoulay et al (2000) ont étudié ces effets dans les cas de pointes en tungstène ou en silicium considérées comme des « prolate ellipsoid » pour la modélisation. Ils ont interprété les phénomènes d'exaltation locale des champs électromagnétiques en fonction des paramètres de longueur d'onde, de géométrie des pointes et des caractéristiques des matériaux mis en œuvre (indice). Ils ont conclu qu'un troisième facteur gouverne les phénomènes d'exaltation des signaux de fluorescence, en plus des effets de plasmon et d'antenne : c'est le transfert de l'énergie absorbée par le fluorophore vers la pointe, suivi d'une dissipation non radiative (appelée quenching). Ces trois phénomènes semblent être liés à la distance entre le groupement fluorophore et la pointe, et être fonction du type de matériaux utilisés. Azoulay et al (Azoulay 2000) ont déterminé que la distance pointe-fluorophore optimale est de 5 nm, et que le phénomène d'exaltation est une fonction de l'inverse de cette distance au cube. Enfin ils ont observé que pour des distances inférieures à 2 nm, le transfert non-radiatif est prépondérant et que ce transfert est moins important sur le silicium que sur le tungstène dans des conditions équivalentes.

Pour notre application, nous avons choisi de préparer des substrats de silicium munis en leur surface d'objets ayant les caractéristiques géométriques nécessaires à l'exaltation locale des champs électromagnétiques. Nous espérons ainsi obtenir une exaltation du signal de fluorescence, sans la nécessité de rapporter une pointe à la proximité de l'échantillon, pour des mesures par excitation lumineuse externe de la surface de nos puces, comme dans le cas des mesures de Raman exaltées. Ces puces auront donc aussi l'avantage d'être « lisibles » sur le banc de mesures de fluorescence du laboratoire sans aucune modification.

Nous avons produit des substrats adaptés, en terme de caractéristiques géométriques, lors de l'usinage du silicium au plasma chloré.

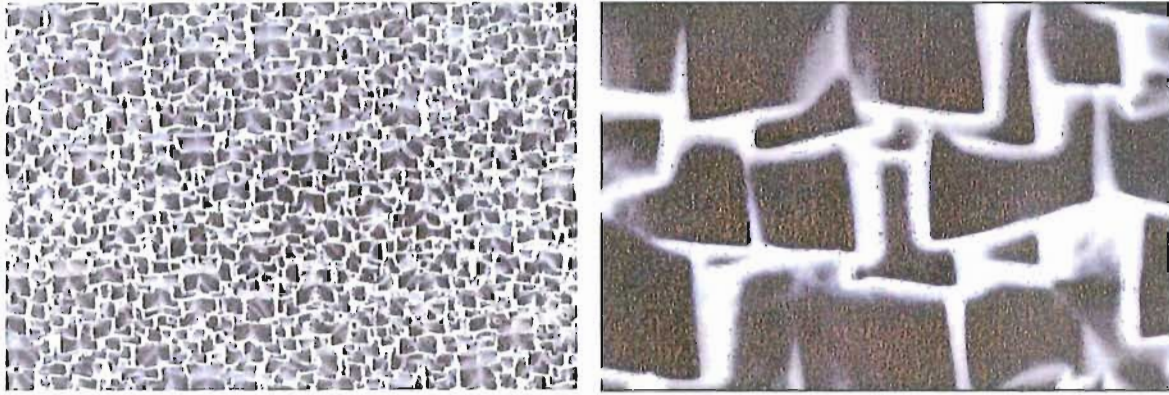


Figure 4.2.2-1 : Image MEB d'un échantillon de silicium (1.0.0) gravé par plasma chloré.

Les images MEB de la figure 4.2.2-1 nous renseignent sur la taille des membranes de silicium et la taille des cavités les entourant. Dans notre cas les cavités ont des formes parallélépipédiques déformées, de tailles comprises entre 0,5 et 5 μm , l'orientation de ces cavités révèle la nature cristalline du substrat.

Les membranes de silicium dégagées par l'attaque plasma sont interconnectées et ont une épaisseur sommitale de l'ordre de 100 nm. Ce genre de substrat fournit donc un nombre important d'objets pointus et anguleux de taille proche des longueurs d'onde utilisées pour les mesures de fluorescence.

Nous avons fonctionnalisé ces échantillons, après prétraitement à la solution piranha, avec le chlorodiméthylsilylundécanoate de méthyle. Après hydrolyse, activation, greffage du $\text{H}_2\text{N-POE}$, nous avons réalisé deux plots de synthèses localisés (séquence TTT+L185 et TTT+U226). Puis nous avons procédé au déblocage des oligonucléotides, à l'hybridation avec des oligonucléotides U185-CY3, complémentaires de l'un des deux plots, pendant 30 minutes à 47°C. Enfin nous avons caractérisé l'hybridation par cartographies de fluorescence après lavage au SSC 2X pendant 30 minutes à 47°C.

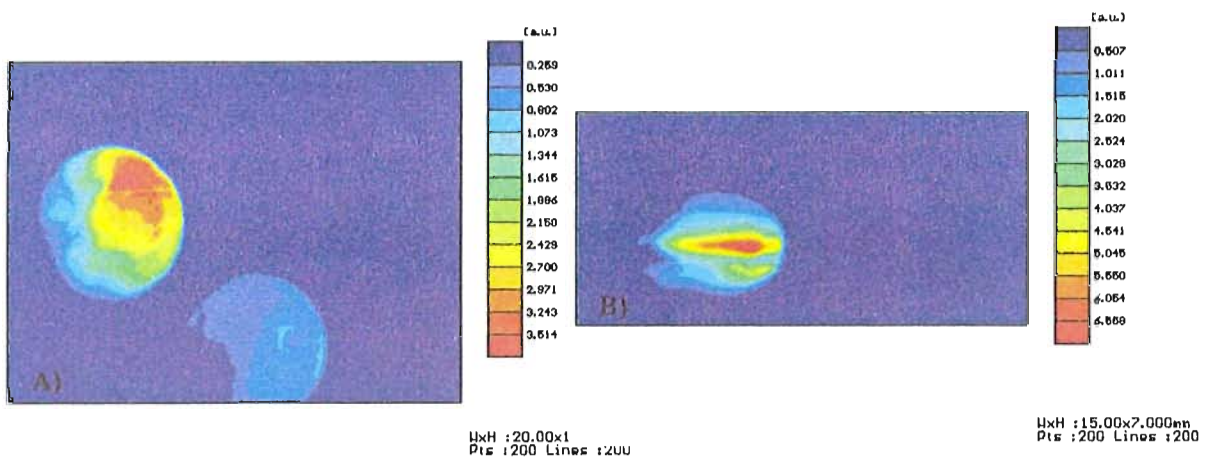


Figure 4.2.2-2 : Cartographies de fluorescence de la puce « pointe » (PL = 20 mW).

La figure 4.2.2-2 A) montre les plots de synthèse. Celui du haut à gauche (TTT+L185) est hybridé. L'intensité de fluorescence de ce plot complémentaire est de 3,6 (u.a.) à son maximum. Cet échantillon a une surface développée plus importante que les échantillons plans, mais il n'est pourvu que d'une couche d'oxyde natif de faible épaisseur (1 à 2 nm). Sur la puce mixte (chap IV 4.2.1), les intensités de fluorescence maximales, détectées dans les mêmes conditions de mesures, sont de 0,125 (u.a.). Le rapport de ces intensités est proche de 30. Dans les conditions de mesures classiques du banc de mesures, l'incidence de la source lumineuse excitatrice est normale à la surface. Nous avons ensuite cartographié la puce « pointe » inclinée de 45° par rapport à l'horizontale (Figure 4.2.2-2 B)). Cette configuration de mesures ne nous permet d'ajuster la distance focale sur l'échantillon que

sur une bande horizontale de la partie centrale de la puce (la profondeur de champ de l'objectif utilisé est d'environ 100 μm). A l'intersection de cette bande centrale horizontale et du plot complémentaire, apparaissent des intensités de fluorescence atteignant 6,6 (u.a.). Il semble donc que l'effet d'antenne soit amélioré quand le flux lumineux excitateur s'éloigne de l'incidence normale à la surface pour s'approcher de l'incidence rasante.

Une possibilité pour quantifier cet effet d'exaltation serait de pratiquer une hybridation avec des oligonucléotides marqués au $^{32}\text{P}^*$ et de procéder à la lecture de la puce avec un phosphore imageur qui ne serait pas sensible aux phénomènes rencontrés lors des mesures de fluorescence. Cette technique pourrait nous permettre de connaître le nombre de sondes par unité de surface et ainsi de pouvoir déterminer le gain lié au phénomène d'exaltation des champs électromagnétiques lors des mesures de fluorescence.

CONCLUSION

Les objectifs de cette thèse étaient l'étude de la conception, de l'élaboration, et de l'utilisation de réseaux d'oligonucléotides communément appelés « Puces à ADN ». Les travaux précédemment développés au laboratoire ont orienté nos recherches vers les supports du type silicium oxydé (Si/SiO₂) ; nous les avons élargies à différents substrats de type silice. L'objet du travail était la fabrication et l'étude d'électrodes de silicium oxydé, fonctionnalisées pour la synthèse d'ADN, ainsi que leur utilisation pour la détection de l'hybridation moléculaire de brins d'ADN à leur surface par des mesures d'impédances électrochimiques (variation du potentiel de surface) ou par d'autres techniques analytiques comme la fluorescence ou le radio-marquage.

Nous avons abordé les différentes étapes-clés nécessaires à l'élaboration et à la caractérisation de puces à ADN : fonctionnalisation des substrats, adressage des réactions de greffage ou de synthèse d'ADN (sondes), et lecture des puces, après leur mise en contact avec des molécules d'ADN inconnues (cibles).

Afin de fonctionnaliser nos substrats, nous avons, tout d'abord, utilisé la chimie du GPTS décrite par Southern pour l'élaboration de réseaux d'oligonucléotides. Mais cette chimie des silanes trifonctionnels posait des problèmes de contrôle et de stabilité des couches ; nous avons alors développé une fonctionnalisation basée sur l'utilisation de silanes monofonctionnels comme le GPMS. Puis, pour obtenir des couches plus stables vis-à-vis des agressions extérieures et une réactivité chimique plus adaptée, nous avons développé une silanisation par la technique des couches auto-assemblées avec le chlorodiméthylsilylundécanoate de méthyle. La fonction ester de méthyle, portée par ce silane, nous a permis de générer des fonctions alcools, nécessaires à la synthèse d'ADN, par réduction au borane (BH₃), ou par greffage de molécules du type H₂N-POE après hydrolyse de l'ester par le iodotriméthyl silane et activation de l'acide par le NHS, selon le protocole mis au point par V. Dugas. Cette dernière méthode de fonctionnalisation nous a permis d'obtenir de nombreux lots d'échantillons reproductibles et fonctionnels, nécessaires pour valider les autres étapes d'élaboration et d'optimisation des puces à ADN, tout en limitant de façon intéressante tous les phénomènes d'adsorption non spécifique rencontrés avec les autres types de fonctionnalisation.

Les techniques d'adressage étudiées au laboratoire, outre l'adressage photochimique, ont été développées autour de l'adressage par jets, pour lequel cette thèse a posé les bases de la faisabilité (résolution de 40 µm avec de l'acétonitrile projetée par des piézo-électriques commerciaux Epson 720 dpi). Une autre voie d'adressage par microfluidique a également été évaluée avec succès lors de ces travaux, en réalisant des synthèses d'ADN localisées grâce à un démonstrateur constitué d'un système de fluidique en silicium micro-usiné.

La lecture optoélectrochimique à haute résolution des puces à ADN a été étudiée à travers la réalisation et la validation d'un banc de mesures à l'échelle microscopique. Par rapport aux études antérieures menées au laboratoire, à l'échelle macroscopique, les substrats commerciaux utilisés se sont avérés hétérogènes et pourvus de nombreux défauts micrométriques. De plus la fonctionnalisation silane-ester greffé H₂N-POE semble avoir trop éloigné l'ADN de la surface de la silice ou / et permis l'insertion d'ions ou de molécules chargés dans la couche fonctionnelle, ce qui s'oppose aux effets de la modification de la répartition des charges dans la couche d'ADN, sur la structure EDS.

La cartographie de fluorescence, sur un banc de mesures Plscan adapté, contrôlée par radio-imageur au ³²P*, nous a permis d'obtenir un moyen efficace et rapide de caractérisation et de lecture

des puces à ADN. Nous avons aussi pu caractériser les étapes de synthèse et d'hybridation par spectrométrie XPS, grâce aux raies caractéristiques d'émission des niveaux de cœur du phosphore et de l'azote. Cette méthode est moins contraignante que la méthode utilisant la radioactivité, et nous avons pu la valider pour une lecture qualitative des puces à ADN.

L'obtention de caractérisations par différentes méthodes spectrométriques, ainsi que l'optimisation des mesures de fluorescence par la prise en compte des phénomènes d'interférences ou d'antennes, nous ont amenés à étudier les substrats. Nous avons élaboré des substrats à grande surface spécifique, en silicium poreux oxydé, dont les caractéristiques géométriques ont été optimisées pour cette étude. Cela nous a permis de réaliser un suivi par infrarouge de toutes les étapes de la fonctionnalisation. Nous avons également optimisé des structures planes Si/SiO₂, dont l'interface constitue un réflecteur. Nous avons ajusté l'épaisseur de la couche d'oxyde, afin d'accroître le champ électromagnétique perçu par le fluorophore. Un autre type de substrats, à base de silicium, a été obtenu par attaque au plasma chloré par RIE. Cette préparation permet d'obtenir une grande quantité d'objets anguleux propices à l'effet d'antenne.

La lisibilité des puces, ainsi que l'adressage par jets, ont été optimisés par la mise en œuvre de multi-fonctionnalisations des substrats par microtamponnage. Nous avons vérifié la faisabilité de ce procédé par des mesures infrarouges. Puis nous avons fabriqué des tampons par contre-moulage de polymères sur des structures en silicium micro-usinées par gravure sèche et fonctionnalisées à l'OTS. Nous avons pu réaliser la silanisation des substrats par micro-transfert. La délimitation des zones réactives ainsi obtenues permet de confiner les réactifs et de connaître avec une précision micrométrique la position de chaque plot.

Nous avons conclu nos travaux par l'utilisation des puces-tests que nous avons élaborées, afin d'en déterminer les potentialités biologiques.

La robustesse de la fonctionnalisation a permis la réutilisation des puces jusqu'à 20 fois, sans altération de leur réponse. La spécificité de la réponse obtenue, pour un mismatch central, avec des séquences sondes de 25 bases a été supérieure à 40 pour une hybridation avec des oligonucléotides cibles d'une longueur de 25 bases et supérieure à 25 pour des brins PCR de 1,5 kbases. Enfin la limite de détection inférieure obtenue sur nos puces, l'a été avec une solution de concentration en cibles de 10 aM, soit $5,3 \cdot 10^{-4}$ brins/ μm^2 (530 brins/ mm^2) hybridés. Cette limite pourrait même nous permettre de ne pas utiliser de PCR, pour de nombreuses applications biologiques actuelles. Pour les concentrations plus élevées, le rapport signal sur bruit de fond biologique observé lors de la première utilisation d'une puce est supérieur à 1000, dans le cadre d'hybridations oligonucléotides contre oligonucléotides de 25 bases, et reste supérieur à 40 pour des utilisations postérieures, dans le cadre d'hybridations oligonucléotides contre oligonucléotides ou d'hybridations de brins PCR de 1,5 kbases.

Ces résultats sont concluants quant aux objectifs de fonctionnalité biologique de nos structures.

Les puces à ADN qui allient l'utilisation de supports Si/SiO₂ à celle de plots de silice de 80 nm d'épaisseur, obtenus par micro-usinage, les étapes de silanisation par le protocole mettant en œuvre le CDSUM suivi par l'immobilisation du H₂N-POE puis la synthèse in situ sur les plots, semblent donner de très bons résultats. Ces résultats sont particulièrement satisfaisants en terme de sensibilité, de sélectivité et de reproductibilité, ce qui indique tout particulièrement leur utilisation pour les applications biologiques, telles que le diagnostic médical et le génotypage. La bonne aptitude à la détection de « SNP (Single Nucleotide Polymorphism) » fait de ces puces des outils performants pour la reconnaissance de séquences dans des applications du domaine de la génomique et de la protéomique.

Le dispositif actuellement développé au Laboratoire IFoS, dans le cadre du programme R.O.S.A., devrait permettre d'obtenir, sur ce type de support, des puces d'excellente qualité biologique.

BIBLIOGRAPHIE

- Aharoni A., Keizer L., Bouwmeester H., O'Connell A., « Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays », *The Plant Cell*, Vol. 12, pp 647-661 (2000)
- Allara D.L., *Langmuir*, 1, pp 52-66 (1985)
- Allen M.J., Hud N., Balooch M., Tench R., Siekhaus W., Balhorn R., « Tip-radius-induced artifacts in AFM images of protamine-complexed DNA fibers », *Ultramicroscopy*, 42_44, pp 1095-1100 (1992)
- Allen M.J., Tench R., Mazrimas J., Balooch M., Siekhaus W., Balhorn R., « Analysis of synthetic DNAs and DNA-Protamine complexes with the scanning tunnelling microscope », *Scanning Microscopy*, Vol. 7, No. 2, pp 563-576 (1993)
- Arita Y., Kuranari K., Sunohara Y., « Thermal behavior of porous silicon », *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 15, No. 9, pp 1655-1664 (1976)
- Atre S.V., Liedberg B., Allara D., « Chain length dependence of the structure and wetting properties in binary composition monolayers of OH- and CH₃- terminated alkanethiolates on gold », *Langmuir*, 11, pp 3882-3893 (1995)
- Azoulay J., Debarre A., Richard A., Tchenio P., « Quenching and enhancement of single molecule fluorescence under metallic and dielectric tips », *Europhys. Lett.*, 51 (4), pp. 374-380 (2000)
- Azzopardi M.J., Arribart H., « In situ FTIR study of the formation of an organosilane layer at the silica/solution interface », *J. Adhesion*, Vol. 46, pp 103-115 (1994)
- Bain [1] C.D., Troughton E., Tao Y.T., Evall J., Whitesides G., Nuzzo R., « Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold », *J. Am. Chem. Soc.*, 111, pp 321-335 (1989)
- Bain [2] C.D., Whitesides G., « Modeling organic surfaces with self-assembled monolayers », *Advanced Materials*, No. 4, pp 110-116 (1989)
- Balladur V., Theretz A., Mandrand B., « Determination of the main forces driving DNA oligonucleotide adsorption onto aminated silica wafers », *Journal of colloid and interface science*, 194, pp 408-418 (1997)
- Bassous E., « Fabrication of novel three-dimensional microstructures by the anisotropic etching of (100) and (110) silicon », *IEEE Transactions on Electron Devices*, Vol. ED25, No. 10, pp 1178-1184 (1978)
- Bateman J.E., Eagling R.D., Worrall D.R., Horrocks B.R., Houlton A., « Alkylation of porous silicon by direct reaction with alkenes and alkynes », *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 37, No. 19, pp 2683-2685 (1998)
- Bayliss S.C., Hutt D.A., Zhang K., Harris P., Phillips N.J., Smith A., « Structural study of porous silicon », *Thin Solid Films*, 255, pp 128-131 (1995)
- Bean K.E., « Anisotropic etching of silicon », *IEEE Transactions on Electron Devices*, Vol. ED25, No. 10, pp 1185-1193 (1978)
- Berney H., West J., Haeefele E., Alderman J. Lane W., Collins J.K., « A DNA diagnostic biosensor : development, characterisation and performance », *Sensors and Actuators*, B 68, pp 100-108 (2000)
- Bezanilla M., Bustamante C., Hansma H., « Improved visualization of DNA in Aqueous buffer with the atomic force microscope », *Scanning Microscopy*, Vol. 7, No. 4, pp 1145-1148 (1993)
- Blanchard A.P., Kaiser R.J., Hood L.E., « High-density oligonucleotide arrays », *Biosensor & Bioelectronics*, Vol. 11, No. 6/7, pp 687-690 (1996)
- Boukherroub [1] R., Wayner D., « Controlled functionalization and multistep chemical manipulation of covalently modified Si(111) surfaces », *J. Am. Chem. Soc.*, 121, pp 11513-11515 (1999)
- Boukherroub [2] R., Morin S., Bensebaa F., Wayner D.D.M., « New synthetic routes to alkyl monolayers on the Si(111) surface », *Langmuir*, 15, pp 3831-3835 (1999)
- Bras M., Cloarec J.P., Bessueille F., Souteyrand E., Martin J.R., Chauvet J.P., « Control of immobilization and hybridization on DNA chips by fluorescence spectroscopy », *Journal of fluorescence*, Vol. 10, No. 3, pp 247-253 (2000)
- Brown P.O., Botstein D., « Exploring The new world of the genome with DNA microarrays », *Nature Genetics Supplement*, Vol. 21, pp 33-37 (1999)

Brzoska [1] J.B., Shahidzadeh N., Rondelez F., « Evidence of a transition temperature for the optimum deposition of grafted monolayer coatings », *Nature*, Vol. 360, pp 719-721 (1992)

Brzoska [2] J.B., Ben Azouz I., Rondelez F., « Silanization of solid substrates : a step toward reproducibility », *Langmuir*, 10, pp 4367-4373 (1994)

Buriak [1] J.M., Stewart M.P., Geders T.W., Allen M.J., Choi H.C., Smith J., Raftery D., Canham L.T., « Lewis acid mediated hydrosilylation on porous silicon surfaces », *J. Am. Chem. Soc.*, 121, pp 11491-11502 (1999)

Buriak [2] J.M., Allen M.J., « Lewis Mediated functionalization of porous silicon with substituted alkenes and alkynes », *J. Am. Chem. Soc.*, 120, pp 1339-1340 (1998)

Calvert J.M., « Lithographic patterning of self-assembled films », *J. Vac. Sci. Technol.*, B, Vol. 11, No. 6, pp 2155-2160 (1993)

Chan V., McKenzie S., Surrey S., Fortina P., Graves D., « Effect of hydrophobicity and electrostatics on adsorption and surface diffusion of DNA oligonucleotides at liquid/solid interfaces », *Journal of Colloid and Interface Science*, 203, pp 197-207 (1998)

Chee M., Yang R., Hubbell E., Berno A., Huang X., Stern D., Winkler J., Lockhart D., Morris M., Fodor S., « Accessing genetic information with high-density DNA arrays », *Science*, Vol. 274, pp 610-614 (1996)

Crabtree H.J., Bay S.J., Lewis D.F., Zhang J., Coulson L.D., Fitzpatrick G.A., Delinger S.L., Harrison D.J., Dovichi N., « Construction and evaluation of a capillary array DNA sequencer based on a micromachined sheathflow cuvette », *Electrophoresis*, 21, pp 1329-1335 (2000)

Cullis A.G., Canham L.T., Calcott P.D.J., « The structural and luminescence properties of porous silicon », *J. Appl. Phys.*, Vol. 82, No. 3, pp 909-956 (1997)

Davidovits J.V., Pho V., Silberzan P., Goldmann M., « Temperature influence on the formation of silanized monolayers on silica : an atomic force microscopy study », *Surface Science*, Vol. 352, pp 369-373 (1996)

Diehn M., Eisen M., Botstein D., Brown P., « Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays », *Nature Genetics*, Vol. 25, pp 58-62 (2000)

Docktycz M.J., Morris M., Dormady S., Beattie K., Jacobson K., « Optical melting of 128 octamer DANN duplexes », *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, No. 15, pp 8439-8445 (1995)

Drelich [1] J., Wilbur J., Miller J.D., Whitesides G., « Contact angles for liquid drops at a model heterogeneous surface consisting of alternating and parallel hydrophobic/hydrophilic strips », *Langmuir*, Vol. 12, pp 1913-1922 (1996)

Drelich [2] J., Miller J.D., Kumar A., Whitesides G., « Wetting characteristics of liquid drops at heterogeneous surfaces », *Colloids Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects*, 93, pp 1-13 (1994)

Drobyshev A.L., Zasedatelev A., Yershov G., Mirzabekov A., « Massive parallel analysis of DNA-Hoechst 33258 binding specificity with a generic oligodesoxyribonucleotide microchip », *Nucleic Acids Research*, Vol. 27, No. 20, pp 4100-4105 (1999)

Duchet J., Chabert B., Chapel J.P., Gerard J.F., Chovelon J.M., Jaffrezic-Renault N., « Influence of the deposition process on the structure of grafted alkylsilane layers », *Langmuir*, Vol. 13, No. 8, pp 2271-2278 (1997)

Elaissari A., Cros P., Pichot C., Laurent V., Mandrand B., « Adsorption of oligonucleotides onto negatively and positively charged latex particles », *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 83, pp 25-31 (1994)

Evans S.D., Flynn T.M., Ulman A., « Self-assembled multilayer formation on predefined templates », *Langmuir*, Vol. 11, No. 10, pp 3811-3814 (1995)

Flamm D.L., Donnelly V.M., « The design of plasma etchings », *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, Vol. 1, No. 4, pp 317-362 (1981)

Fotin A.V., Drobyshev A., Proudnikov D., Perov A., Mirzabekov A.V., « Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodesoxyribonucleotide microchips », *Nucleic Acids Research*, Vol. 26, No. 6, pp 1515-1521 (1998)

Ganachaud F., Elaïssari A., Pichot C., « Effect of Triton X-405 on the adsorption and desorption of single-stranded DNA fragments onto positively charged latex particles », *Langmuir*, 13, pp 7021-7029 (1997)

Gennes P.G. (de), « Wetting : statics and dynamics » *Reviews of Modern Physics*, Vol.57, No. 3, Part I, pp 827-861 (1985)

Goldmann T., Gonzalez J.S., « DNA-printing : utilization of a standard inkjet printer for the transfer of nucleic acids to solid supports », *J. Biochem. Biophys. Methods* 42, pp 105-110 (2000)

Gole J.L., Dudel F.P., Grantier D., « Origin of porous silicon photoluminescence : evidence for a surface bound oxyhydride-like emitter », *The American Physical Society, Physical Review B*, Vol. 56, No.4, pp 2137-2153 (1997)

Gray D.E., Case-green S.C., Fell T.S., Dobson P.J. Southern E.M., « Ellipsometric and interferometric characterization of DNA probes immobilized on a combinatorial array », *Langmuir*, 13, pp 2833-2842 (1997)

Gurtner C., Wun A.W., Sailor M.J., « Surface modification of porous silicon by electrochemical reduction of organo halides », *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 38, No. 13/14, pp 1966-1968 (1999)

Hacia[1] J.G., Sun B., Hunt N., Fodor S., Collins F., « Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays », *Genome Research*, Vol. 8, pp 1245-1258 (1998)

Hacia[2] J.G., Fan J., Ryder O., Lipshutz R., Fodor S., Collins F., « Determination of ancestral alleles for human single nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays », *Nature Genetics*, Vol. 22, pp 164-167 (1999)

Hansma H.G., Sinsheimer R., Groppe J., Bruice T., Elings V., Gurley G., Benazilla M., Mastrangelo I., Hough P., Hansma P., « Recent advances in atomic force microscopy of DNA », *Scanning*, Vol. 15, No. 5, pp 296-299 (1993)

Heller M.J., Forster A., Tu E., « Activ microelectronic chip devices which utilize controlled electrophoretic fields for multiplex DNA hybridization and other genomic applications », *Electrophoresis*, 21, pp 157-164 (2000)

Hoheisel[1] J.D., « Oligomer-chip technology », *Tibtech*, Vol 15, pp 465-469 (Novembre 1997)

Hoheisel[2] J.D., « Sequence-independent and linear variation of oligonucleotide DNA binding stabilities », *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, No. 3, pp 430-432 (1996)

Hu J., Wang M., Weier H., Frantz P., Kolbe W., Ogletree D., Salmeron M., « Imaging of single extended DNA molecules on flat (aminopropyl)triethoxysilane-mica by atomic force microscopy »

Janshoff [1] A., Neitzert M., Oberdörfer Y., Fuchs H., « Force spectroscopy of molecular systems-single molecule spectroscopy of polymers and biomolecules », *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, pp 3212-3237 (2000)

Janshoff [2] A., Dancil K.P.S., Steinem C., Greiner D.P., Lin V.S.Y., Gurtner C., Motesharei K., Sailor M.J., Ghadiri M.R., « Macroporous p-type silicon Fabry-Perot layers. Fabrication, characterization, and applications in biosensing », *J. Am. Chem. Soc.*, 120, pp 12108-12116 (1998)

Jeon N.L., Finnie K., Branshaw K., Nuzzo R.G., « Structure and stability of patterned self-assembled films of octadecyltrichlorosilane formed by contact printing », *Langmuir*, 13, pp 3382-3391 (1997)

Jeske M., Schulze J.W., Münder H., « Porous silicon : base material for nanotechnologies », *Electrochimica Acta*, Vol. 40, No. 10, pp 1435-1438 (1995)

Jung M.F. & al., *Journal of the American Society*, 99:3, pp 968-969 (1977)

Kain R.C. & al., *United States Patent*, No. 6008892, 28/12/1999

Kato Y., Ito T., Hiraki A., « Low temperature oxidation of crystalline porous silicon », *Appl. Surf. Sci.*, 41/42, pp 614-618 (1989)

Kaufman J., Le M., Ross G., Hing P., Andrus A., « Auto analysis : trityl monitoring of DNA synthesizer operation by conductivity », *Research News, Applied Biosystems Inc.* (1993)

Khodursky A.B., Peter B., Schmid M., DeRisi J., Botstein D., Brown P., Cozzarelli N., « Analysis to topoisomerase function in bacterial replication fork movement : use of DNA micro arrays », *PNAS*, Vol. 97, No. 17, pp 9419-9424 (2000)

Knotter D.M., « Etching mechanism of vitreous silicon dioxide in HF-based solutions », *J. Am. Chem. Soc.*, 122, pp 4345-4351 (2000)

Kumar[1] A., Biebuyck H.A., Whitesides G., « Patterning self-assembled monolayers : applications in materials science », *Langmuir*, 10, pp 1498-1511 (1994)

Kumar [2] A., Whitesides G., « Patterned condensation figures as optical diffraction gratings », *Science*, Vol. 263, pp 60-62 (1994)

Kurg A., Tönisson N., Georgiou I., Shumaker J., Tollett J., Metspalu A., « Arrayed primer extension : solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology », *Genetic Testing*, Vol. 4, No. 1, pp 1-7 (2000)

Kurian K.M., Watson C., Wyllie A., « DANN chip technology », *J. Pathol.* 187, pp 267-271 (1999)

Lahiri J., Ostuni E., Whitesides G., « Patterning ligands on reactive SAMs by microcontact printing », *Langmuir*, 15, pp 2055-2060 (1999)

Lehmann V., Föll H., « Formation mechanism and properties of electrochemically etched trenches in n-type silicon », *J. Electrochem. Soc.*, Vol. 137, No. 2, pp 653-659 (1990)

Le Toullec M. « Les Puces à ADN », *Industries et Techniques*, No. 789, pp 39-41 (Jan 1998)

Liberation, pp 60-63, 28-29/10/2000

Lipshutz R. J., Fodor S., Gingeras T., Lockhart D., « High density synthetic oligonucleotide arrays », *Nature Genetics Supplement*, Vol. 21, pp 20-24 (1999)

Livache [1] T., Bazin H., Caillat P., Roget A., « Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips », *Biosensors & Bioelectronics* 13, pp 629-634 (1998)

Livache [2] T., Fouque B., Roget A., Marchand J., Bidan G., Teoule R., Mathis G., « Polypyrrole DNA chip on a silicon device : example of hepatitis C virus genotyping », *Analytical Biochemistry* 255, pp 188-194 (1998)

Livache [3] T., Roget A., Dejean E., Barthet C., Bidan G., Teoule R., « Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group », *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, No 15, pp 2915-2921 (1994)

Maoz [1] R., Sagiv J., « Hydrogen-bonded multilayers of self-assembling silanes : structure elucidation by combined Fourier transform infra-red spectroscopy and X-ray scattering techniques », *Supramolecular Science*, Vol. 2, No. 1, pp 9-24 (1995)

Maoz [2] R., Sagiv J., « Penetration-controlled reactions in organized monolayer assemblies », *Langmuir*, Vol. 3, No. 6, Part I & II, pp 1034-1051 (1987)

Maskos U., Southern E., « Oligonucleotide hybridisations on glass supports : a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridisation properties of oligonucleotides synthesised in situ », *Nucleic Acids Research*, Vol. 20, No. 7, pp 1679-1684 (1992)

Mazzola L.T., Fodor S., « Imaging biomolecule arrays by atomic force microscopy », *Biophysical Journal*, Vol 68, pp 1653-1660 (1995)

McGovern M.E., Kallury K., Thompson M., « Role of solvent on the silanization of glass with octadecyltrichlorosilane », *Langmuir*, 10, pp 3607-3614 (1994)

Mengsu Y. & al., *Analytica Chimica Acta* 346, pp 259-275 (1997)

Min H-K., Yang H.S., Cho S.M., « Extremely sensitive optical sensing of ethanol using porous silicon », *Sensor and Actuators*, B 67, pp 199-202 (2000)

Mir K.U., Southern E.M., « Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays », *Nature Biotechnology*, Vol. 17, pp 788-792 (1999)

Möller R., Csáki A., Köhler J.M., Fritzsche W., « DNA probes on chip surfaces studied by scanning force microscopy using specific binding of colloidal gold », *Nucleic Acids Research*, Vol. 28, No. 20 e91 (2000)

Morita M., Ohmi T., Hasegawa E., Kawakami M., Ohwada M., « Growth of native oxide on a silicon surface », *J. Appl. Phys.* 68(3), pp 1272-1281 (1990)

Mosquet M., Chevalier Y., Le Perchec P., Guicquero J.P., « Synthesis of poly(ethylene oxide) with a terminal amino group by anionic polymerization of ethylene oxide initiated by aminoalcohols », *Macromol. Chem. Phys.*, 198, pp 2457-2474 (1997)

Moore S., « Making chips », *IEEE Spectrum*, pp 54-60 (Mars 2001)

Mrksich M., Whitesides G., « Using self-assembled monolayers to understand the interactions of manmade surfaces with proteins and cells », *Annu. Rev. Biomol. Struct.*, 65, pp 55-78 (1996)

Nau M.E., Emerson L.R., Martin R.K., Kyle D.E., Wirth D.F., Vahey M., « Technical assessment of the Affymetrix Yeast expression genechip YE6100 platform in a heterologous model of genes that confer resistance to antimalarial drugs in yeast », *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 38, No. 5, pp 1901-1908 (2000)

Osterholtz F.D., Pohl E.R., « Kinetics of the hydrolysis and condensation of organofunctional alkoxy silanes : a review », *J. Adhesion Sci. Technol.*, Vol. 6, No. 1, pp 127-149 (1992)

Parinov S., Barsky V., Yershov G., Kirillov E., Timofeev E., Belgovskiy A., Mirzabekov A., « DNA sequencing by hybridization to microchip octa- and decanucleotides extended by stacked pentanucleotides », *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, No. 15, pp 2998-3004 (1996)

Pease A.C., Solas D., Sullivan E.J., Cronin M.T., Holmes C.P., Fodor S., « Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis », *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, pp 5022-5026 (1994)

Pinkel D., Segraves R., Sudar D., Clark S., Albertson D., « High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays », *Nature Genetics*, Vol. 20, pp 207-211 (1998)

Pirrung M.C., Davis J., Odenbaugh A., « Novel reagents and procedures for immobilization of DNA on glass microchips for primer extension », *Langmuir*, 16, pp 2185-2191 (2000)

Plueddemann E.P., « Reminiscing on silane coupling agents », *J. Adhesion Sci. Technol.*, Vol. 5, No. 4, pp 261-277 (1991)

Pollack J.R., Perou C., Alizadeh A., Eisen M., Pergamenschikov A., Williams C., Jeffrey S., Botstein D., Brown P., « Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays », *Nature Genetics*, Vol. 23, pp 41-46 (1999)

Pompe T., Fery A., Herminghaus S., « Submicron contact printing on silicon using stamp pads », *Langmuir*, 15, pp 2398-2401 (1999)

Pon R.T., Usman N., Ogilvie K., « Derivatization of controlled pore glass beads for solid phase oligonucleotide synthesis », *Biotechniques*, Vol. 6, No. 8, pp 768-775 (1988)

Proudnikov D., Kirillov E., Chumakov K., Donlon J., Rezapkin G., Mirzabekov A., « Analysis of mutation in oral poliovirus vaccine by hybridization with generic oligonucleotide microchips », *Biologicals*, Vol. 28, pp 57-66 (2000)

Rönnebeck S., Carstensen J., Ottow S., Föll H., « Crystal orientation dependence of macropore growth in n-type silicon », *Electrochemical and Solid-State Letters*, 2(3), pp 126-128 (1999)

Sagiv J., « Organized monolayers by adsorption 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayer on solid surfaces », *J. Am. Chem. Soc.*, 102, pp 92-98 (1980)

Schmidt H., Scholze H., Kaiser A., « Principles of hydrolysis and condensation reaction of alkoxysilanes », *Journal of Non-Crystalline Solids*, 63, pp 1-11 (1984)

Schönherr H., Chechik V., Stirling C., Vancso G., « Monitoring surface reactions at an AFM tip : an approach to follow reaction kinetics in self-assembled monolayer on the nanometer scale », *J. Am. Chem. Soc.*, 122, pp 3679-3687 (2000)

Schöning M.J., Kurowski A., Thust M., Kordos P., Schultze J.W., Lüth H., « Capacitive microsensors for biochemical sensing based on porous silicon technology », *Sensors and Actuators*, B 64, pp 59-64 (2000)

Shalon D., « Gene expression micro-arrays : a new tool for genomic research », *Path. Biol.*, 46 No. 2, pp 107-109 (1998)

Shchepinov M.S., Case-Green S., Southern E., « Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays », *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 6, pp 1155-1161 (1997)

Shen W.-M., Tomkiewicz M., Levy-Clement C., « Impedance of porous Si », *J. Appl. Phys.* 76(6), pp 3635-3639 (1994)

Silberzan P., Leger L., Ausserre D., Benattar J.J., « Silanation of silica surfaces. A new method of constructing pure or mixed monolayers », *Langmuir*, 7, pp 1647-1651 (1991)

Sohail M., Southern E.M., « Antisense arrays », *Molecular Cell Biology Research Communications*, 3, pp 67-72 (2000)

Souteyrand [1] E., Cloarec J.P., Martin J.R., Cabrera M., Bras M., Chauvet J.P., Dugas V., Bessueille F., « Use of microtechnology for DNA chips implementation », *Applied Surface Science* 164, pp 246-251 (2000)

Souteyrand [2] E., Cloarec J.P., Martin J.R., Wilson C., Lawrence I., Mikkelsen S., Lawrence M.F., « Direct detection of the hybridization of synthetic homo-oligomer DNA sequences by field effect », *J. Phys. Chem. B*, Vol. 101, No. 15, pp 2980-2985 (1997)

Southern [1] E., Mir K., Shchepinov M., « Molecular interactions on microarrays », *Nature Genetics Supplement*, Vol. 21, pp 5-9 (1999)

Southern [2] E., « DNA chips : analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale », Vol. 12, No. 3, pp 110-115, *TIG March* (1996)

Southern [3] E., Case-Green S., Elder J., Johnson M., Mir K., Wang L., Williams J., « Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids », *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, No. 8, pp 1368-1373 (1994)

Stahlberg J., Appelgren U., Jönsson B., « Electrostatic interaction between a charged sphere and a charged planar surface in an electrolyte solution », *Journal of Colloid and Interface Science*, 176, pp 397-407 (1995)

Stemers F.J., Ferguson J., Walt D.R., « Screening unlabeled DNA targets with randomly order fiber-optic gene arrays », *Nature Biotechnology*, Vol. 18, pp 91-94 (2000)

Stomakhin A.A., Vasiliskov V., Timofeev E., Schulga D., Cotter R., Mirzabekov A., « DNA sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchips : MALDI mass spectrometry identification of 5-mers contiguously stacked to microchip oligonucleotides », *Nucleic Acids Research*, Vol. 28, No. 5, pp 1193-1198 (2000)

Strother T., Cai W., Zhao X., Hamers R., Smith L., « Synthesis and characterization of DNA-modified silicon (111) surfaces », *J. Am. Chem. Soc.*, 122, pp 1205-1209 (2000)

Tanuma S., Powell C.J., Penn D.R., « Calculations of electron inelastic mean free paths », *Surface and Interface Analysis*, Vol. 21, pp 165-176 (1994)

Theiß W., « Optical properties of porous silicon », *Surface Science Report*, Vol. 29, pp 91-192 (1997)

Thundat T., Warmack R.J., Allison D.P., Bottomley L.A., Lourenco A.J., Ferrell T.L., « Atomic force microscopy of DNA strands adsorbed on mica: the effect of humidity on apparent width and image contrast », *J. Vac. Sci. Technol.*, A 10(4), pp 630-635 (1992)

Thust M., Schöning M.J., Frohnhoff S., Arens-Fischer R., Kordos P., Lüth H., « Porous silicon as a substrate material for potentiometric biosensors », *Meas. Sci. Technol.*, 7, pp 26-29 (1996)

Tillman N., Ulman A., Schildkraut J., Penner T., « Incorporation of phenoxy groups in self-assembled monolayers of trichlorosilane derivatives: Effects on film thickness, wettability and molecular orientation », *J. Am. Chem. Soc.*, 110, pp 6136-6144 (1988)

Ulman A. « Formation and structure of self-assembled monolayers », *Chemical Reviews*, 96, pp 1533-1554 (1996)

Urban G., « Microstructuring of organic layers for microsystems », *Sensors and Actuators*, 74, pp 219-224 (1999)

Vahey M., Nau M., Barrick S., Cooley J., Sawyer R., Sleeker A., Vickerman P., Bloor S., Larder B., Michael N., Wegner S., « Performance of the Affymetrix genechip HIV PRT 440 platform for antiretroviral drug resistance genotyping of human immunodeficiency virus type1 clades and viral isolates with length polymorphisms », *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 37, No. 8, pp 2533-2537 (1999)

Vainrub A., Pettitt B., « Thermodynamics of association to a molecule immobilized in an electric double layer », *Chemical Physics Letters*, 323, pp 160-166 (2000)

Vasiliskov A.V., Timofeev E.N., Surzhikov S.A., Drobyshev A.L., Shick V.V., Mirzabekov A.D., « Fabrication of microarray of gel-immobilized compounds on a chip by copolymerization », *Biotechniques*, Vol. 27, No. 3, pp 592-606 (1999)

Wallraff G., Labadie J., Brock P., DiPietro R., Nguyen T., Huynh T., Hinsberg W., McGall G., « DNA sequencing on a chip », *Chemtech*, pp 22-32, Feb 1997

Wang D., Thomas S.G., Wang K.L., « Nanometer scale patterning and pattern transfer on amorphous Si, crystalline Si, and SiO₂ surfaces using self-assembled monolayers », *Appl. Phys. Lett.*, 70(12), pp 1593-1595 (1997)

Wasserman [1] S.R. Tao Y.T., Whitesides G., « Structure and reactivity of alkylsiloxane monolayers formed by reaction of alkyltrichlorosilanes on silicon substrats », *Langmuir*, Vol. 5, No. 4, pp 1074-1087 (1989)

Wasserman [2] S.R., Whitesides G., Tidswell I., Ocko B., Pershan P., Axe J., « The structure of self assembled monolayer of alkylsiloxanes on silicon » *J. Am. Chem. Soc.*, 111, pp 5852-5861 (1989)

Watanabe S., Nakayama N., Ito K., « Homogeneous hydrogen-terminated Si(111) surface formed using aqueous HF solution and water », *Appl. Phys. Lett.*, 59(12), pp 1458-1460 (1991)

Weiler J., Hoheisel J.D., « Combining the preparation of oligonucleotide arrays and synthesis of high quality primers », *Analytical Biochemistry*, 243, pp 218-227 (1996)

Westin L., Xu X., Miller C., Wang L., Edman C., Nerenberg M., « Anchored multiplex amplification on a microelectronic chip array », *Nature Biotechnology*, Vol. 18, pp 199-204 (2000)

Xia[1] Y., Whitesides G., « Soft lithography », *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, pp 550-575 (1998)

Xia[2] Y., Whitesides G., « Extending microcontact printing as a microlithographic technique », *Langmuir*, 13, pp 2059-2067 (1997)

Yang M., Mc Govern M., Thompson M., « Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry », *Analytica Chimica Acta*, 346, pp 259-275 (1997)
Yarwood J. & al., *Spectroscopy International*, Vol. 2, No. 2, pp 40-46 (1990)
Zenhausern F., Adrian M., Heggeler-Bordier B., Eng L.M., Descouts P., « DNA and RNA polymerase / DNA complex imaged by scanning force microscopy : influence of molecular scale friction » *Scanning*, Vol. 14, 212-217 (1992)

- [1] « Structural and optical properties of porous silicon nanostructure » Editeurs : Amato G., Delerue C., Barddeleben H.J.(von) ; Gordon and Breach Science Publishers
- Grosman A., Chap. 11, pp 317-330
 - Theiß W., Chap. 15, pp 451- 482
 - Morrazani V., Chap. 16, pp 483-533
 - Berger M.G., Chap. 18, pp 557-594
 - Lang W., Chap. 19, pp 597-619
- [2] « The Physics and Chemistry of SiO₂ and the Si-SiO₂ Interface », pp 5-34, (Ed.) Helms & Deal
[3] « Introduction to DNA and PCR », pp 1-12, Perkin Elmer (1995)
[4] « Les aspects théoriques de l'adhésion et du mouillage », GBX Instrument
[5] « Biotechniques 28, pp 492-496 (Mars 2000) »
[6] « Synthèse et utilisation des oligonucléotides » Editions Médicales Internationales, Huynh-Dinh T., (1993)
[7] « Intermolecular and Surface Forces » Academic Press, Israelachvili J.N., (1985)
[8] « Ultrathin Organic Films » Academic Press, Ulman A., (1991)

DEA & Thèses

Albrespy C., DEA « Génie des Procédés » de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy (1998)
Berroy P. Thèse SNPL, Nancy 2001
Bessueille F., DEA d'Analyse Physicochimique / Chimie analytique de l'Université C. Bernard Lyon I (1997)
Blondeau, Rapport de TFE ECL
Bras M, Thèse de l'Université C. Bernard Lyon I (2001)
Chen C., Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon (1998)
Cloarec J-P., Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon (1997)
Collet J., Thèse de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (1997)
Damlencourt J-F., Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon (2000)
Diot J-L., Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon (1984)
Dugas V., Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon (2001)
Dugas V., DEA d'Analyse Physicochimique / Chimie analytique de l'Université C. Bernard Lyon I (1998)
El Aarch L., Thèse de l'Université C. Bernard Lyon I (1996)
Ganachaud F. Thèse de l'Université C. Bernard Lyon I (1997)
Grosman A., Thèse de l'Université Paris VII (1995)
Lapeyrade M., Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon (1999)
Odoni L., Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon (1998)
Stricot Y., Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon (1986)

Informations Internet

@[1]:<http://www.zurich.ibm.com/Technology/Conprint/conprint.html>
@[2]:<http://argon.eecs.berkeley.edu:8080/manual/chap1.6>
@[3]:<http://www.nanogen.com/tech.htm>

ANNEXE 1

MODE OPERATOIRE ET PROTOCOLES D'HYBRIDATION

Dans ces travaux, nous avons utilisé successivement différentes séquences d'ADN.

Au départ, il s'agissait de deux séquences complémentaires, qui ont surtout été expérimentées sur des surfaces fonctionnalisées au GPTS, dans des tampons tris 10 mM, NaCl 50 mM, solutions électrolytiques de mesures électrochimiques. Ces deux séquences avaient une longueur de 15 bases :

656 : 5' C T T G C G G G G C G T T C G 3'

654 : 5' C G A A C G C C C C G C A A G 3'

L'hybridation s'effectuait sur une nuit, à température ambiante. Les substrats étaient ensuite lavés avec ce même tampon, à plusieurs reprises.

Nous avons ensuite utilisé deux séquences de 25 bases de long, possédant un nombre identique de chacune des quatre bases :

L185 : 5' G C T A A T C C A A C G C G G G C C A A T C C T T 3'

U226 : 5' C T A T G G A T C G T C C G C A T G G T A G G A G 3'

Pour les séquences U226 et L185, le TM (température de fusion du duplex) était de 57°C, obtenu en utilisant la formule relative au pourcentage G-C.

L'objectif était d'obtenir des propriétés proches (adsorption, diffusion, condition d'hybridation...), tout en pouvant vérifier la sélectivité des hybridations. L'augmentation de la taille permettait de niveler les températures de fusion des différents duplex et facilitait donc l'utilisation des puces.

Notre expérience nous a permis de montrer que la sélectivité demeurait, avec cette longueur de sonde, sur les puces à ADN.

Toutes ces séquences, ainsi que le mode opératoire, nous ont été fournis par le laboratoire LEMS de l'Université Claude Bernard, Lyon 1.

Mises à part les expérimentations électrochimiques sur nos puces, nécessitant le tampon tris habituel, nos expériences ont été réalisées avec les tampons communément utilisés par les biochimistes, ceci afin de nous situer dans des conditions plus proches de celles que connaîtront les utilisateurs potentiels de puces à ADN.

La composition du tampon est la suivante :

30% de SSC 20X (solution 0,3 M de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 2H₂O et 3 M de NaCl), 5% de Denhardt's (2% de polyvinylpyrrolidone, 2% d'albumine de sérum bovin, 2% de ficoll 400, 94% H₂O), 5% de SDS 10% (solution de sel de dodécylsulfate de sodium 10% en masse), et 60% d'eau pure.

Pour obtenir une hybridation maximale oligonucléotides contre oligonucléotides, tout en conservant une bonne sélectivité, on maintient la température à 47°C pendant 30 minutes. On utilise des solutions formées du tampon et de 5 ng/μl d'oligonucléotides. On pratique des lavages au SSC, de stringence croissante, jusqu'à élimination du bruit de fond biologique sur les plots non complémentaires (par exemple : SSC 2X ou 1,5X pendant ½ heure à 47°C).

ANNEXE 2

LA CARTOGRAPHIE DE FLUORESCENCE

Cette technique d'analyse permet d'effectuer des mesures de fluorescence en des points donnés de l'échantillon, à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission fixes. Une cartographie de fluorescence d'une surface peut ainsi être obtenue. L'appareil que nous utilisons a été mis au point au LEOM par M. Garrigues pour effectuer des mesures de photoluminescence, puis adapté pour la cartographie de fluorescence de puces à ADN. Il est composé d'un laser à argon accordable, comme source excitatrice monochromatique, d'un système de filtres, d'un objectif de microscope permettant d'obtenir des résolutions de 20 μm , et d'un tube photomultiplicateur qui sert de détecteur (figure A.2-1). Le déplacement de l'échantillon dans le plan de mesures (x, y) est assuré par deux tables motorisées, le degré de liberté vertical permet le réglage de la position de la puce à la distance focale du système optique (la profondeur de champ de l'objectif utilisé est de 100 μm).

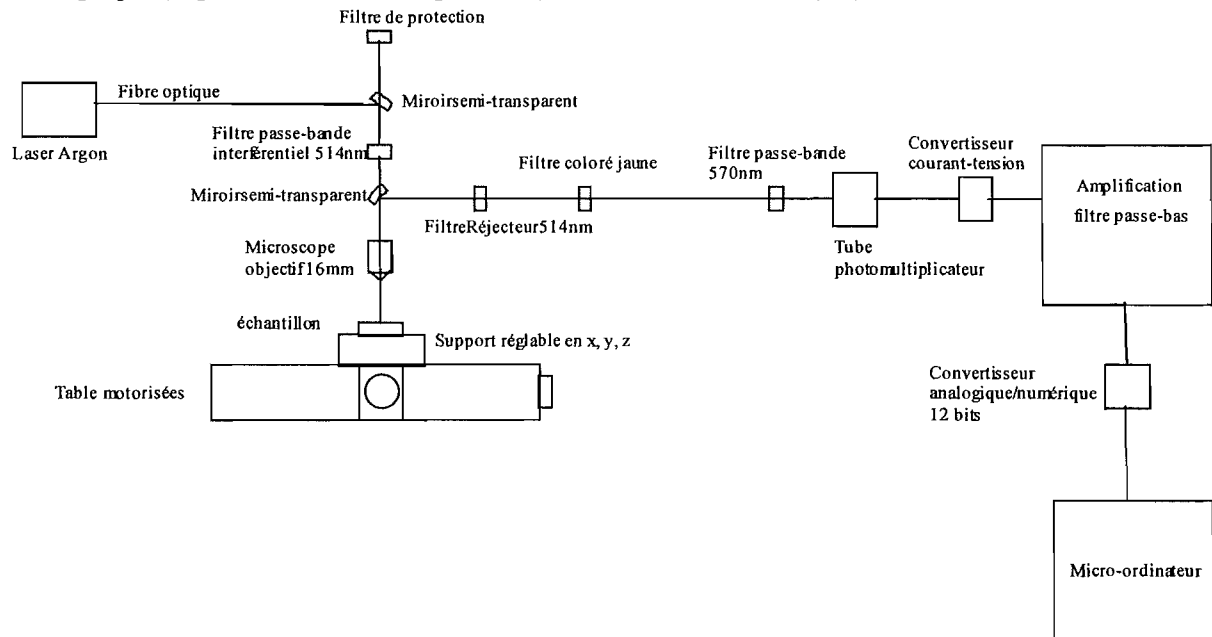


Fig (A.2-1) : Schéma de principe du banc de cartographie de fluorescence du type Plscan (adapté à la détection du groupement fluorophore CY3).

La fluorescéine était utilisée pour les premières mesures de fluorescence effectuées au laboratoire. Ce groupement fluorophore a permis à M. Bras de valider les mesures de fluorescence sur nos substrats. Le problème rencontré avec la fluorescéine a été la diminution de l'intensité du signal de fluorescence lors de mesures successives. Ce phénomène, attribué à la dégradation du fluorophore, est appelé Photoblanchiment (photobleaching). A la suite de ces constatations, le choix du groupement fluorophore s'est orienté vers la famille des carbocyanines. L'indodicarbocyanine 3 (CY3) a été retenue (fig. A.2-2).

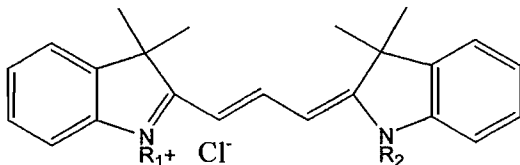


Fig (A.2-2) : Indodicarbocyanine 3 : CY3. R_1 ou R_2 permettent la fixation du CY3 sur les oligonucléotides.

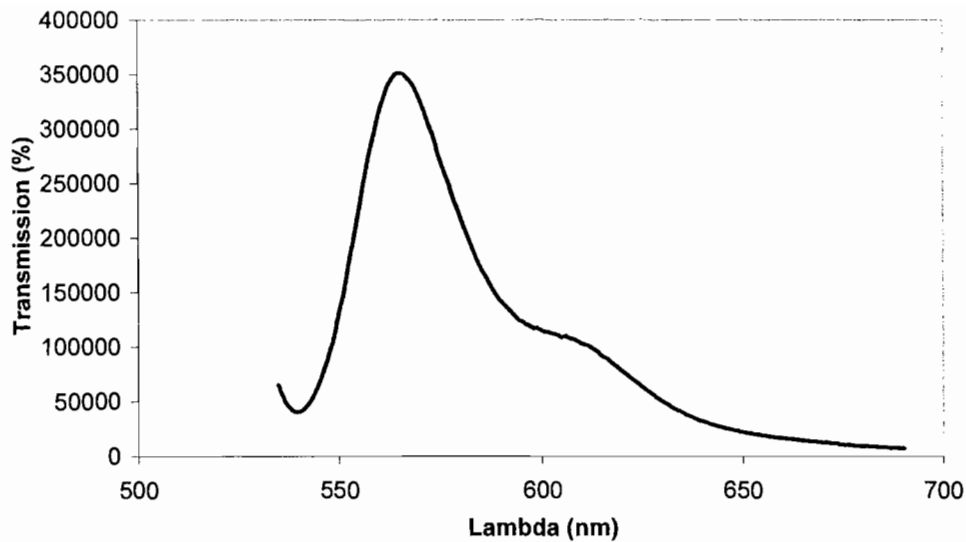


Fig (A.2-3) : Spectre d'émission du groupement fluorophore CY3 (intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde) d'après M. Bras (Bras 2000).

Les caractéristiques d'absorption du CY3 présentent un maximum pour une longueur d'onde proche de 515 nm ; les caractéristiques d'émission du CY3 (fig.A.2-3) présentent un maximum pour une longueur d'onde proche de 570 nm. Ces longueurs d'ondes séparées de 55 nm définissent les caractéristiques des filtres d'entrée et de sortie du montage expérimental.

Les différentes représentations des cartographies sont proposées dans le logiciel de pilotage du banc de mesures (logiciel Plscan de la société Scantec).

Les mesures de fluorescence présentées dans ce mémoire de thèse ont été effectuées après séchage des échantillons sous flux d'azote.

Dans un cadre plus général, les mesures de fluorescence sur support solide mettent en évidence des problèmes de mesures, liés à la concentration des groupements fluorophores proches de la surface (réabsorption et quenching), qui limitent pour l'instant cette technique analytique aux domaines qualitatifs ou semi-quantitatifs.

ANNEXE 3

UTILISATION DE LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (FTIR)

Principe

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est une technique d'analyse basée sur l'absorption d'un signal infrarouge par les liaisons inter-atomiques, avec lesquelles le rayonnement IR entre en interaction (Yarwood 1990). L'absorption infrarouge se traduit par une variation de moment dipolaire autour de la liaison inter-atomique considérée. Seules les liaisons inter-atomiques pouvant présenter des variations de moment dipolaire lors de l'absorption sont susceptibles d'interagir.

Les spectromètres FTIR sont schématiquement composés d'une source, d'un interféromètre, comprenant un miroir semi-réfléchissant, un miroir fixe et un miroir mobile, et d'un détecteur (figure A.3.1).

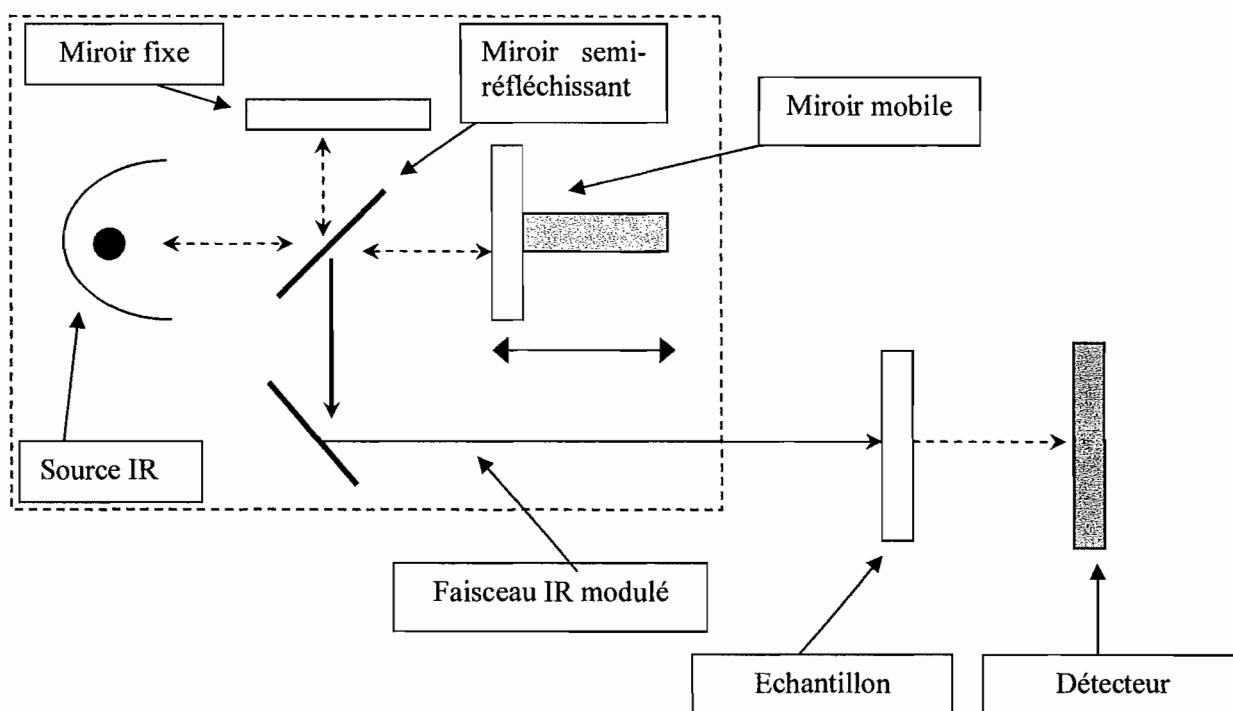


Figure A.3.1 : Schéma d'un spectromètre FTIR.

Une source IR est utilisée pour produire un signal sur une large gamme de fréquences IR. Ce signal est divisé en deux par un miroir semi-réfléchissant. Une partie du signal est transmise vers un miroir mobile alors que l'autre partie du signal est réfléchie vers un miroir fixe.

Le miroir mobile induit une différence de chemin optique entre les deux faisceaux qui se recombinent en fonction de leur différence de phase, aboutissant à un interférogramme du signal.

Le signal recombinaé est dirigé vers l'échantillon à analyser. Un détecteur infrarouge collecte en sortie le signal dont une partie a été absorbée par l'échantillon. La transformée de Fourier du signal collecté est effectuée pour aboutir à un spectre, qui donne l'intensité du signal en sortie, en fonction du nombre d'ondes.

La configuration de travail présentée dans la figure A.3.1 correspond à une analyse en transmission. Des ustensiles intercalés entre la source IR modulée et le détecteur permettent les analyses en réflexion spéculaire. Une sphère intégratrice, placée autour de l'échantillon, recueille les signaux de réflexion diffuse.

Les expériences FTIR présentées dans ce recueil de thèse, ont été réalisées sur un spectromètre FTIR Nexius de Nicolet, pourvu de ses accessoires standards. Ces expériences ont été réalisées au LMOPS du CNRS de Solaize.

Mode opératoire

Les spectromètres FTIR n'ont pas de signal de référence si bien qu'il est nécessaire d'enregistrer un blanc (background) avant d'acquérir un spectre. Ce blanc permet d'éliminer les signaux parasites d'absorption de l'atmosphère, du détecteur et du système d'émission. Les mesures sont effectuées après une purge de l'appareillage sous gaz sec, afin de limiter l'absorption due à l'eau et au dioxyde de carbone. Les spectres d'échantillon sont ensuite collectés en prenant pour référence le blanc. Pour les mesures en réflexion, le blanc est mesuré sur les substrats, en prenant comme référence une étape d'élaboration précédente du substrat.

Les mesures ont été effectuées sur une gamme de nombres d'onde allant de 400 à 4000 cm^{-1} avec un pas allant de 1 à 4 cm^{-1} .

La correction de ligne de base a été effectuée sur le logiciel de traitement de spectres du spectromètre Nexius.

Les résultats d'infrarouge présentés dans ce mémoire de thèse ont été obtenus sur silicium poreux avec l'accessoire de réflexion spéculaire.

ANNEXE 4

UTILISATION DE LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique de microscopie à champ proche, dont le principe a été inspiré du microscope à effet tunnel. L'avantage de l'AFM par rapport à la microscopie à effet tunnel est qu'elle peut opérer sur des matériaux non-conducteurs. La microscopie à force atomique permet de réaliser des images topographiques de surface à haute résolution avec un champ de vision allant de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de microns. L'AFM s'est imposée comme une technique de référence pour l'analyse de la structure de films organiques greffés, en raison de la possibilité d'atteindre des résolutions importantes sur des substrats organiques, sans avoir recours à une technique d'imagerie sous vide. De nombreuses équipes travaillent notamment aux caractérisations de biomolécules, de l'ADN et des puces à ADN par cette méthode (Allen 1992, Allen 1993, Ballardur 1997, Bezanilla 1993, Hansma 1993, Hu 1996, Janshoff [1] 2000, Mazzola 1995, Möller 2000, Thundat 1992, Zenhausern 1992).

Le microscope utilisé dans ces travaux est un « Autoprobe CP » de Park Scientific.

Les microscopes AFM comprennent un micro-levier, une diode laser, un détecteur, constitué de deux ou quatre photodiodes et une céramique piézoélectrique qui permet de déplacer l'échantillon en x, y et z (figure A.4.1). A l'extrémité du micro-levier se trouve une pointe, généralement en nitrure de silicium.

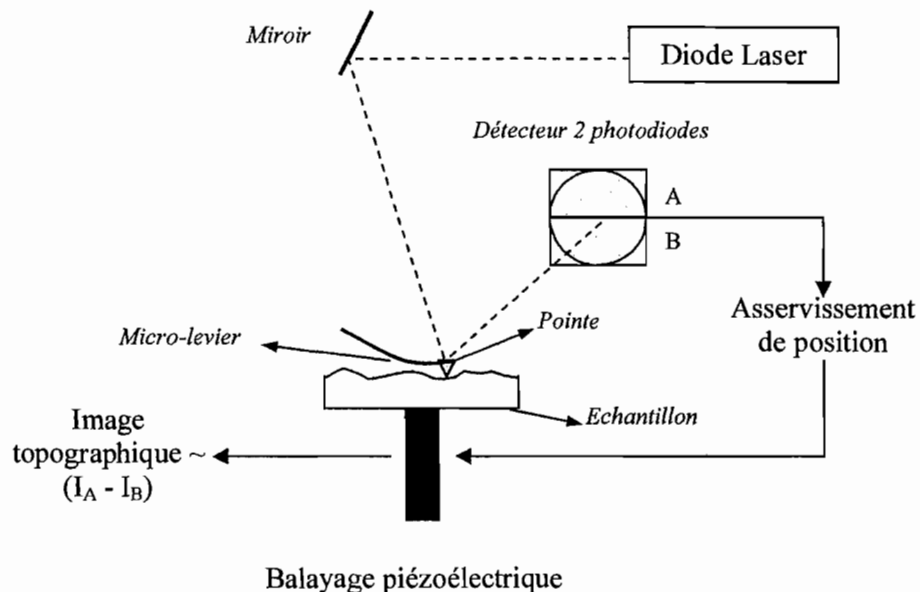


Figure A.4.1 : Principe du microscope de force atomique.

L'image topographique de la surface est obtenue en enregistrant la déflexion du micro-levier en fonction de la position horizontale donnée par le système de balayage piézoélectrique. Un rayon laser est dirigé, à l'aide d'un miroir, sur le dos de la pointe, où il se réfléchit, pour aller frapper un détecteur à deux ou quatre photodiodes. Le rayon laser est initialement positionné au centre du photodétecteur ($I_A - I_B = 0$). Les interactions entre la pointe et l'échantillon induisent un déplacement vertical du micro-levier et donc une déflexion du rayon laser. Cette déflexion génère un signal d'erreur $I_A - I_B \neq 0$, qui pilote une boucle d'asservissement modulant la tension de balayage vertical appliquée au piézoélectrique. Le signal d'erreur ainsi que la tension appliquée au piézoélectrique permettent de réaliser l'image topographique.

Deux modes peuvent être utilisés pour réaliser des images topographiques de surface :

Mode contact :

La pointe est en contact avec l'échantillon pendant le balayage piézoélectrique. Deux types de fonctionnement peuvent être utilisés :

- Déflexion constante ou force constante : Le signal d'erreur est utilisé par la boucle d'asservissement pour maintenir constante la déflexion du micro-levier en modulant la tension du balayage piézoélectrique vertical. Cette tension permet de réaliser l'image topographique.
- Hauteur constante : la déflexion du micro-levier sur l'échantillon est utilisée pour reconstruire la topographie de sa surface en utilisant directement le signal d'erreur. Ce mode de fonctionnement se limite aux surfaces très peu rugueuses.

Les images en mode contact présentées dans ces travaux ont été réalisées à force constante. L'acquisition du signal d'erreur permet de valider les conditions de mesures (force appliquée sur la pointe, vitesse de déplacement de la pointe, gain de la boucle d'asservissement). Le signal d'erreur doit rester de l'ordre du bruit de fond électronique et ne pas retranscrire la topographie de l'échantillon. Le signal LFM permet également de valider les images topographiques. L'utilisation de leviers très souples pour l'observation de couches organiques permet de les préserver mais risque d'entraîner, dans le cas de substrats hydrophiles, une déformation latérale importante du levier, qui, s'il dépasse la saturation du signal LFM, entraîne la perturbation du signal vertical de topographie.

Les forces mises en jeu dans le mode contact sont de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} N. Les forces de friction (Lateral Force Microscopy LFM) sont mesurables dans le cas de microscopes équipés d'un photodétecteur à 4 photodiodes.

Mode Contact intermittent :

En mode contact intermittent, la pointe, oscillant au-dessus de l'échantillon, entre au contact de l'échantillon, de façon intermittente, pendant le balayage de la surface. Les interactions entre la pointe et l'échantillon induisent une modification de la fréquence de résonance de la pointe. Ces interactions peuvent être mesurées en modulation d'amplitude, ou en modulation de fréquence.

L'intérêt du mode contact intermittent est de réduire les forces de friction qui peuvent, sous certaines conditions, perturber la réalisation d'images topographiques, et endommager la surface.

Les images en mode contact intermittent présentées dans ces travaux ont été réalisées à la fréquence libre de résonance de la pointe. Dans le cadre d'analyses de matériaux organiques fragiles, la consigne d'atténuation d'amplitude doit être la plus faible possible, tout en assurant le contact intermittent, afin de transmettre le minimum d'énergie lors du contact pointe - échantillon. De même, l'amplitude libre de résonance doit être minimisée, tout en tenant compte de la rugosité et de la topographie des substrats.

Un paramètre qui permet d'apprécier la topographie d'une surface est la rugosité. Il est donné par le calcul de la RMS (rugosité moyenne standard), de la Ra (rugosité moyenne) ou de la Rp-v (« pic to valley » écart maximal entre sommet et creux sur une image ou une ligne : $Z_{Max}-Z_{Min}$). Les valeurs de RMS (rugosité moyenne standard) obtenues pour chaque échantillon permettent la comparaison de l'état de surface des échantillons Si/SiO₂ et Si/SiO₂ greffés. La RMS et la Ra sont données par les équations 1 et 2 :

$$Ra = \sum_{n=1}^N \frac{|z_n - z|}{N} \quad \text{Equation 1}$$

$$RMS = \sqrt{\sum_{n=1}^N \frac{(z_n - z)^2}{N - 1}} \quad \text{Equation 2}$$

ANNEXE 5

LE MOUILLAGE

A.5.1 Mesure de l'angle de contact

L'énergie de surface est la résultante des forces d'attraction et de répulsion existant entre les matériaux présents au voisinage de la zone de séparation de chacune des phases. Cette énergie de surface est représentée par la tension superficielle, dans le cas d'un liquide en équilibre avec sa vapeur, ou par la tension interfaciale pour des systèmes solide-liquide ou liquide-liquide, non miscibles.

La mesure de l'énergie libre de surface d'un solide est déduite de la mesure de l'angle de contact de liquides sondes de tension superficielle connue sur le solide. La mesure de l'angle de contact se fait à la jonction des trois phases : liquide, solide et gazeuse, mises en jeu lorsque le liquide sonde est déposé sur le solide (figure A.5.1).

L'appareil utilisé lors de ces travaux est un « Digidrop » de GBX instrument.

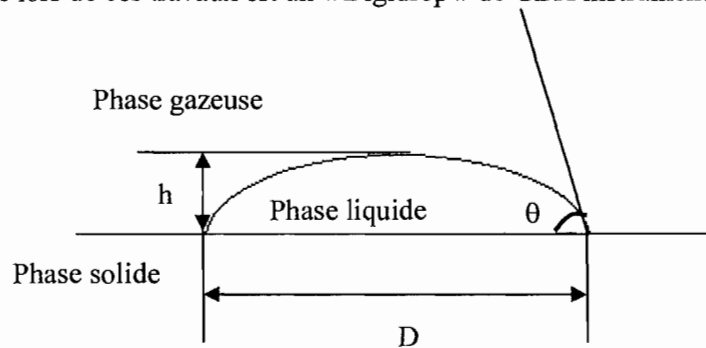


Figure A.5.1 : Détermination géométrique de l'angle de contact d'un liquide en contact avec un solide.

La détermination de l'angle de contact permet d'évaluer l'affinité d'une surface vis-à-vis d'un liquide sonde. Le volume de la goutte étant fixe, l'angle de contact θ est déduit de la géométrie de la goutte déposée sur le solide (figure A.5.1), selon la formule :

$$\theta = 2 \arctg (2h/D) \quad \text{éq.1}$$

A.5.2. Détermination de l'énergie libre de surface d'un solide en fonction de l'angle de contact liquide - solide

Pour un liquide déposé sur un solide, la relation entre les tensions superficielles de surface et l'angle de contact θ formé par le liquide sur le solide, est donnée par l'équation d'Young :

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos \theta \quad \text{éq.2}$$

$$\gamma_{sv} = \gamma_{s0} - \pi_e \quad \text{éq.3}$$

avec γ_{sv} tension superficielle de surface du solide en présence des vapeurs du liquide

γ_{sl} tension superficielle d'interface solide - liquide

γ_{lv} tension superficielle du liquide en présence de sa vapeur

γ_{s0} tension superficielle du solide

π_e pression d'étalement du liquide sur le solide

L'énergie de surface est définie par rapport aux tensions superficielles par la relation :

$$E_s = \gamma_{sv} - T(\delta\gamma_{sv}/\delta T)$$

Pour un liquide en contact avec un solide, la relation de Dupré permet d'exprimer l'énergie réversible d'adhésion W_{sl} en fonction des énergies libres de surface mises en jeu :

$$W_{sl} = \gamma_{s0} + \gamma_{lv} - \gamma_{sl} \quad \text{éq. 4}$$

En négligeant la pression d'étalement π_e , les équations 2, 3 et 4 permettent d'écrire l'énergie réversible d'adhésion en fonction de l'angle de mouillage :

$$W_{sl} = \gamma_{lv}(1 + \cos \theta) \quad \text{éq. 5}$$

Fowkes a montré que, pour une interface entre deux matériaux, dont, au moins un, ne peut échanger que des interactions de dispersion de London (matériau apolaire), l'énergie réversible d'adhésion pouvait s'exprimer selon la moyenne géométrique des composantes dispersives de l'énergie libre de surface des matériaux mis en jeu, selon l'équation suivante :

$$2(\gamma_1^d \cdot \gamma_2^d)^{1/2} = W_{12} \quad \text{éq. 6}$$

où γ_i^d représente la composante dispersive de l'énergie libre de surface du matériau i .

Owens et Wendt ont généralisé l'approche de Fowkes et ont exprimé l'énergie d'adhésion en termes de contribution des interactions dispersives γ^d et non-dispersives γ^{nd} des énergies libres des surfaces mises en jeu selon la formule :

$$W_{12} = 2(\gamma_1^d \cdot \gamma_2^d)^{1/2} + 2(\gamma_1^{nd} \cdot \gamma_2^{nd})^{1/2} \quad \text{éq. 7}$$

Dans le cas d'une interface liquide - solide et d'après les équations 5 et 7, on peut exprimer les énergies libres de surface en fonction de l'angle de contact θ d'un liquide l déposé sur un solide s selon la formule :

$$\gamma_{lv}(1 + \cos \theta) = 2(\gamma_s^d \cdot \gamma_l^d)^{1/2} + 2(\gamma_s^{nd} \cdot \gamma_l^{nd})^{1/2} \quad \text{éq. 8}$$

où γ_s^d représente la composante dispersive de l'énergie libre de surface du solide,
 γ_l^d représente la composante dispersive de l'énergie libre de surface du liquide,
 γ_s^{nd} représente la composante non-dispersive de l'énergie libre de surface du solide,
 γ_l^{nd} représente la composante non-dispersive de l'énergie libre de surface du liquide.

D'après l'équation 8 on peut écrire :

$$\gamma_{lv}(1 + \cos \theta) / [2(\gamma_l^d)^{1/2}] = (\gamma_s^d)^{1/2} + \gamma_s^{nd} [(\gamma_l^{nd})^{1/2}/(\gamma_l^d)^{1/2}] \quad \text{éq. 9}$$

On voit d'après l'équation 9 que l'expression $\gamma_{lv}(1 + \cos \theta) / [2(\gamma_l^d)^{1/2}]$ est une fonction linéaire de $[(\gamma_l^{nd})^{1/2}/(\gamma_l^d)^{1/2}]$ dont la pente est $(\gamma_s^{nd})^{1/2}$, composante non-dispersive de l'énergie libre de surface du solide, et dont l'ordonnée à l'origine est $(\gamma_s^d)^{1/2}$, composante dispersive de l'énergie libre de surface du solide.

La méthode de détermination de l'énergie libre de surface, employée au cours de cette étude, est basée sur l'utilisation de l'équation 9. Deux liquides sondes, l'eau ultra-pure et le diiodométhane, dont les composantes dispersives et non-dispersives de l'énergie libre de surface sont connues (tableau A.5.1), sont déposés sur le solide. Après mesure de leur angle de contact, les composantes dispersives et non-dispersives de l'énergie de surface du solide sont déduites de la droite $\gamma_{lv}(1 + \cos \theta) / [2(\gamma_l^d)^{1/2}] = f([(\gamma_l^{nd})^{1/2} / (\gamma_l^d)^{1/2}])$.

	Composante dispersive mJ/m ²	Composante non dispersive mJ/m ²	Tension superficielle mJ/m ²
Eau ultra-pure	21,8	51	72,8
Diiodométhane	48,5	1.3	49,8

Tableau A.5.1 : Composante dispersive et non-dispersive de l'eau ultra-pure et du diiodométhane.

La validité des mesures, ainsi que des théories permettant leur interprétation, est conditionnée par de nombreux facteurs expérimentaux. Les conditions essentielles à respecter sont :

- La planéité des substrats.
- L'absence de réaction entre liquide-sonde et substrat.
- La saturation en vapeur du liquide-sonde dans l'enceinte de mesures.

Cette méthode est inadaptée aux surfaces de faibles dimensions (le volume des gouttes doit être compris entre 2 et 5 μ l) ; elle ne permet pas de vérifier si la tension superficielle des liquides n'a pas évolué au cours des mesures.

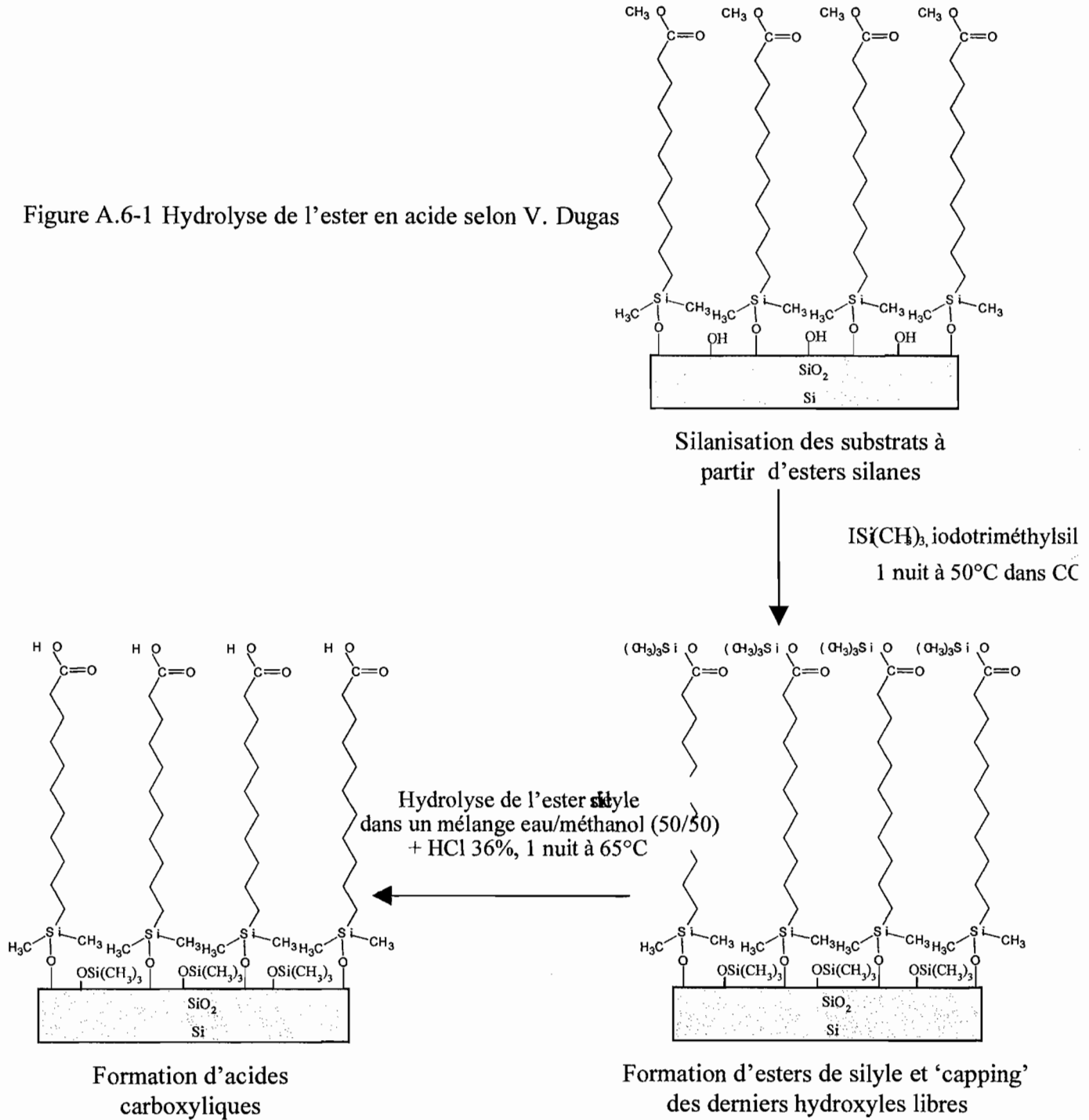
Références : ([4]GBX Instrument), (Genes 1985).

ANNEXE 6

HYDROLYSE ET ACTIVATION DES ESTERS GREFFES

Références : (Dugas 2001), (Jung 1977)

Figure A.6-1 Hydrolyse de l'ester en acide selon V. Dugas



La première étape de ces transformations chimiques des esters de méthyle consiste en la formation d'un ester de silyle par mise en présence des esters de méthyle avec l'iodotriméthylsilane. On obtient ensuite un acide carboxylique par hydrolyse aqueuse de l'ester de silyle.

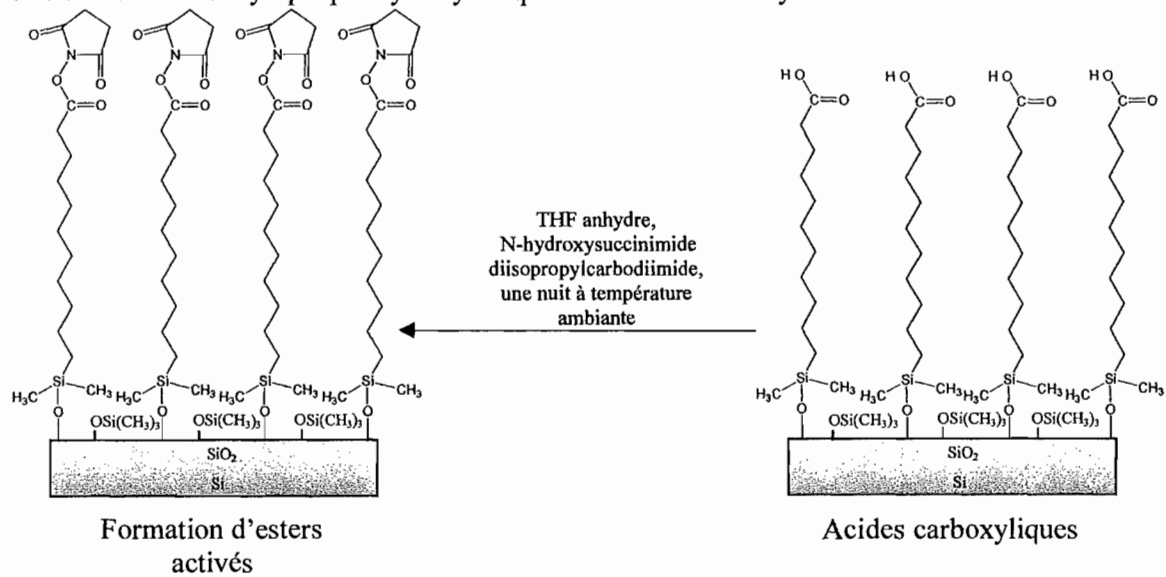


Fig A.6.2 Activation des acides carboxyliques selon V. Dugas.

Les acides carboxyliques sont transformés en esters activés par l'action conjointe de la diisopropylcarbodiimide et du n-hydroxysuccinimide (NHS) dans du tétrahydrofurane (THF) anhydre pendant une nuit à température ambiante.

Il est préférable de mettre rapidement en œuvre les esters activés pour des greffages d'amino-espaces, afin de limiter leur hydrolyse en acide sous l'effet de traces d'eau.

ANNEXE 7

SPECTROMETRIE XPS

Principe de la technique

La spectrométrie de photoélectrons X (XPS) est une technique d'analyse élémentaire des surfaces ou des films de faible épaisseur (Damlencourt, Thèse 2000, Lapeyrade, Thèse 1999).

La spectrométrie XPS analyse des électrons éjectés par la cible excitée par un faisceau de photons X ; ces électrons sont appelés photoélectrons. La détection de ces photoélectrons est une détection en énergie cinétique, effectuée à l'aide d'un analyseur électrostatique.

L'énergie cinétique des photoélectrons éjectés dépend de l'énergie $h\nu$ des photons X incidents et de l'énergie de liaison E_l de l'électron éjecté de sa couche électronique. En première approximation :

$$E_c = h\nu - E_l$$

Ainsi l'information apportée par la spectrométrie de photoélectrons X concerne la composition atomique de la surface analysée, chaque type d'atomes ayant des valeurs d'énergie (E_l) caractéristiques des différentes couches du cortège électronique de l'atome.

Il est possible de détecter de faibles variations d'énergie de liaison (E_l) pour le même type d'atomes, en fonction de leur degré d'oxydation et de leur environnement chimique (type de liaison inter-atomique dans la matière) ; ces décalages sont appelés « déplacements chimiques ».

(ESCA = Electron Spectroscopy for Chemical Analysis)

Les épaisseurs de matériaux analysés dépendent uniquement du libre parcours moyen des photoélectrons (λ) éjectés et de l'angle de détection (θ , variable), c'est-à-dire de la distance moyenne qu'ils sont susceptibles de parcourir sans perte d'énergie au sein du solide.

En admettant, en première approximation, que l'épaisseur maximale sondée est égale à trois fois la valeur du libre parcours moyen ($3\lambda\sin\theta$), l'information fournie par ces photoélectrons est caractéristique de quelques dizaines d'Angströms. Une analyse angulaire ainsi que la connaissance de certains paramètres des matériaux analysés permettent d'estimer l'épaisseur des films superficiels. Il est intéressant de souligner que la spécificité de la mesure à l'extrême surface peut être exaltée en diminuant θ .

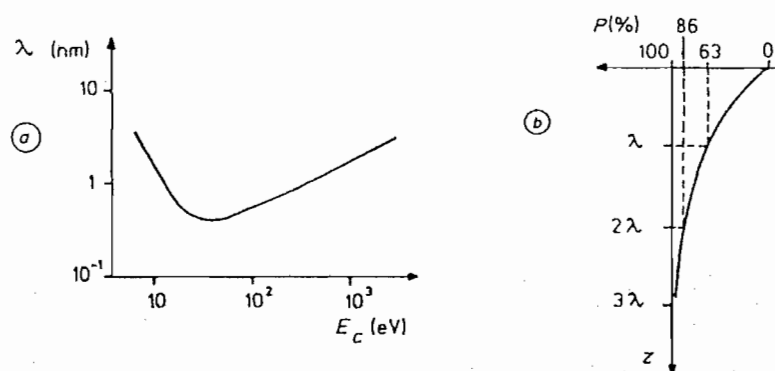


Figure (A-7.1) : Courbe universelle de libres parcours moyen pour des électrons d'énergie cinétique comprise entre 10 et 1500 eV a), contribution à l'intensité émise, des différentes couches en fonction de leur profondeur b)

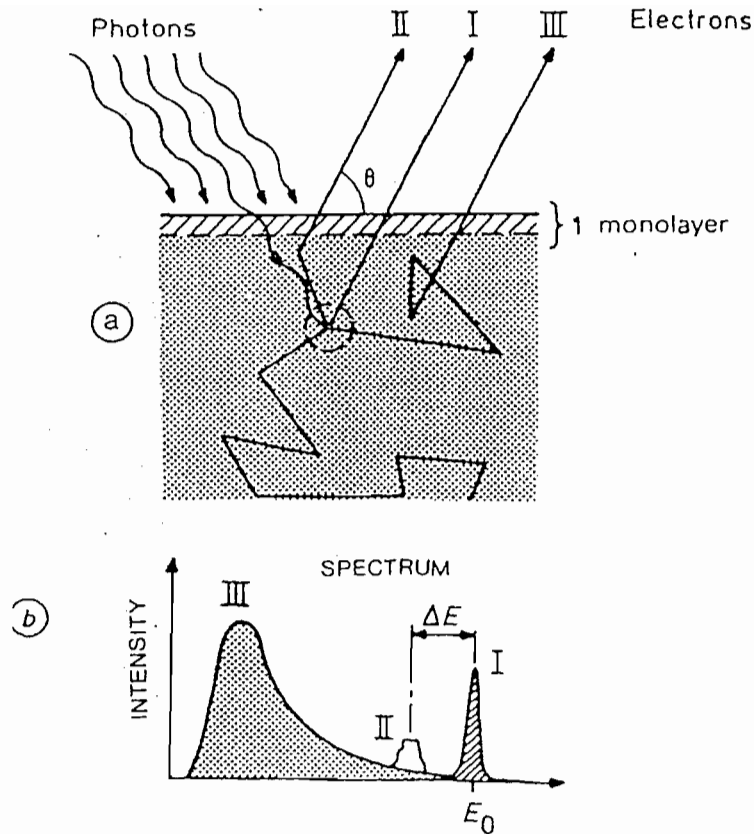


Figure (A-7.2) : Schéma du modèle de Spicer décrivant le phénomène de photoémission dans les solides en trois étapes (a). Courbe de distribution de l'énergie des électrons primaires (I) et secondaires (II) et (III) (b)

Le domaine d'application de l'analyse XPS est l'analyse en ultraviolette ($<10^{-8}$ mm Hg) d'échantillons conducteurs ou isolants pour tous les éléments de $Z > 2$, avec des sensibilités très variables en fonction de la section efficace de photoionisation de chaque élément.

Nous avons réalisé des caractérisations XPS sur un spectromètre de marque V.S.W. disponible au laboratoire LEOM. La source de rayons X est munie d'une anticathode en aluminium. Un monochromateur à rayons X permet de sélectionner la raie $AlK\alpha$ ($h\nu = 1486,6$ eV) et d'atteindre une largeur spectrale de l'ordre de 0,2 eV. La résolution totale de la chaîne de mesures est de 0,3 et 0,4 eV.

L'origine de toutes les analyses semi-quantitatives faites en XPS est basée sur l'exploitation de la formule générale :

$$I_z = T.F.N.\sigma.\lambda \left[1 - \exp\left(-\frac{z}{\lambda \cdot \sin \theta}\right) \right]$$

I_z représente le nombre de photoélectrons mesurés, provenant d'une couche d'épaisseur Z et émis dans la direction de détection (angle θ), en considérant que l'atténuation des photons est négligeable sur cette épaisseur, λ le libre parcours moyen des électrons, T le facteur de transmission instrumental, F le flux de photons, N la densité atomique et σ la section efficace de photoionisation.

Quand l'épaisseur de l'échantillon est très grande (z tend vers l'infini), la relation précédente conduit à :

$$I^\infty = T.F.N.\sigma.\lambda$$

On peut aussi écrire :

$$I_z = I^\infty \left[1 - \exp\left(-\frac{z}{\lambda \cdot \sin \theta}\right) \right]$$

Le rapport des concentrations des éléments A et B dans un film AB d'épaisseur z peut être relié au rapport des intensités des photopics correspondants en utilisant cette relation :

$$\frac{I_z^A}{I_z^B} = \frac{T(E) \cdot F \cdot N_A \cdot \sigma_A \cdot \lambda_A}{T(E) \cdot F \cdot N_B \cdot \sigma_B \cdot \lambda_B} \times \frac{\left[1 - \exp\left(-\frac{z}{\lambda_A \cdot \sin \theta}\right) \right]}{\left[1 - \exp\left(-\frac{z}{\lambda_B \cdot \sin \theta}\right) \right]}$$

Le flux de photons F peut être éliminé, puisqu'il est le même pour les deux éléments. Si les photopics sont proches en énergie, les énergies cinétiques des photoélectrons émis par chaque élément sont voisines, et le facteur de transmission T peut également être éliminé. Nous déduisons donc le rapport des densités atomiques :

$$\frac{N_B}{N_A} = \frac{I_z^B}{I_z^A} \times \frac{\sigma_A \cdot \lambda_A}{\sigma_B \cdot \lambda_B} \times \frac{\left[1 - \exp\left(-\frac{z}{\lambda_A \cdot \sin \theta}\right) \right]}{\left[1 - \exp\left(-\frac{z}{\lambda_B \cdot \sin \theta}\right) \right]}$$

La seule inconnue reste le rapport $K = \frac{\sigma_A \cdot \lambda_B}{\sigma_B \cdot \lambda_A}$. Les sections efficaces de photoionisation sont intrinsèques à chaque élément. Cependant, dans le cas où le film est épais ou si les photopics ont des énergies voisines, les libres parcours sont identiques et le rapport des termes d'atténuation devient négligeable ; la relation devient :

$$\frac{N_B}{N_A} = \frac{I_z^B}{I_z^A} \times K$$

K peut être estimé à partir des rapports d'intensité des pics relatifs à des étalons épais et homogènes de compositions connues.

ANNEXE 8

PROTOCOLES DE SYNTHÈSE POUR SYNTHÉTISEURS EXPEDITE

```
*****
* Protocol Cycle Report: Cycle A (dAdenosine) of "DNA 0.2 umole" Page 1 *
* Expedite(TM) Nucleic Acid Synthesis System (Workstation) *
* Wed 16 Dec 16:07:33 1998 *
*****
```

```
Created:      Mon 15 May 11:38:38 1995
Modified:     Mon 15 May 11:38:38 1995
Project:      Expedite System
Author:       PerSeptive Biosystems
Source:       DNA 0.2 umole Protocol Master
Type:         DNA, normal
Scale:        200 nanomole
Comments:     Standard protocol for the synthesis of
              DNA at the 0.2 umole scale.
```

```
/*-----
/*      Function              Mode  Amount  Time(sec)  Description
/*                               /Arg1  /Arg2
/*-----
$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll.  */ NA      1      0  "Event out ON"
  0 /*Default              */ WAIT     0      1.5 "Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA      1      1  "START data collection"
 16 /*Dblk                 */ PULSE    10     0  "Dblk to column"
 16 /*Dblk                 */ PULSE    50     49 "Deblock"
 38 /*Diverted Wsh A      */ PULSE    40     0  "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA      0      1  "STOP data collection"
144 /*Index Fract. Coll.  */ NA      2      0  "Event out OFF"
$Coupling
  1 /*Wsh                  */ PULSE     5     0  "Flush system with Wsh"
  2 /*Act                  */ PULSE     5     0  "Flush system with Act"
 18 /*A + Act              */ PULSE     5     0  "Monomer + Act to column"
  2 /*Act                  */ PULSE     5     78 "Couple monomer"
  1 /*Wsh                  */ PULSE     1     16 "Couple monomer"
  1 /*Wsh                  */ PULSE    14     0  "Flush system with Wsh"
$Capping
 12 /*Wsh A                */ PULSE    20     0  "Flush system with Wsh A"
 13 /*Caps                 */ PULSE     8     0  "Caps to column"
 12 /*Wsh A                */ PULSE     6     15 "Cap"
 12 /*Wsh A                */ PULSE    14     0  "Flush system with Wsh A"
$Oxidizing
 15 /*Ox                   */ PULSE    15     0  "Ox to column"
 12 /*Wsh A                */ PULSE    15     0  "Flush system with Wsh A"
$Capping
 13 /*Caps                 */ PULSE     7     0  "Caps to column"
 12 /*Wsh A                */ PULSE    30     0  "End of cycle wash"
```

Protocole classique

Cette figure présente un protocole de synthèse classique sur synthétiseur « Expedite » pour des colonnes de synthèse de 0,2 µmol.

```

*****
* Protocol Cycle Report: Cycle A (dAdenosine) of "DNA 0.2umol microcontact1":
* Expedite(TM) Nucleic Acid Synthesis System (Workstation)
* Wed 16 Dec 16:07:05 1998
*****

```

```

Created:      Wed 16 Dec 14:32:35 1998
Modified:    Wed 16 Dec 14:49:19 1998
Project:     Expedite System
Author:      PerSeptive Biosystems
Source:      DNA 0.2 umole Protocol Master
Type:        DNA, normal
Scale:       200 nanomole
Comments:    Standard protocol for the synthesis of
              DNA at the 0.2 umole scale.
              protocole ajusté pour la synthèse sur dispositif
              microcontact
              injection de réactif#2 cycles
              nettoyage de la cellule#3 cycles
              cycles modifiés : A C G T 5 X

```

```

/* -----
/*      Function                Mode  Amount  Time(sec)  Description
/*                               /Arg1  /Arg2
/* -----
$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll.  */ NA      1      0  "Event out ON"
  0 /*Default              */ WAIT     0     1.5 "Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA      1      1  "START data collection"
 16 /*Dblk                 */ PULSE    20     0  "Dblk to column"
 16 /*Dblk                 */ PULSE    50    49  "Deblock"
 38 /*Diverted Wsh A      */ PULSE    70     0  "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off  */ NA      0      1  "STOP data collection"
144 /*Index Fract. Coll.  */ NA      2      0  "Event out OFF"
$Coupling
  1 /*Wsh                  */ PULSE    25     0  "Flush system with Wsh"
  2 /*Act                  */ PULSE     5     0  "Flush system with Act"
 18 /*A + Act             */ PULSE    10     0  "Monomer + Act to column"
  2 /*Act                  */ PULSE    10    78  "Couple monomer"
  1 /*Wsh                  */ PULSE     1    16  "Couple monomer"
  1 /*Wsh                  */ PULSE    24     0  "Flush system with Wsh"
$Capping
 12 /*Wsh A                */ PULSE    40     0  "Flush system with Wsh A"
 13 /*Caps                 */ PULSE    10     0  "Caps to column"
 12 /*Wsh A                */ PULSE     6    15  "Cap"
 12 /*Wsh A                */ PULSE    34     0  "Flush system with Wsh A"
$Oxidizing
 15 /*Ox                   */ PULSE    25     0  "Ox to column"
 12 /*Wsh A                */ PULSE    45     0  "Flush system with Wsh A"
$Capping
 13 /*Caps                 */ PULSE    10     0  "Caps to column"
 12 /*Wsh A                */ PULSE    50     0  "End of cycle wash"

```

Protocole modifié pour l'adaptation du montage de synthèse par microfluidique.

Cette figure présente un protocole de synthèse modifié à partir du protocole adapté aux colonnes de synthèse de 0,2 µmol, les volumes de fluide du montage remplaçant la colonne de synthèse étant intégrés au protocole standard.

ECOLE CENTRALE DE LYON
Liste des personnes habilitées à diriger des recherches

<i>AIT-EL-HADJ Smaïl</i>	<i>professeur</i>	GRESTI	ECL
<i>ARQUES Philippe</i>	<i>professeur</i>		ECL
<i>AURIOL Philippe</i>	<i>professeur</i>	CEGELY	ECL
<i>BAILLY Christophe</i>	<i>maître de conférence</i>	LMFA	ECL
<i>BATAILLE Jean</i>	<i>professeur</i>	LMFA	UCBL
<i>BEN HADID Hamda</i>	<i>professeur</i>	LMFA	UCBL
<i>BERGHEAU Jean-Michel</i>	<i>professeur</i>	LTDS	ENISE
<i>BEROUAL Abderrhamane</i>	<i>professeur</i>	CEGELY	ECL
<i>BERTOGLIO Jean-Pierre</i>	<i>directeur de recherche</i>	LMFA	CNRS
<i>BLAIZE Alain</i>	<i>maître de conférence</i>	LTDS	UCBL
<i>BLANC-BENON Philippe</i>	<i>directeur de recherche</i>	LMFA	CNRS
<i>BLANCHET Robert</i>	<i>professeur</i>	LEOM	ECL
<i>BRUN Maurice</i>	<i>professeur</i>	LMFA	ECL
<i>BUFFAT Marc</i>	<i>professeur</i>	LMFA	UCBL
<i>CAMBON Claude</i>	<i>directeur de recherche</i>	LMFA	CNRS
<i>CAMBOU Bernard</i>	<i>professeur</i>	LTDS	ECL
<i>CARRIERE Philippe</i>	<i>chargé de recherche</i>	LMFA	CNRS
<i>CHAMPOUSSIN J-Claude</i>	<i>professeur</i>	LMFA	ECL
<i>CHAUVET Jean-Paul</i>	<i>professeur</i>	IFOS	ECL
<i>CHEN Liming</i>	<i>professeur</i>	ICTT	ECL
<i>CLERC Guy</i>	<i>professeur</i>	CEGELY	UCBL
<i>COMTE-BELLOT Geneviève</i>	<i>professeur émérite</i>	LMFA	ECL
<i>COQUILLET Bernard</i>	<i>maître de conférence</i>	IFOS	ECL
<i>DAVID Bertrand</i>	<i>professeur</i>	ICTT	ECL
<i>DONNET Christophe</i>	<i>maître de conférence</i>	LTDS	ECL
<i>DUBUJET Philippe</i>	<i>maître de conférence</i>	LTDS	ECL
<i>ESCODIE Dany</i>	<i>chargé de recherche</i>	LMFA	CNRS
<i>FERRAND Pascal</i>	<i>directeur de recherche</i>	LMFA	CNRS
<i>GAFFIOT Frédéric</i>	<i>maître de conférence</i>	LEOM	ECL
<i>GAGNAIRE Alain</i>	<i>maître de conférence</i>	LEOM	ECL
<i>GALLAND Marie-Annick</i>	<i>maître de conférence</i>	LMFA	ECL
<i>GARRIGUES Michel</i>	<i>directeur de recherche</i>	LEOM	CNRS
<i>GAY Bernard</i>	<i>professeur</i>	LMFA	UCBL
<i>GENCE Jean-Noël</i>	<i>professeur</i>	LMFA	UCBL
<i>GENDRY Michel</i>	<i>chargé de recherche</i>	LEOM	CNRS
<i>GEORGES Jean-Marie</i>	<i>professeur émérite</i>	LTDS	ECL
<i>GRENET Geneviève</i>	<i>chargé de recherche</i>	LEOM	CNRS
<i>GUIRALDENQ Pierre</i>	<i>professeur émérite</i>	IFOS	ECL

ECOLE CENTRALE DE LYON
Liste des personnes habilitées à diriger des recherches

<i>HAMADICHE Mahmoud</i>	<i>maître de conférence</i>	LMFA	UCBL
<i>HELLOUIN Yves</i>	<i>maître de conférence</i>		ECL
<i>HENRY Daniel</i>	<i>chargé de recherche</i>	LMFA	CNRS
<i>HERRMANN Jean-Marie</i>	<i>directeur de recherche</i>	IFOS	CNRS
<i>HOLLINGER Guy</i>	<i>directeur de recherche</i>	LEOM	CNRS
<i>JAFFREZIC-RENAULT Nicole</i>	<i>directeur de recherche</i>	IFOS	CNRS
<i>JEANDEL Denis</i>	<i>professeur</i>	LMFA	ECL
<i>JEZEQUEL Louis</i>	<i>professeur</i>	LTDS	ECL
<i>JOSEPH Jacques</i>	<i>professeur</i>	LEOM	ECL
<i>JUVE Daniel</i>	<i>professeur</i>	LMFA	ECL
<i>JUVE Denyse</i>	<i>ingénieur de recherche</i>	IFOS	ECL
<i>KAPSA Philippe</i>	<i>directeur de recherche</i>	LTDS	CNRS
<i>KRÄHENBÜHL Laurent</i>	<i>directeur de recherche</i>	CEGELY	CNRS
<i>KRAWCZYK Stanislas</i>	<i>directeur de recherche</i>	LEOM	CNRS
<i>LANCE Michel</i>	<i>professeur</i>	LMFA	UCBL
<i>LANGLADE-BOMBA Cécile</i>	<i>maître de conférence</i>	IFOS	ECL
<i>LE HELLEY Michel</i>	<i>professeur</i>		ECL
<i>LEBOEUF Francis</i>	<i>professeur</i>	LMFA	ECL
<i>LOPEZ Jacques</i>	<i>maître de conférence</i>	LTDS	UCBL
<i>LOUBET Jean-Luc</i>	<i>directeur de recherche</i>	LTDS	CNRS
<i>LYONNET Patrick</i>	<i>professeur</i>	LTDS	ENISE
<i>MAITRE Jean-François</i>	<i>professeur</i>	MAPLY	ECL
<i>MARION Martine</i>	<i>professeur</i>	MAPLY	ECL
<i>MARTELET Claude</i>	<i>professeur</i>	IFOS	ECL
<i>MARTIN Jean-Michel</i>	<i>professeur</i>	LTDS	ECL
<i>MARTIN Jean-René</i>	<i>professeur</i>	IFOS	ECL
<i>MATHIA Thomas</i>	<i>directeur de recherche</i>	LTDS	CNRS
<i>MATHIEU Jean</i>	<i>professeur émérite</i>	LMFA	ECL
<i>MAZUYER Denis</i>	<i>professeur</i>		ECL
<i>MIDOL Alain</i>	<i>maître de conférence</i>	LTDS	UCBL
<i>MOREL Robert</i>	<i>professeur</i>	LMFA	INSA
<i>MOUSSAOUI Mohand</i>	<i>professeur</i>	MAPLY	ECL
<i>MUSY François</i>	<i>maître de conférence</i>	MAPLY	ECL
<i>NGUYEN Du</i>	<i>maître de conférence</i>	IFOS	ECL
<i>NICOLAS Alain</i>	<i>professeur</i>	CEGELY	ECL
<i>NICOLAS Laurent</i>	<i>directeur de recherche</i>	CEGELY	CNRS

ECOLE CENTRALE DE LYON
Liste des personnes habilitées à diriger des recherches

<i>PERKINS Richard</i>	<i>professeur</i>	LMFA	ECL
<i>PERRET-LIAUDET Joël</i>	<i>maître de conférence</i>	LTDS	ECL
<i>PERRIN Jacques</i>	<i>professeur</i>		INSA
<i>PICHAT Pierre</i>	<i>directeur de recherche</i>	IFOS	CNRS
<i>PONSONNET Laurence</i>	<i>maître de conférence</i>	LTDS	ECL
<i>PREVOT Patrick</i>	<i>professeur</i>	ICTT	INSA
<i>REBOUX Jean-Luc</i>	<i>professeur</i>	LTDS	ENISE
<i>ROBACH Yves</i>	<i>maître de conférence</i>	LEOM	ECL
<i>ROGER Michel</i>	<i>professeur</i>	LMFA	ECL
<i>ROJAT Gérard</i>	<i>professeur</i>	CEGELY	UCBL
<i>ROUSSEAU Jacques</i>	<i>professeur émérite</i>	LTDS	ENISE
<i>SALVIA Michelle</i>	<i>maître de conférence</i>	IFOS	ECL
<i>SCOTT Julian</i>	<i>professeur</i>	LMFA	ECL
<i>SELLIER Antoine</i>	<i>professeur</i>	LMFA	UCBL
<i>SIDOROFF François</i>	<i>professeur</i>	LTDS	ECL
<i>SOUTEYRAND Eliane</i>	<i>directeur de recherche</i>	IFOS	CNRS
<i>STREMSDOERFER Guy</i>	<i>professeur</i>	IFOS	ECL
<i>SUNYACH Michel</i>	<i>professeur</i>	LMFA	UCBL
<i>TARDY Jacques</i>	<i>directeur de recherche</i>	LEOM	CNRS
<i>THOMAS Gérard</i>	<i>professeur</i>	CEGELY	ECL
<i>TREHEUX Daniel</i>	<i>professeur</i>	IFOS	ECL
<i>VANNES André-Bernard</i>	<i>professeur</i>	IFOS	ECL
<i>VIKTOROVITCH Pierre</i>	<i>directeur de recherche</i>	LEOM	CNRS
<i>VINCENT Léo</i>	<i>professeur</i>	IFOS	ECL
<i>ZAHOUANI Hassan</i>	<i>professeur</i>	LTDS	ENISE

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 30 Mars 1992,

Vu la demande du Directeur de Thèse

Monsieur J.R. MARTIN

et les rapports de

Monsieur P. FABRY
Professeur - ENSEEG - Rue de la Chimie - BP 75 - 38402 SAINT MARTIN D'HERES Cedex

et de

Monsieur C. PIJOLAT
Maître de Recherche - Directeur du Département de Recherche Microsystèmes, Instrumentation et Capteurs - ENSMST - 158, cours Fauriel - 42023 SAINT ETIENNE Cedex 2

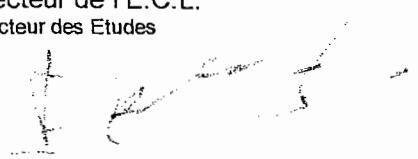
Monsieur BESSUEILLE François

est autorisé à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

Ecole doctorale ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE et AUTOMATIQUE (EEA)

Fait à Ecully, le 22 novembre 2001

P/Le Directeur de l'E.C.L.
Le Directeur des Etudes



F. LEBOEUF

Résumé :

Dans le cadre de ce travail, différents procédés d'élaboration et de lecture de puces à ADN ont été mis au point.

La méthode retenue pour l'élaboration des puces consiste à fonctionnaliser par silanisation des structures de type Si/SiO₂ avec le chlorodiméthylsilylundécanoate de méthyle (CDSUM), puis, après hydrolyse et activation des esters de méthyle au n-hydroxysuccinimide (NHS), un aminopolyoxyde d'éthylène, lui-même greffé sur les esters activés, joue le rôle d'espaceur et assure une couverture de la surface par des terminaisons alcools primaires. Les substrats ainsi préparés permettent la synthèse d'oligonucléotides par la chimie des phosphoramidites. Des systèmes d'adressages, tels que la projection par jets et la fluidique, ont été réalisés pour localiser les réactions de synthèse à la surface des puces. Parallèlement aux systèmes d'adressage mécanique, une méthode de multifonctionnalisation par micro tamponnage a été développée, permettant d'optimiser la surface des substrats.

Des travaux sur la lecture des puces ont été conduits selon différents procédés, tels que l'optoélectrochimie sur structure EDS ou la cartographie de fluorescence. Puis ces techniques ont été validées par radio-imagerie et XPS.

Des puces réutilisables 20 fois, sans altération de réponse, hybridables par des oligonucléotides complémentaires et des fragments PCR doubles brins de 1.5 kb, ayant une limite de détection de 10 aM pour des hybridations oligonucléotides contre oligonucléotides, soit $5.3 \cdot 10^{-4}$ brins / μm^2 ont été obtenues, la sélectivité étant réalisée au mismatch près.

Mots clefs :

Puces à ADN, Synthèse d'ADN, Silicium poreux, silane, Fonctionnalisation, Hybridation sur support, Microsystèmes, Microtamponnage, Microfluidique, Jet, Adressage, AFM.

