



HAL
open science

Dispositifs ultra-sensibles pour le nano-adressage électrique. Application à la détection de biomolécules

Laurent Malaquin

► **To cite this version:**

Laurent Malaquin. Dispositifs ultra-sensibles pour le nano-adressage électrique. Application à la détection de biomolécules. Physique [physics]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2004. Français. NNT: . tel-00009243

HAL Id: tel-00009243

<https://theses.hal.science/tel-00009243>

Submitted on 12 May 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Préparée au
Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes
LAAS - CNRS

En vue de l'obtention du
Doctorat de l'Université Paul SABATIER - Toulouse III

Discipline : Nanophysique

par
Laurent MALAQUIN

DISPOSITIFS ULTRA-SENSIBLES POUR LE
NANO-ADRESSAGE ÉLECTRIQUE. APPLICATION À LA
 DÉTECTION DE BIOMOLÉCULES

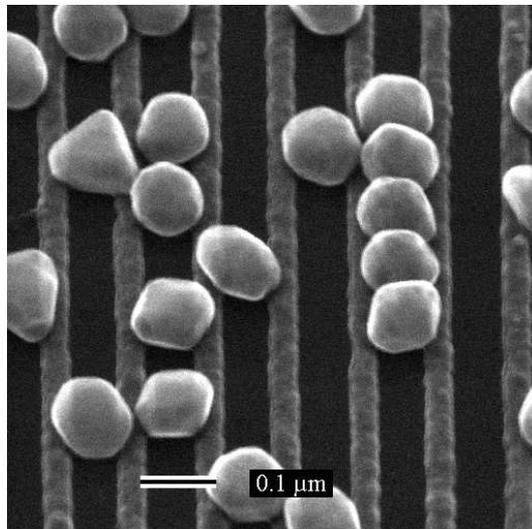
Soutenue le 9 Juin 2004, devant le jury :

Rapporteurs	J.L. VIOVY D. STIEVENARD
Examineurs	P. VIKTOROVITCH B. LE PIOUFLE M. DJAFARI ROUHANI
Invité	J.M. FRANÇOIS
Directeur de thèse	C. VIEU

Rapport LAAS N°XXXXX

Dispositifs ultra-sensibles pour le
Nano-adressage électrique.
Application à la détection de biomolécules

Laurent MALAQUIN



9 Juin 2004

Remerciements

JE TIENS TOUT D'ABORD à remercier Christophe VIEU, pour son accueil et pour m'avoir guidé tout au long de cette aventure dans le monde des nanotechnologies. Merci tout d'abord pour toute la confiance et surtout pour la liberté qu'il a su m'accorder tout au long de ces recherches. Je n'oublierai pas son soutien au cours de mes moments de "doutes" et son écoute durant toutes ces heures de réflexions, de préparations toujours aussi enrichissantes à son contact.

Je voudrais également remercier très sincèrement Franck Carcenac, pour sa patience durant toutes ces heures passées en salle blanche ou devant "la colonne", pour ces longues discussions au cours desquelles il m'a fait partager tant son savoir scientifique et technologique que son expérience dans cette aventure "humaine".

Encore une fois merci à tous les deux pour votre écoute, votre confiance et votre enthousiasme.

Je tiens à remercier les directeurs du LAAS-CNRS, J.C. Laprie et M. Ghalab pour m'avoir accueilli dans ce prestigieux laboratoire.

Je voudrais également remercier tous les membres de l'école Doctorale de Nanophysique de Toulouse en particulier, Armand Coujou, Jean-Claude Ousset et Catherine Ousset pour leur soutien et leur aide tout au long de ma thèse.

Ces travaux de thèse placés sous le thème de l'interdisciplinarité m'ont amené à découvrir le monde des biotechnologies. Je tiens à remercier tous les membres de la plate forme transcriptome de Toulouse et plus particulièrement, Véronique Leberre, Emmanuelle Trévisiol et Jean Marie Francois du DGBA/INSAT.

Je souhaite également saluer tous les membres de l'équipe "TEAM" que j'ai côtoyés pendant ces quatre années : un grand merci pour leur soutien, leur disponibilité et leur enthousiasme durant ces longues heures passées en salle blanche.

Un grand merci à Mike Geneviève, Yannick Tauran, Barthélémy Steck et Camilo Martinez pour leur aide précieuse, leur motivation et leur compréhension lors de la rédaction de ma thèse.

Je tiens également à remercier Christian Bergaud, qui m'a guidé vers les biotechnologies, ainsi que Liviu Nicu, Emmanuelle Daran, Monique Mauzac, Luis Martinez-Salamero et Pierre Temple, pour leur soutien tout au long de ma thèse.

Je ne voudrais surtout pas oublier tous les doctorants que j'ai pu côtoyer au LAAS durant ces quelques années entre autres Benoît, Stéphane, Marie-Laure, Laurent, William, Mathieu, Christel, Michel et bien sûr David colocataire hors pair et surtout ami de longue date.

Je tiens enfin à remercier toute ma famille et tout particulièrement toi, Laetitia, pour ta confiance, ton soutien et ta patience tout au long de cette belle aventure ...

Table des matières

Introduction : Nanoadressage et Nanobiotechnologies	1
1 Introduction	5
1.1 Introduction	6
1.2 L'apport des nanotechnologies pour la biodétection	6
1.2.1 L'avènement des puces à ADN	6
1.2.2 Vers la Post-génomique : les puces à protéines	9
1.3 Différents types de transduction	11
1.3.1 La notion de biocapteur	11
1.3.2 Détection optique	12
1.3.3 Détection magnétique	14
1.3.4 Détection mécanique	16
1.3.5 Détection électrique	19
1.4 Vers un Nano-adressage électrique	21
1.4.1 Une idée simple	21
1.4.2 Des nanoélectrodes pour une détection ultra sensible	22
1.4.3 Le problème de la conductivité des biomolécules	28
1.4.4 Les solutions existantes	31
1.5 Vers une immunodétection électrique à très haute sensibilité	39
1.5.1 Présentation du schéma de détection	40
1.5.2 Objectifs du projet	43
2 Réalisation de nanoélectrodes par lithographie électronique	45
2.1 Introduction	46
2.2 Lithographie électronique dans une résine organique	47
2.2.1 Principe	47
2.2.2 La lithographie électronique dans une résine organique : le PMMA	48
2.2.3 Description du système de lithographie utilisé	51
2.3 Procédé technologique	56
2.3.1 Réalisation des motifs de connexion	57
2.3.2 Réalisation des nanoélectrodes	60
2.4 Etude des paramètres de fabrication des nano électrodes	63
2.4.1 Préparation des dessins des structures	64
2.4.2 Choix de l'épaisseur de résine	66
2.4.3 Effets de proximité	72
2.4.4 Choix de l'épaisseur et de la nature du métal déposé	81

2.4.5	Influence du procédé de développement	81
2.4.6	Synthèse	83
2.5	Caractérisation électrique des dispositifs vierges	85
2.6	Conclusion	86
3	Détection électrique de nanoparticules métalliques	89
3.1	Introduction	91
3.2	Principe de l'expérience	91
3.2.1	Rappel du schéma général	91
3.2.2	Principe de l'expérience	93
3.3	Immobilisation de nanoparticules par interaction électrostatique	94
3.3.1	Généralités	94
3.3.2	Nanoparticules d'Or en solution	94
3.3.3	Préparation de la surface	95
3.3.4	Dépôt des nanoparticules d'Or	98
3.3.5	Résultats expérimentaux	99
3.4	Étude du dépôt de nanoparticules sur des électrodes interdigitées	103
3.4.1	Description du dispositif de détection	103
3.4.2	Influence de la morphologie des électrodes sur le dépôt	105
3.5	Interprétation de la localisation du dépôt	110
3.5.1	Nature des interactions	111
3.5.2	Interactions électrostatiques et de Van der Waals	112
3.5.3	Méthode de calcul	113
3.5.4	Interactions d'origine électrostatique	115
3.5.5	Forces de Van der Waals	120
3.5.6	Synthèse	121
3.6	Caractérisations électriques des dispositifs	122
3.6.1	Objectifs	122
3.6.2	Évolution de la conductance au cours du protocole de dépôt	123
3.6.3	Interprétation du transport électrique	125
3.6.4	Détection d'une particule unique en solution	131
3.7	Conclusion et perspectives	139
4	Vers une immunodétection électrique	141
4.1	Introduction	143
4.2	Principe de la détection d'anticorps	143
4.2.1	Adaptation du schéma de détection	143
4.2.2	Approche adoptée	144
4.3	Protocole expérimental	146
4.3.1	Solutions d'anticorps	146
4.3.2	Immobilisation de la sonde	147
4.3.3	Formation du complexe cible-sonde	149
4.3.4	Greffage de nanoparticules	150
4.3.5	Utilisation de micro-cuves en PDMS	152
4.4	Étude du greffage des nanoparticules : Résultats préliminaires	152
4.4.1	Densité de greffage	152

4.4.2	Sélectivité du dépôt	154
4.4.3	Résistance du greffage	158
4.4.4	Synthèse	158
4.5	Étude du greffage sur des électrodes interdigitées	158
4.5.1	Homogénéité du dépôt	158
4.5.2	Conformation des particules sur les électrodes	159
4.5.3	État de surface	161
4.5.4	Interprétation des résultats de greffage	163
4.6	Détection électrique de la formation du complexe cible-sonde	164
4.6.1	Objectifs	164
4.6.2	Évolution de la conductance au cours des étapes de greffage	164
4.6.3	Interprétations des résultats	168
4.6.4	Vers une mesure quantitative	170
4.7	Conclusion et perspectives	174
Conclusion générale		177
A Réalisation de mesures électriques en solution		185
A.1	Principe des mesures	186
A.2	Réalisation des microréacteurs PDMS	186
A.2.1	Report et alignement des microréacteurs sur les dispositifs électriques	187
B Le modèle DLVO		191
B.1	Interactions électrostatiques	192
B.2	Forces de Van der Waals	196
B.3	Le modèle DLVO	197
C Modèle de Fowler Nordheim		201
D Rappels d'Immunologie		203
D.1	Rôle des anticorps dans la réponse immunologique	204
D.1.1	Rôle des Lymphocytes (ou cellules) B	204
D.1.2	Le rôle des anticorps	204
D.2	Structure des anticorps IgG	205
D.2.1	Taille des anticorps	206
D.2.2	Notion de fragment	206
D.2.3	Anticorps polyclonaux-monoclonaux	207
D.2.4	Anticorps Anti-Immoglobuline	207
D.2.5	Anticorps primaires / secondaires	208
D.2.6	La liaison Antigène-Anticorps	208
D.3	Glossaire	210
E Utilisation du PDMS pour la NanoImpression		213
E.1	Utilisation du PDMS pour la NanoImpression	214
E.1.1	Présentation du procédé	214
E.1.2	Résultats expérimentaux	216
E.2	Vers de nouveaux matériaux polymères	220

Introduction : Nanoadressage et Nanobiotechnologies

Les récents progrès dans le domaine des NanoSciences et des *NanoTechnologies* ont ouvert de nouvelles voies pour la fabrication et la structuration d'objets de taille nanométriques. Ces nano-objets couvrent un large spectre de propriétés, de matériaux et d'applications; citons par exemple les fils et boîtes quantiques artificiels, les nanoparticules synthétisées par voie chimique, les molécules pour l'électronique moléculaire, les nanocristaux élaborés par voie physique (par épitaxie, par implantation ionique, par dépôt), les nanotubes et *les biomolécules* . . . Un verrou technologique important est d'imaginer la manière dont ces nano-objets peuvent être connectés au monde macroscopique sans perdre leurs propriétés intrinsèques qui sont bien souvent fragiles et très sensibles à l'environnement. Cette problématique traduite sous le vocable de nano-adressage est une phase cruciale du développement des nanosciences.

Le mariage des biotechnologies et des nanotechnologies est une activité en plein essor dans le monde et constitue probablement un des secteurs applicatifs les plus prometteurs pour les nanotechnologies. Le vocable "*Nanobiotechnologies*" recouvre dans son acception la plus large ce mariage des Micro et Nanotechnologies (ensemble de techniques de miniaturisation) avec les Biotechnologies. Il inclue le concept de "lab-on-a-chip" ou laboratoire sur puce en français ou le terme plus technique de μ TAS pour Micro-total-analysis-system, c'est à dire des systèmes capables de manipuler des échantillons de solutions, de les trier, de les purifier, de les mélanger, de les analyser et de délivrer un signal numérique en sortie. Ces nouveaux outils constitueront le socle de la majeure partie des études qui se développent à la suite du séquençage du génome et qui adressent la problématique de la structure et de la fonction des protéines.

La somme des connaissances accumulées depuis plus de 20 ans dans le domaine des nanotechnologies couplée à la convergence des disciplines de la chimie, de la biologie et de la physique ouvrent désormais la voie de nouvelles applications en particulier dans le domaine de la biodétection. Sur le plan plus fondamental, l'enjeu est de mettre en œuvre les nouvelles techniques et les savoir-faire récents issus des développements de la nanophysique (microscopes en champ proche, nanocomposants. . .), les avancées spectaculaires de la chimie (polymères, auto-assemblage, chimie supra-moléculaire, greffage. . .) au service de l'étude fine à l'échelle de la biomolécule unique de nombreux mécanismes biologiques fondamentaux (moteurs biologiques, activités enzymatiques, machineries ADN, ARN. . .). Cette évolution est illustrée ¹ dans la figure 1 .

¹Bachmanns « Market Opportunities at the boundary from Micro to Nanotechnology » MST News 3(1), 13-14 (2001)

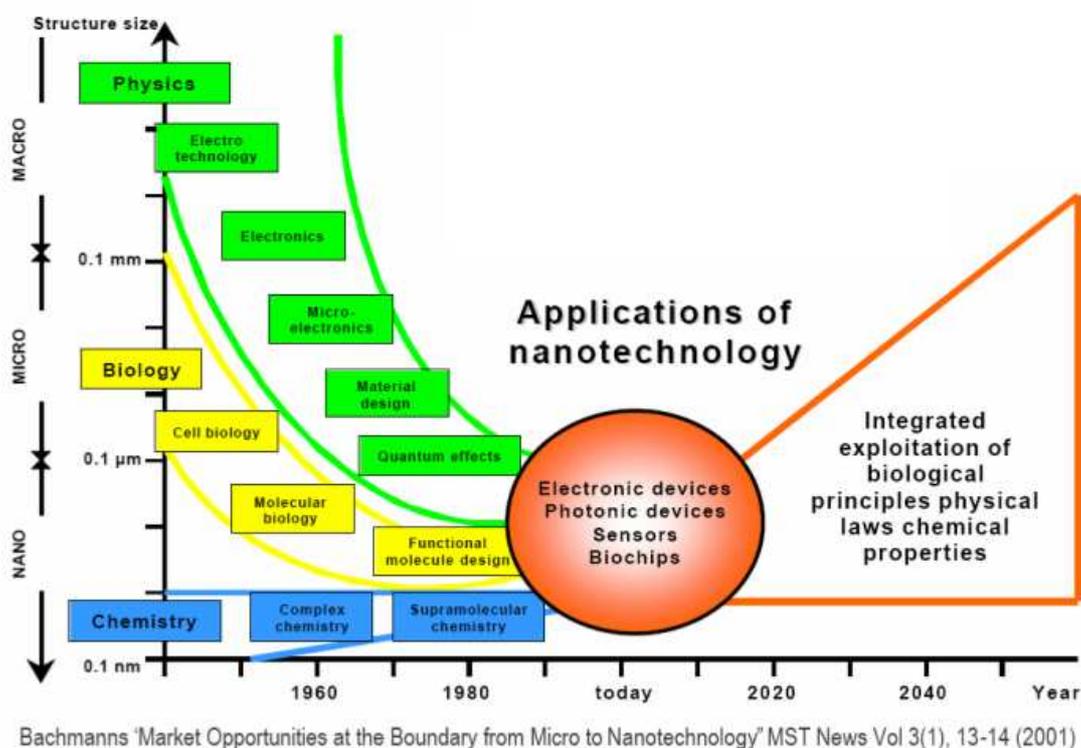


FIG. 1 – Les nanotechnologies : le point de rencontre de la biologie, de la chimie et de la physique

Sur le plan des applications toutes sortes de biopuces miniatures, ou de biocapteurs spécifiques verront le jour et bouleverseront complètement la manière d'appréhender les analyses médicales, le dépistage, la détection de contaminants, le criblage de médicaments et à plus long terme la thérapie. Toute l'industrie de la santé sera donc à terme touchée par ce domaine en émergence.

La prise de conscience des enjeux économiques soulevés par les nanobiotechnologies a sans nul doute été beaucoup plus rapide aux Etats-Unis. Au niveau académique des laboratoires puissants fortement multi-disciplinaires, regroupant physiciens, chimistes et biologistes ont été créés dès 1998. De grands groupes industriels ont également réalisé des investissements conséquents dans ces nouvelles technologies (Helwett-Packard, Caliper Technologies, Agilent...) en estimant que le marché de ces nouveaux instruments d'analyse miniatures serait de l'ordre de 1 milliard de dollars dès 2010. Les japonais ont rapidement emboîté le pas avec une démarche assez similaire (création de centres puissants de recherche en couplage direct avec des industriels). L'Europe elle aussi a introduit dans les lignes du 6^{me} plan, une thématique sur les nanobiotechnologies et soutient un réseau d'excellence sur cette thématique. Au niveau national, les nanobiotechnologies sont pour le moment un domaine essentiellement académique. La communauté scientifique toulousaine poursuit un effort structurant dans le domaine des nanotechnologies selon trois axes fédérateurs : les Nanosciences, les Nanomatériaux et les Nanobiotechnologies. Pour ce dernier volet l'objectif est de développer des nanotechnologies innovantes pour

imager, détecter ou adresser des biosystèmes. L'ambition est de créer de nouveaux outils et de nouveaux savoir-faire dans le but de faire progresser la recherche en science de la vie par l'établissement d'une synergie entre les communautés de physiciens, chimistes et biologistes en mettant les différentes technologies opérantes à l'échelle moléculaire au cœur du problème.

C'est dans ce vaste projet régional et cet immense contexte international que s'inscrit le travail de recherche que j'ai mené durant ma thèse de doctorat et que je vais décrire dans ce manuscrit.

Le premier chapitre de ce manuscrit a pour vocation essentielle de présenter la démarche qui nous a amenée à définir ce projet de recherche. Notre réflexion s'appuiera en premier lieu sur une étude des principes et des évolutions des systèmes de biodétection proposés à ce jour. L'exemple le plus représentatif de cette évolution est celui des biopuces. Ces dispositifs miniaturisés sont emblématiques des recherches qui ont été menées autour de la biodétection. Ce premier exemple, couplé à une première étude bibliographique des systèmes de détection présentés à ce jour, nous permettra d'illustrer les perspectives offertes par une miniaturisation jusqu'à l'échelle nanométrique et posera le problème de la recherche d'une méthode de détection. Les maîtres mots de cette détection sont haute sensibilité, capacité d'intégration, rapidité, débit. A partir de cette étude, nous nous appuierons sur les récents résultats publiés dans la littérature autour de la détection électrique de biomolécules ainsi que dans le domaine de l'électronique moléculaire pour proposer un schéma de détection original : il permettra de réunir les *Nanotechnologies* au travers d'un dispositif d'*adressage* à l'échelle nanométrique basé sur des nanoélectrodes, avec les *Biotechnologies* en associant ces dispositifs à un protocole de reconnaissance spécifique de biomolécules.

Chapitre 1

Introduction

Sommaire

1.1	Introduction	6
1.2	L'apport des nanotechnologies pour la biodétection	6
1.2.1	L'avènement des puces à ADN	6
1.2.2	Vers la Post-génomique : les puces à protéines	9
1.3	Différents types de transduction	11
1.3.1	La notion de biocapteur	11
1.3.2	Détection optique	12
1.3.2.1	Détection par fluorescence	12
1.3.2.2	Détection par Résonance plasmon de surface	12
1.3.3	Détection magnétique	14
1.3.4	Détection mécanique	16
1.3.4.1	Microbalance à quartz	16
1.3.4.2	Dispositifs à onde acoustique de surface	16
1.3.4.3	Micro et nano systèmes électro-mécaniques	17
1.3.5	Détection électrique	19
1.3.5.1	Mesure de potentiel électrochimique	19
1.3.5.2	Mesures potentiométriques	20
1.3.5.3	Mesures ampérométriques	20
1.3.5.4	Mesures impédancemétriques	20
1.4	Vers un Nano-adressage électrique	21
1.4.1	Une idée simple ...	21
1.4.2	Des nanoélectrodes pour une détection ultra sensible	22
1.4.2.1	Nanoélectrodes pour l'adressage électrique de molécules	22
1.4.2.2	Utilisation d'une sonde tunnel	22
1.4.2.3	Réalisation d'électrodes planaires par lithographie électronique	23
1.4.2.4	Utilisation de nanoparticules	24
1.4.2.5	Réduction de la distance inter-électrodes	25
1.4.2.6	Ouverture d'un nanofil	25
1.4.2.7	Synthèse	28
1.4.3	Le problème de la conductivité des biomolécules	28
1.4.3.1	Le cas de l'ADN	28
1.4.3.2	De la détection des biomolécules	30
1.4.4	Les solutions existantes	31
1.4.4.1	Les nanotubes de carbone et nanofils conducteurs	31
1.4.4.2	Membranes biomimétiques, Nanopores	33
1.4.4.3	Métallisation	34
1.4.4.4	Marquage par des nanoparticules métalliques	34
1.5	Vers une immunodétection électrique à très haute sensibilité	39
1.5.1	Présentation du schéma de détection	40
1.5.2	Objectifs du projet	43

1.1 Introduction

” Because technology provides the tools and biology the problems, the two should enjoy a happy marriage! ” .

Cette phrase prononcée par S. Fields [1], résume en une ligne les motivations et les enjeux des micro et nanotechnologies pour les sciences du vivant et définit parfaitement l’esprit du projet qui a motivé ces travaux de thèse. Les ”problèmes” posés par la biologie sont à mettre en relation avec l’explosion des biotechnologies qui ont rendu possible le séquençage du génome humain et qui ouvrent désormais de nombreuses perspectives en particulier dans le domaine de la protéomique. Les enjeux concernent le développement de solutions permettant la détection des biomolécules (ADN, ARN, protéines, anticorps) qui sont à la base de ces domaines.

D’un autre côté, la physique de la matière et les sciences de l’information ont fait émerger de nouveaux ”outils” pour maîtriser la structuration de la matière à l’échelle nanométrique. La maturation de cette nouvelle discipline s’est enrichie de l’apport des chimistes qui développent une connaissance nouvelle autour de l’auto-assemblage et des édifices supra-moléculaires.

Ces différentes disciplines croisent leur route au niveau des nanosciences et des nanotechnologies.

L’exemple le plus représentatif de cette évolution est celui des biopuces qui constitue le point de départ de notre discussion. Ces dispositifs miniaturisés sont emblématiques des recherches qui ont été menées pour le développement de solutions de détection adaptées aux exigences de la biologie. Ce premier exemple nous permettra d’illustrer d’une part les perspectives offertes par une miniaturisation jusqu’à l’échelle nanométrique et d’autre part posera le problème de la méthode de détection. Les maîtres mots de cette détection sont haute sensibilité, capacité d’intégration, rapidité, débit. Nous verrons que les nanotechnologies offrent, quel que soit le principe physique utilisé pour cette détection, des solutions nouvelles qui répondent à ces besoins. Après une description rapide des solutions de détection existantes, nous nous focaliserons sur une méthode particulière, la détection électrique, en proposant une approche permettant de détecter des biomolécules par une simple mesure de conductance. Au travers de cette approche, c’est le problème du nanoadressage qui sera posé. Nous proposerons un type de nanodispositifs d’adressage basé sur des électrodes planaires, ainsi que des solutions de marquage des biomolécules qui nous permettront d’envisager un schéma de détection simple qui semble répondre aux nouvelles exigences de la post-génomique.

1.2 L’apport des nanotechnologies pour la biodétection

1.2.1 L’avènement des puces à ADN

La génétique, étude de l’hérédité, est une discipline récente de la biologie. La mise en évidence de l’ADN comme support de l’hérédité ne date que de 1943, et sa structure ne fut élucidée qu’en 1953.

Le contenu de l’information du génome est porté par l’ADN (Acide désoxyribonu-

cléique). La taille et la nature des séquences contenues dans le génome détermine la forme et la fonction de l'organisme résultant. Ainsi, la détection de séquences d'ADN constitue un des enjeux majeurs des recherches menées dans le domaine de la biologie moléculaire. Toutefois, même si la découverte de la structure date de 1953, les avancées les plus importantes dans le domaine n'ont été réalisées que depuis les débuts des années 1970 et plus particulièrement après l'apparition, au début des années 1990, du concept de puce à ADN ("DNA chip") et plus généralement de biopuces [2, 3, 4]. Ces dispositifs permettent à la fois l'étude du séquençage, des mutations et de l'expression des gènes.

Le principe des puces à ADN est basé sur les propriétés d'hybridation de l'ADN. Cette molécule existe sous la forme de deux brins appariés, tous deux constitués d'un enchaînement (ou séquence) de 4 bases notées A, T, G et C désignant respectivement l'adénine, la thymine, la guanine et la cytosine. Ces bases peuvent s'associer de façon spécifique en créant des liaisons de type hydrogène entre les bases A et T et entre les bases C et G. Ainsi deux brins d'ADN hybridés sont constitués d'enchaînements de bases complémentaires (Cf. Figure 1.1). L'association de deux brins d'ADN présentant des enchaînements de bases, des séquences, complémentaires est appelée hybridation. Cette hybridation est très sélective et nécessite une concordance parfaite entre les séquences de chaque brin.

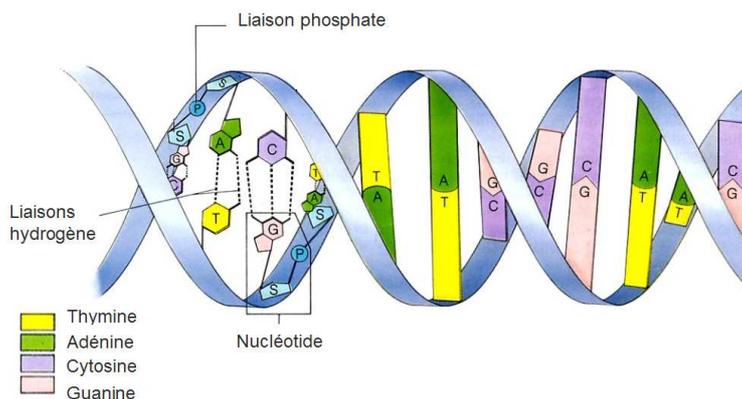


FIG. 1.1 – Représentation schématique de la structure de la molécule d'ADN.

Les puces à ADN sont généralement constituées d'un support solide sur lequel sont immobilisés des oligonucléotides¹ composés d'un seul brin (ou simple brin) qui constituent des sondes. Le rôle de ces sondes consiste à reconnaître et à interagir avec des cibles présentes dans une solution à analyser. Dans le cas d'une hybridation entre les deux brins, la connaissance de la séquence composant la sonde permet de déduire facilement la séquence du brin complémentaire. La détection de la réaction se fait généralement en utilisant un procédé de marquage de la molécule cible avec un composé fluorescent ou radioactif. Ainsi, dans le cas d'une hybridation, ce marqueur permettra de révéler, après lavage de la surface, un signal fluorescent ou radioactif témoignant de l'immobilisation de la cible sur la surface.

Le principe de la détection repose donc sur la mise à profit de la sélectivité de la reconnaissance des séquences de la cible et de la sonde. Nous voyons que cette reconnaissance n'est possible que si une séquence complémentaire se trouve sur la surface de la

¹Des fragments courts constitués d'un faible nombre de bases

puce. La détection d'une séquence d'un brin inconnu de n bases nécessite donc de tester individuellement des sondes dont les séquences correspondent à toutes les combinaisons possibles des n bases complémentaires.

L'atout principal des biopuces est de pouvoir procéder sur un même substrat à l'ensemble de ces tests. Pour cela, on procède à un dépôt localisé de chaque molécule sonde sur la surface de la puce de façon à constituer un réseau de sites probables pour une interaction avec la cible. L'intérêt principal de la technique réside dans les dimensions des dépôts qui sont de l'ordre de quelques centaines, voire de quelques dizaines de microns, ce qui permet de disposer plusieurs milliers de sondes différentes sur des surfaces de quelques cm^2 . Cette miniaturisation permet donc d'intégrer sur une même puce l'ensemble des tests nécessaires à la détection d'un grand nombre d'oligonucléotides. Le deuxième intérêt de cette miniaturisation est de limiter les quantités de produits nécessaires pour chaque test et donc de limiter les étapes d'amplification du matériel biologique. La figure 1.2 nous montre une image en fluorescence de la surface d'une telle puce. Chacun des spots lumineux correspond à une séquence donnée et peut être analysé pour quantifier chaque interaction.

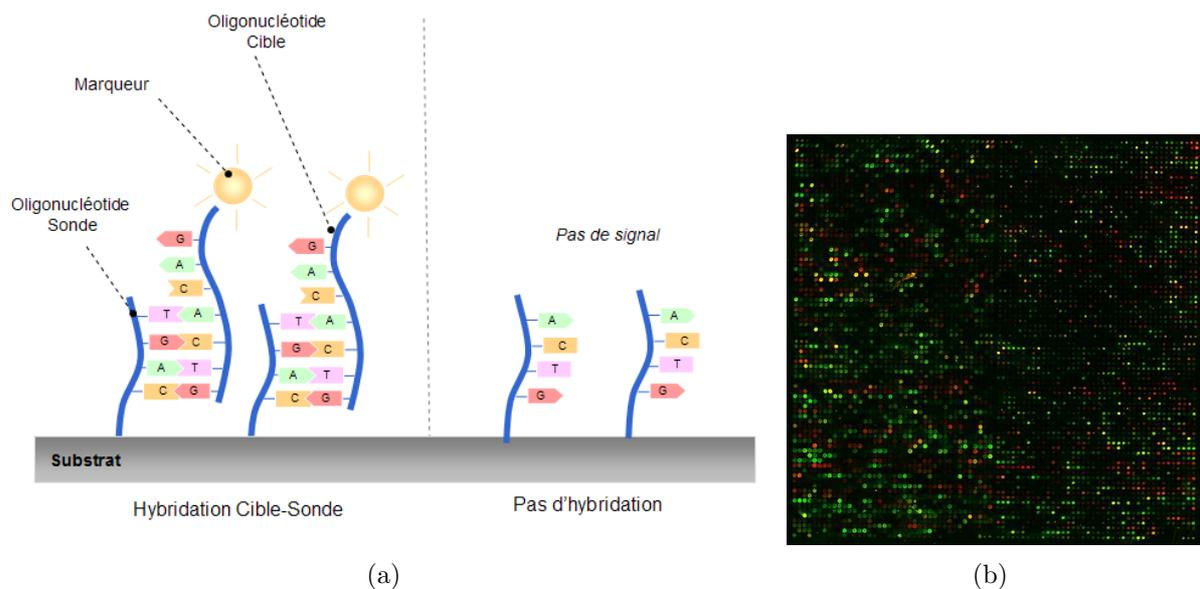


FIG. 1.2 – (a) Principe de fonctionnement d'une biopuce à ADN. (b) Images en fluorescence de la surface d'une biopuce à ADN. Les spots lumineux témoignent de l'interaction entre les oligonucléotides "cibles" et les oligonucléotides "sondes" et permettent d'identifier la séquence des brins d'ADN étudiés. La taille minimale des spots détectables est de l'ordre de $10\mu\text{m}$.

Toutefois, malgré cette miniaturisation, les dispositifs actuels restent encore limités en ce qui concerne la sensibilité et la sélectivité de la méthode de détection qui nécessite, en particulier dans le cas de la fluorescence, de nombreuses procédures d'analyses d'images et de contrôles. Leur évolution reste en grande partie conditionnée par des procédés de traitements de surface et d'hybridation et surtout par les progrès des techniques de structuration.

Les perspectives d'évolutions offertes par les nanotechnologies sont particulièrement

intéressantes. Elles permettraient tout d'abord d'augmenter encore la densité de sites d'interactions sur la surface et donc d'augmenter encore la vitesse de séquençage. Par ailleurs, comme nous allons le voir tout au long de ce chapitre, les nanotechnologies offrent des moyens de détection particulièrement sensibles et directement intégrables sur la surface des biopuces permettant une lecture directe, rapide et simultanée de chaque site d'interaction. Enfin, les perspectives ultimes nous permettent d'envisager l'intégration sur la surface de l'ensemble des étapes de traitement, de lavage, et de l'acheminement des composés au niveau de chaque détecteur. Ces manipulations se feraient sur de très petits volumes et sur de très faibles quantités de produits. Ces systèmes qualifiés de "laboratoire sur puce" (lab on chip) constituent l'étape ultime de miniaturisation offerte par les nanotechnologies.

Il est important de noter que le principe des biopuces n'est pas limité au seul cas de l'ADN. Ainsi, le procédé est applicable à tout couple de molécules présentant une affinité réagissant de façon sélective. Il est possible d'utiliser des biopuces pour la détection d'ARN², ADN_c, d'enzymes, de peptides, d'anticorps, de protéines au sens large ...

1.2.2 Vers la Post-génomique : les puces à protéines

L'expression des gènes dans l'organisme se traduit tout d'abord par la production des ARN messagers qui constituent le transcriptome. Ces mêmes ARN messagers sont quant à eux, à l'origine de la production de protéines dans l'organisme. La "protéomique" est le domaine qui permet de mettre en relation les produits des gènes (protéines) et le comportement cellulaire. Elle constitue donc l'étape suivante à l'étude du génome. Son but est d'étudier les structures et les fonctions de toutes les protéines codées par le génome et leurs interactions à un moment donné ou sous certaines conditions environnementales. L'analyse protéomique étant focalisée sur le produit final de l'expression des gènes, elle est probablement mieux à même d'intégrer plus directement les mécanismes de fonctionnement de la cellule, y compris les régulations traductionnelles et post-traductionnelles. Ces régulations post-traductionnelles jouent un rôle important dans la modulation de l'activité des protéines et un des enjeux de l'analyse protéomique est de disposer de la finesse analytique permettant de prendre en compte ces modifications. Ainsi, le défi de la protéomique consiste à trouver des moyens de mesurer les protéines actives à l'échelle du protéome et de connaître avec quels composants de la cellule elles interagissent (ADN, ARN, autres protéines et molécules).

A l'heure actuelle, les méthodes utilisées pour analyser des protéines (électrophorèse sur gel, digestion enzymatique, spectrométrie de masse,...) restent limitées par leur faible débit, et leur faible reproductibilité.

Dans ce contexte les puces à protéines, dont le fonctionnement est similaire à celui que nous avons décrit précédemment convient parfaitement à la détection et l'analyse de protéines. La fabrication de ces puces à des fins d'analyse à moyenne et à grande échelle (toutes les protéines d'un organisme sur une puce) ou à haut débit (une espèce de protéine pour détecter son interaction avec une multitude de ligands) est devenu un enjeu important depuis quelques années. Leur fonctionnement [5] est basé sur l'interaction ligand-récepteur que nous présenterons en détail en Annexe C. Un anticorps est immobilisé sur la surface de la puce. L'interaction d'une protéine avec cet anticorps

²Acide Ribo Nucléique

est sélective et permet ainsi de détecter, via un marqueur, la nature de la protéine à identifier.

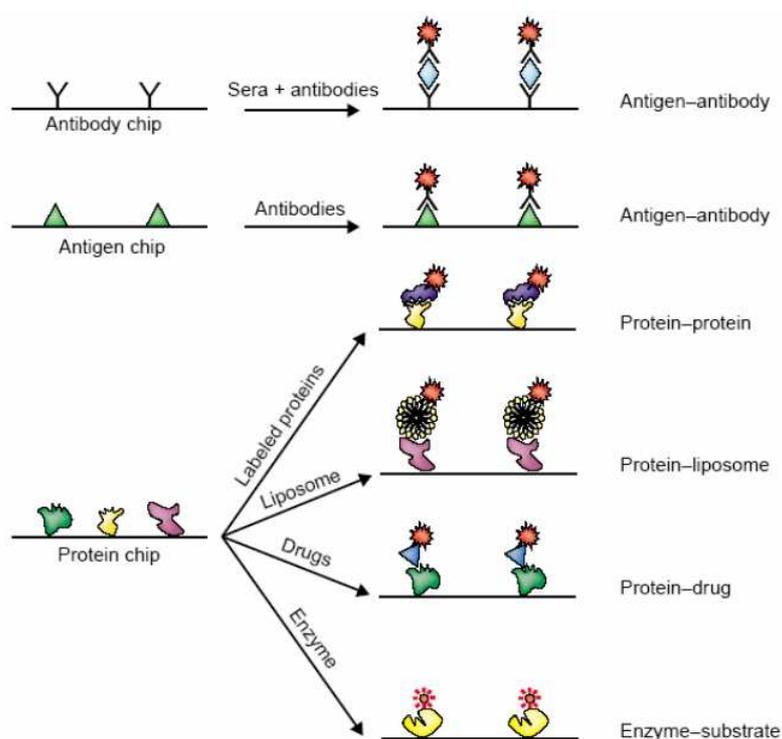


FIG. 1.3 – Schéma illustrant différentes stratégies de détection de protéines (d'après[5]).

Dans cette approche, les problèmes les plus fondamentaux concernent tout d'abord la conservation de l'activité biologique de la protéine lorsque elle est immobilisée sur une surface. Il convient également de disposer d'une méthode de mesure des interactions entre protéines et ligands simple et rapide. Une fois de plus, les possibilités de miniaturisation offertes par les nanotechnologies présentent de nombreux avantages : elle permettent tout d'abord de limiter les volumes de réactifs nécessaires, d'augmenter le rendement de l'analyse et la finesse de l'analyse (multiplication des essais et sensibilité de détection).

D'autre part, la miniaturisation à une échelle nanométrique permet, à l'intérieur de ces systèmes, d'ajouter des fonctionnalités et des performances ultimes en terme d'extraction, de séparation ou de détection des molécules biologiques. Ainsi l'intégration de nanosystèmes dans des microsystèmes de fluide est pressenti comme un des développements technologiques majeur dans ces disciplines et en particulier pour la protéomique.

Les études désormais qualifiées de post-génomiques feront appel très largement à l'utilisation de systèmes intégrés ou puces permettant, grâce à leur miniaturisation, de réaliser des purifications, des concentrations, des réactions et des analyses biologiques sur de petits volumes plus rapidement. Cette réduction des dimensions et cette intégration des fonctions permettent également de multiplexer ces opérations, ce qui ouvre la voie à des essais systématiques sur de grandes séries où de nombreuses combinaisons de réactions peuvent être étudiées et analysées.

1.3 Différents types de transduction

L'exemple des biopuces nous a permis de voir qu'il est possible d'utiliser les propriétés de reconnaissances des biomolécules pour détecter la formation d'un couple cible sonde sur une surface. Cette approche est désormais utilisée dans la plupart des applications de biodétection. Le choix de la méthode de détection ou plus exactement du principe physique qu'il est possible d'utiliser reste ouvert. Il dépend en partie des propriétés des molécules et nécessite généralement un marquage, c'est-à-dire une fonctionnalisation par un groupement permettant de modifier les propriétés physico-chimiques de biomolécules pour les rendre détectables. Nombreuses sont les techniques de détection qui ont été proposées et mises au point pour la détection de biomolécules. L'objectif de ce paragraphe n'est surtout pas de donner une présentation exhaustive des techniques proposées à ce jour mais plutôt de dégager, à partir de quelques exemples précis, les enjeux relatifs au développement de méthodes de biodétection ainsi que les perspectives nouvelles offertes par les nanotechnologies.

1.3.1 La notion de biocapteur

De façon générale, nous pouvons définir un biocapteur comme étant un dispositif intégrant un composé biologique déposé sur une surface solide qui peut interagir avec un autre composé de façon spécifique et un dispositif de transduction qui permet de traduire la réaction en un signal électrique [6]. La configuration générale d'un tel dispositif est décrit dans la figure 1.4.

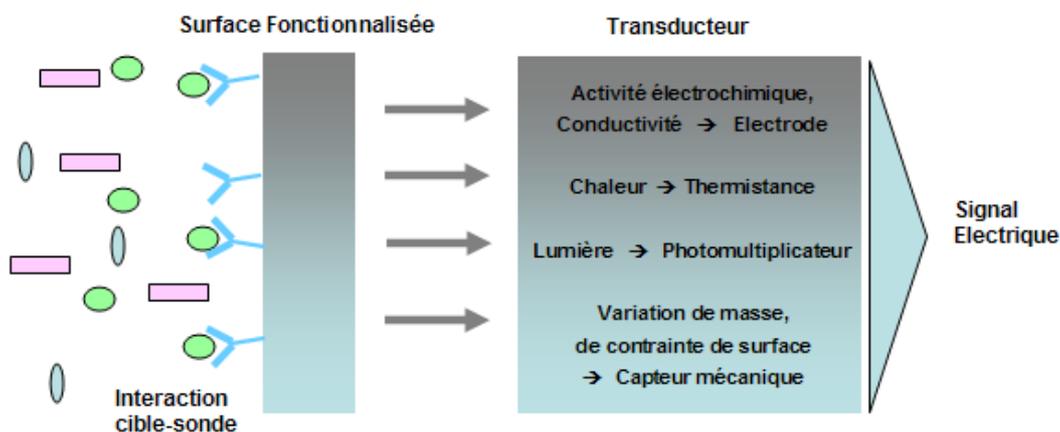


FIG. 1.4 – Illustration schématique de l'architecture courante d'un biocapteur. Une réaction biospécifique a lieu sur la surface du dispositif. Un système de détection permet de traduire cette interaction en un signal électrique mesurable [6].

Ce dispositif permet de traduire une reconnaissance biologique à partir de l'interaction entre un composé sonde déposé sur la surface du capteur et un composé cible présent en solution. Le composé sonde est choisi pour réagir de façon spécifique avec le composé cible. Les molécules immobilisées sur la surface peuvent être des protéines, des oligonucléotides, des peptides, des anticorps, des enzymes.

Dans le cas de l'immunodétection, nous pouvons distinguer deux classes de capteurs biologiques ou biocapteurs : les biocapteurs à affinité qui sont basés sur la détection des interactions spécifiques entre deux molécules et les biocapteurs catalytiques qui utilisent généralement des enzymes pour catalyser une réaction chimique dont les produits sont détectables.

Nous pouvons distinguer quatre types de d'immunodétecteurs qui se différencient par le principe de la détection utilisée qui peut être de nature optique, électrochimique, mécanique ou encore thermique.

1.3.2 Détection optique

1.3.2.1 Détection par fluorescence

À l'heure actuelle, l'utilisation de la fluorescence pour la détection de biomolécules constitue la méthode de détection la plus fréquemment rencontrée en Biologie.

Le principe de la détection est basé sur le marquage des molécules étudiées par des molécules fluorescentes (fluorophores ou fluorochromes). Ces molécules absorbent de l'énergie lumineuse dans une gamme de longueur d'onde donnée et restituent une partie de cette énergie sous forme de lumière par fluorescence. Ces molécules sont donc caractérisées par une longueur d'onde d'excitation et d'émission. A ce jour de nombreux marqueurs fluorescents sont disponibles sur le marché et couvrent une large gamme de longueurs d'ondes.

Nous avons vu à la figure 1.2 un exemple d'observation de la surface d'une biopuce à ADN réalisée à l'aide d'un scanner. Cet appareil permet de balayer la surface de la puce avec une source lumineuse accordée à la fréquence d'excitation des fluorophores. Des capteurs (photo-multiplicateur ou caméras CCD) permettent de collecter la lumière émise par fluorescence et de reconstituer une image de la surface avec une résolution latérale de l'ordre de $10\mu m$.

Les inconvénients majeurs de ces techniques sont bien évidemment liés à la nécessité de marquer les molécules pour leur détection. La fonctionnalisation des molécules requiert des étapes supplémentaires de préparation dans les protocoles à mettre en oeuvre. Par ailleurs, les marqueurs fluorescents présentent un certain nombre de limitations : la première limitation provient du phénomène de "quenching" qui résulte de l'absorption d'une partie de l'énergie par les autres molécules situées à proximité dans le milieu. Le second phénomène limitant est appelé photoblanchiment et caractérise la perte des propriétés fluorescentes des molécules sous l'effet d'une excitation par une forte intensité lumineuse. L'énergie absorbée par les molécules peut provoquer des réactions chimiques qui altèrent de façon irréversible les propriétés de fluorescence.

1.3.2.2 Détection par Résonance plasmon de surface

De nombreuses méthodes de détection optique sont basées non pas sur la détection d'un signal optique provenant directement des molécules étudiées comme la fluorescence mais sur la modification des propriétés optiques de surface ou de guide d'onde, engendrée par la formation de complexes cible-sonde.

L'exemple le plus représentatif de ces techniques repose sur l'utilisation du phénomène de résonance de plasmons de surface[7, 8, 9]. Cette technique a donné lieu au

développement de nombreux systèmes de détection qui, couplés à des dispositifs de microfluidique, permettent en particulier de suivre des interactions entre molécules directement en solution. Le schéma de la figure 1.5 nous donne une description simplifiée du principe de fonctionnement de cette technique de détection.

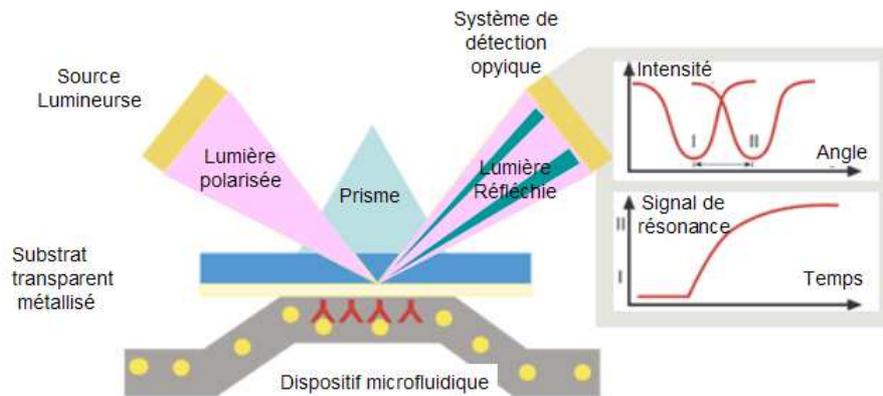


FIG. 1.5 – Schéma de principe de la détection de biomolécules par Résonance de Plasmons de Surface (SPR) tel qu'il est utilisé par la société Biacore (<http://www.biacore.com>). Un faisceau de lumière polarisée illumine la surface métallisée d'un prisme placé en contact avec la solution d'intérêt. Le système d'illumination en réflexion totale permet de générer une onde évanescente. Sous un angle d'incidence donné, appelé angle de résonance SPR, le couplage de cette onde avec les électrons de la couche métallique provoque une forte diminution de l'intensité de la lumière réfléchie. L'angle de résonance est très sensible aux variations d'indices de réfraction induits par l'immobilisation de composés sur la surface de la lame métallisée. Le suivi des variations de l'angle de réflexion associé au minimum d'intensité, permet d'étudier, en milieu liquide, l'adsorption ou la désorption de molécules sur la surface.

Le principe de la technique est le suivant : un faisceau de lumière illumine l'interface entre deux milieux d'indice de réfraction différents. Suivant les conditions d'orientation du faisceau incident, il est possible d'obtenir une réflexion totale de la lumière à l'interface. Dans ces conditions, une onde évanescente apparaît à l'interface entre les deux milieux. Si l'interface est recouverte d'une fine couche (environ 50nm) d'un matériau riche en électrons tel qu'un métal, l'onde évanescente peut alors exciter les électrons libres de la couche métallique conduisant à une oscillation collective des électrons à la surface qui est décrite par une onde plasmon. Sous un angle d'incidence particulier, il est possible d'atteindre la résonance pour laquelle le couplage entre les photons et les électrons se traduit par une absorption de l'énergie associée à l'onde incidente. Ce phénomène se traduit par une chute importante de l'intensité lumineuse réfléchie. L'angle correspondant est l'angle de résonance.

L'excitation de l'onde plasmon est particulièrement sensible à l'indice de réfraction du milieu présent sur la surface métallique [10]. Toute modification de cet indice se traduit par une modification de l'angle d'incidence permettant la résonance SPR. Le

principe de la détection consiste à suivre les variations de l'angle de réflexion pour lequel l'intensité de lumière réfléchi est minimale, c'est à dire l'angle de résonance au cours d'une réaction biochimique se déroulant à la surface.

Ainsi, en plaçant des ligands sur la surface métallique, il est possible d'utiliser les variations d'indice de réfraction provoquées par l'immobilisation de molécules sur la surface (i.e. les variations de l'angle de résonance) pour étudier la cinétique de l'interaction molécule/ligand.

Les principales applications de cette technique concernent essentiellement le suivi des interactions de type protéines-protéines ou protéines-ADN. La sensibilité de la détection est inférieure à $1\text{pg}/\text{mm}^2$ [7] et place l'utilisation de la SPR parmi les techniques de détection les plus performantes. Toutefois, cette technique présente certaines limitations en particulier pour la détection de composés de faible masse molaire.

Le principe de détection par Résonance Plasmon de surface est en particulier utilisé par la société biacore qui propose des systèmes intégrés incluant un système de microfluidique permettant l'acheminement des produits d'intérêts sur la surface étudiées et une mesure des variations d'angles d'extinction par l'intermédiaire d'une barette de détecteurs optiques.

La technique de détection par résonance plasmon de surface présente des atouts majeurs qui sont pour nous emblématiques des exigences que l'on peut avoir vis-à-vis d'un système de biodétection. Outre sa très grande sensibilité, cette technique ne nécessite aucune étape de marquage des molécules à analyser contrairement aux méthodes de détection optique basées sur la fluorescence. La seule présence des molécules sur la surface du dispositif permet de modifier l'indice de réfraction du milieu sur la surface et d'engendrer une variation de l'angle de résonance.

Par ailleurs, le couplage de la technique avec un dispositif de microfluidique permet de suivre, directement en solution, la désorption ou l'immobilisation de molécules. Les molécules demeurent en solution tout au long de l'expérience et conservent donc toute leur réactivité. Le suivi des cinétiques de formation de complexes moléculaires est donc possible. L'utilisation de circuits de microfluidique permet également de limiter considérablement les volumes nécessaires (quelques μL) pour procéder à la détection.

La limitation principale de cette technique est qu'il est difficile d'imaginer son intégration complète sur une puce. La SPR est donc à notre avis l'archétype d'une méthode de détection excellente (sensible, sans marquage) mais qui nécessite un appareillage externe non intégrable sur la lame où ont lieu les interactions. Un des buts de nos recherches serait d'obtenir une méthode de détection aussi bonne que la SPR en terme de sensibilité mais sur un dispositif intégré à la lame.

1.3.3 Détection magnétique

Le principe de la détection magnétique utilisée pour la biodétection repose essentiellement sur l'utilisation de particules magnétiques pour le marquage des molécules cibles. Depuis ces premiers développements par le Naval Research Laboratory en 1998, de nombreux laboratoires ont pu développer des méthodes de détection de particules magnétiques par des capteurs à magnétorésistance géante [11, 12]. En 2002, le premier système de détection basé sur des capteurs à vanne de spin a permis de détecter la présence de biomolécules immobilisées sur des surfaces [13]. Parmi les développements

les plus récents, des niveaux de sensibilités de l'ordre de la particule unique ont pu être démontrés.

La technique utilisée par D.L. Graham et al repose sur la fonctionnalisation de molécules par des particules magnétiques (composées d'oxyde de fer dans une matrice polymère) de $2\mu m$ de diamètre. Ces particules sont fonctionnalisées par des molécules de streptavidine et peuvent être immobilisées sur une surface présentant des molécules de biotine. Comme l'illustre la Figure 1.6 cette méthode peut être appliquée à la détection d'une hybridation entre deux oligonucléotides déposés sur la surface d'un capteur à vanne de spin [14].

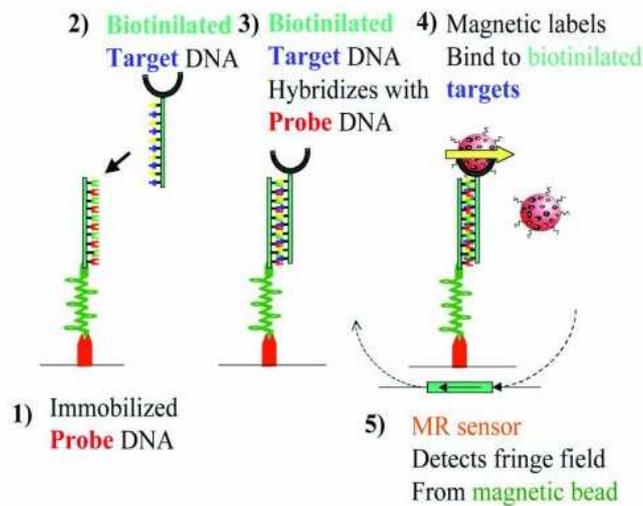


FIG. 1.6 – Schéma illustrant le principe de détection d'une hybridation entre deux oligonucléotides par greffage sélectif de particules magnétiques sur la surface d'un capteur à vanne de spin (d'après [14]).

La détection de la particule est effectuée sur des dispositifs de détection à vanne de spin fabriqués sur un substrat silicium. Ce principe permet de démontrer des niveaux de sensibilité de détection d'une seule particule immobilisée sur la surface. La figure 1.7 nous présente un exemple des résultats obtenus [15]).

Cette méthode de détection permet d'obtenir une détection intégrée à la lame grâce à la microfabrication d'un capteur de champ magnétique à base d'une vanne de spin, mais passe par l'utilisation d'un marquage des molécules. Les auteurs présentent des résultats qui démontrent une sensibilité du niveau d'une particule unique, mais passent sous silence le fait que pour avoir un signal magnétique mesurable, ils doivent travailler avec des particules très grosses (quelques μm) qui masquent un très grand nombre de biomolécules. Dans d'autres termes, la sensibilité de la détection en terme de nombre de nanoparticules ayant interagit est beaucoup plus modeste puisqu'une nanoparticule est capable de recouvrir plusieurs milliers de molécules. D'autre part, le coût de fabrication des capteurs à vanne de spin reste élevé pour un usage "grand public" de tels dispositifs de détection. Nous verrons dans la suite que notre électrode de détection s'apparente un peu avec cette technologie mais nous démontrerons la possibilité de travailler avec des particules de taille nanométrique et des systèmes de détection à base de nanoélectrodes beaucoup plus simples que des vannes de spin.

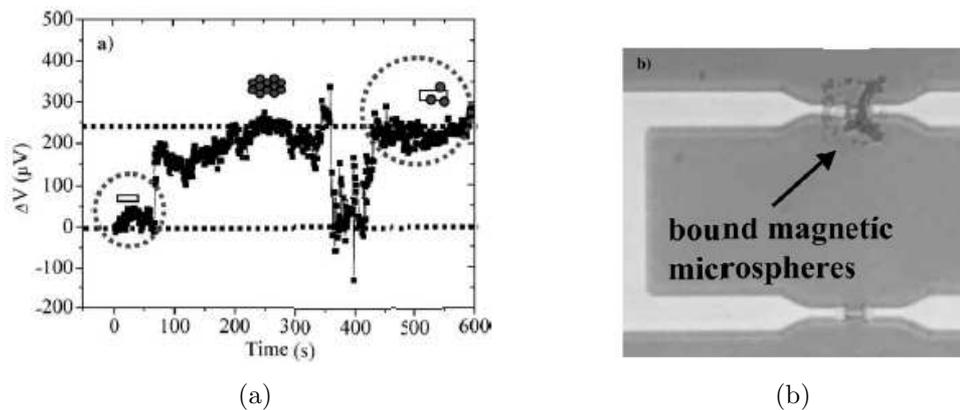


FIG. 1.7 – (a) Image de la surface d'un capteur à vanne de spin fonctionnalisée par des molécules de biotine après le greffage de particules magnétiques fonctionnalisées par des molécules de streptavidine. (b) Variation différentielle du signal obtenu à partir du même capteur par rapport à un capteur non fonctionnalisé.

1.3.4 Détection mécanique

Depuis quelques années de nombreux travaux ont été dédiés à la mise au point méthodes de détection mécanique pour lesquelles les sondes biologiques sont fixées sur la surface de microbalances ou microleviers. Ces derniers ont bénéficié des nombreux développements menés dans le domaine de la microscopie à force atomique qui ont permis d'intégrer des capteurs de forces ou de contraintes à l'intérieur de microsystèmes intégrés.

1.3.4.1 Microbalance à quartz

Les systèmes les plus classiques utilisant une transduction mécanique sont les microbalances à quartz (QCM : Quartz Crystal Microbalance). Ces systèmes sont utilisés en particulier pour la mesure de l'épaisseur de dépôt de matériaux en films minces en temps réel. Il s'agit de pastilles de quelques millimètres d'épaisseur et de quelques centimètres de diamètre. Le quartz est mis en vibration à sa fréquence de résonance qui est typiquement comprise entre 5 et 25Mhz. Dans le cadre de leur utilisation pour la biodétection, le principe de la détection est basé sur la variation de masse engendrée par la formation d'un complexe sonde-cible pour modifier leur fréquence de résonance mécanique. Ces dispositifs ont été utilisés pour la reconnaissance d'anticorps [16], d'oligonucléotides [17] et ont pu démontrer des sensibilités de l'ordre de quelques ng/cm^2 .

1.3.4.2 Dispositifs à onde acoustique de surface

Les dispositifs à onde acoustique de surface (SAW : Surface Acoustic Wave) fonctionnent également à partir de la modification du comportement vibratoire d'un cristal piézoélectrique par la modification de l'état de surface. Un système émetteur, basé sur des électrodes interdigitées excite un matériau piézoélectrique et crée une onde de surface qui peut ensuite être détectée par un autre réseau d'électrodes interdigitées. Si la surface est fonctionnalisée par une molécule sonde, l'immobilisation d'une molécule

cible se traduit par une variation de masse et donc une modification de la fréquence de résonance. Les dispositifs SAW sont été utilisés en particulier dans des applications d'immunodétection (détection d'anticorps)[18, 19].

L'utilisation de ces systèmes en milieu liquide reste très limitée du fait de la forte absorption de l'onde dans la gamme des fréquences utilisées (30 à 500Mhz).

1.3.4.3 Micro et nano systèmes électro-mécaniques

Les premiers exemples de réalisation concernent l'utilisation de dispositifs de types microleviers en mode statique. Un exemple de réalisation mené par J.Fritz et al. [20] est donné dans la figure 1.8. Dans ces expériences, des microleviers en Silicium ont pu être utilisés pour la transduction d'une hybridation de molécules d'ADN en une information mécanique au travers d'une variation de contrainte qui se traduit par une déflexion statique des micro-leviers. Ces expériences ont pu démontrer un très fort niveau de sensibilité en montrant qu'il est possible de discerner un mésappariement d'une seule base lors de l'hybridation entre deux brins cible et sonde de 12 bases. Des expériences similaires menées par K.M.Hansen et al. [21] ont pu démontrer qu'il était possible de distinguer des mésappariements de 0, 1 ou 2 bases pour des oligonucléotides cible et sonde de 25 mers. Une application de ces dispositifs pour le dosage d'antigènes spécifiques PSA (prostate-specific antigen) a également été réalisée sur des bras de levier fonctionnalisés par des anticorps spécifiques à la PSA [22].

Les microleviers peuvent également être utilisés dans un mode dynamique pour lequel toute modification de la surface des dispositifs ou du milieu environnant se traduit par une variation de la fréquence de résonance. Il est ainsi possible de traduire une variation de masse induite par le greffage de molécules sur la surface des micro-leviers. Cette approche a permis de démontrer des sensibilités très élevées de l'ordre de 10^{-15} g.

Les modifications de fréquences peuvent également être corrélées à des variations de la raideur des micro-leviers ou encore à des variations de la viscosité du milieu dans lequel le dispositif est placé [23].

Des systèmes résonants basés sur des membranes de silicium ont également été utilisés avec succès pour des applications de détection [24]. La figure 1.9 présente une image de dispositifs utilisés pour la détection de nanoparticules métalliques de 40nm de diamètre.

La densité minimum détectable mesurée est de 5,3ng/mm² (20 fois supérieure à des dispositifs de type microbalance à quartz, capteur à ondes de surface ou de flexion), ce qui correspond à une densité de colloïdes sur la surface de la membrane de 7 colloïdes par μm^2 .

Le développement des techniques de détection basés sur l'utilisation d'une transduction en un signal mécanique est un exemple intéressant des perspectives offertes par les micro-nanotechnologies. En effet, les simulations montrent clairement que la sensibilité des systèmes est directement liée à leur fréquence de résonance, à la masse effective et plus généralement aux dimensions des structures utilisées.

Les perspectives envisageables en ce qui concerne la miniaturisation de ces dispositifs sont particulièrement prometteuses. En effet, la diminution des dimensions des systèmes résonants permet d'augmenter considérablement les sensibilités des dispositifs [24]. Par exemple, dans le cas de membranes oscillantes telles que celles présentées précédemment,

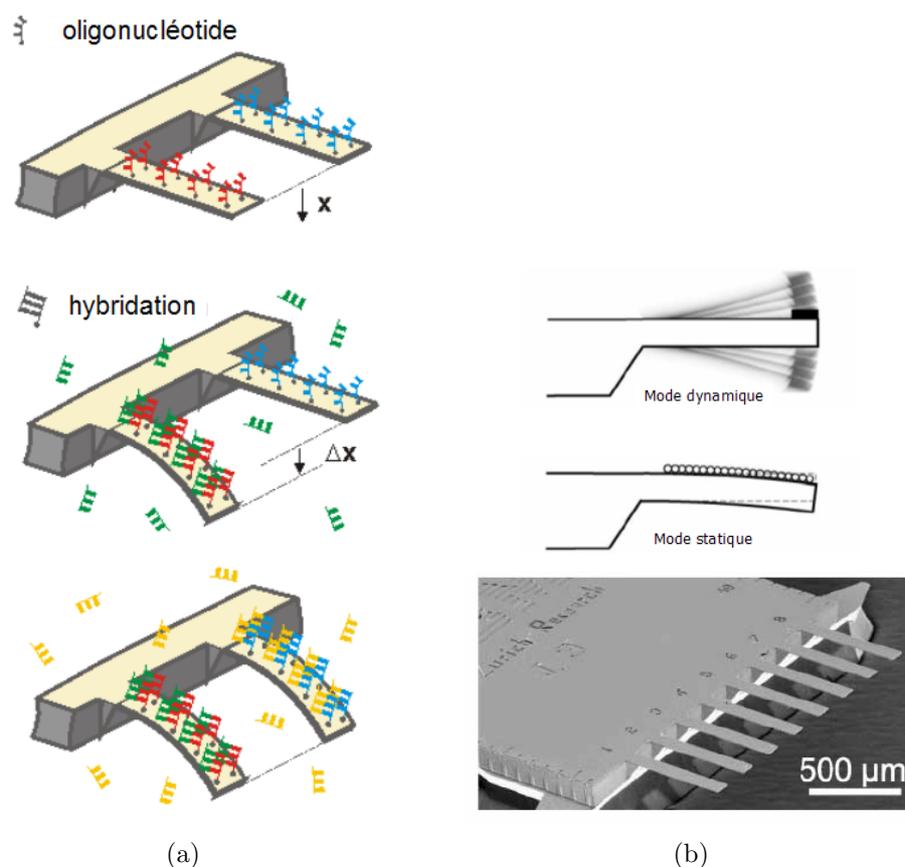


FIG. 1.8 – (a) Illustration du principe de la détection d'une hybridation entre deux oligonucléotides par la mesure de la déflexion de bras de leviers en mode statique. (b) Image MEB d'un réseau de bras de levier pour une détection en parallèle.

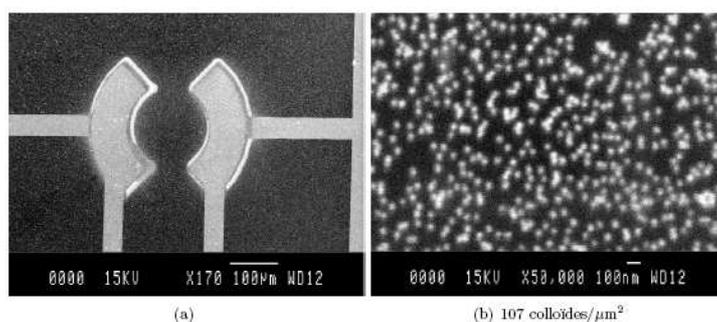


FIG. 1.9 – Images MEB d'une membrane circulaire à excitation annulaire interrompue couverte de colloïdes d'or de 40nm de diamètre (d'après [24]).

une diminution d'un facteur 6 des dimensions des membranes permet de gagner un facteur 1000 sur la sensibilité.

De nombreux efforts sont consacrés actuellement à la réalisation de dispositifs à l'échelle nanométrique et à l'étude des comportements mécaniques des matériaux à ces dimensions. Un exemple de réalisation (S.G. Nilsson et al [25]) nous est donné à la figure 1.10. Il s'agit de bras de levier nanométriques de $2\mu\text{m}$ de long, 150nm de large et 50nm

d'épaisseur.

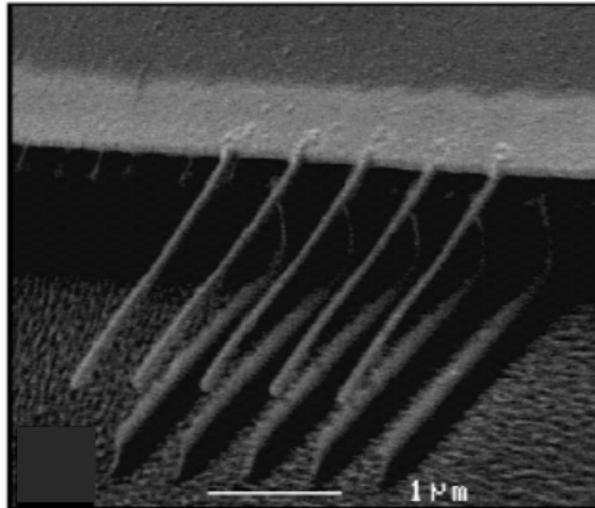


FIG. 1.10 – Image MEB d'un réseaux de bras de levier nanométriques en Chrome (longueur : $2\mu\text{m}$, épaisseur : 50nm , largeur : 150nm) [25].

Bien sûr, cette miniaturisation pose le problème des techniques de fabrication à employer pour leur réalisation. Elle nécessite l'utilisation de techniques de lithographie telles que la lithographie électronique et réclame également un contrôle optimal des qualités des couches minces déposées. L'étude du comportement mécanique des matériaux à ces dimensions et notamment la fragilisation des structures due à la réduction des dimensions restent à l'étude.

Les microleviers constituent un exemple d'application particulièrement intéressant car il révèle les paramètres clés pour des applications de biodétection et les perspectives offertes par le développement des micro-nanotechnologies. Il s'agit d'un système déjà très sensible et dont les performances pourront encore être considérablement améliorées par la réduction en taille. Il permet également une détection intégrée (détection optique, intégration de matériaux piézorésistifs [24], ...) et une mise en parallèle des dispositifs (jusqu'à 1000 bras de levier sur le même dispositif [20]) pour augmenter les vitesses de criblage. Enfin, la détection d'une interaction moléculaire à partir d'une sonde greffée sur la surface ne nécessite pas nécessairement d'étape de marquage des molécules étudiées et permet également une réutilisation du dispositif après détection.

1.3.5 Détection électrique

1.3.5.1 Mesure de potentiel électrochimique

Le capteur électrochimique est, par définition, un capteur incluant un transducteur électrochimique. Ces dispositifs opèrent généralement en milieu liquide et permettent le suivi en temps réel d'une réaction ou d'une interaction. Ces dispositifs incluent généralement une ou plusieurs électrodes fonctionnalisées par des composés biospécifiques. Ils constituent des méthodes simples, peu onéreuses et très sensibles comme le sont les techniques basées sur la détection par fluorescence. Ces méthodes sont particulièrement intéressantes car elles combinent la sensibilité et les capacités de mesures analytiques

des capteurs électrochimiques à la sélectivité des interactions entre biomolécules. On distingue plusieurs types de principes de détection qui peuvent être potentiométriques, ampérométriques ou conductimétriques [26].

1.3.5.2 Mesures potentiométriques

De façon générale, le principe des transducteurs potentiométriques est basé sur la mesure d'une différence de potentiel entre deux électrodes. Il repose sur l'utilisation de la loi de Nernst qui permet de corrélérer les variations de potentiel observées à la concentration des espèces ioniques en solution. Plusieurs approches sont envisageables :

La première approche consiste en la mesure des variations de potentiels entre deux électrodes fonctionnalisées de façon à présenter une sensibilité vis à vis de certaines espèces présentes en solution. La création de complexes sur la surface de l'électrode provoque une variation de charge qui est mesurée. Certaines approches sont basées sur l'utilisation de membranes fonctionnalisées placées entre l'électrode de mesure et la solution qui filtre de façon sélective les espèces jusqu'à l'électrode.

La deuxième approche est basée sur l'utilisation de transistors à effet de champ (FET : Field Effect Transistor) [27]. Le principe de la technique consiste à utiliser les variations de charges de surface d'une électrode appelée grille pour modifier le courant traversant le transistor. De façon similaire à la première approche, il est possible de fonctionnaliser l'électrode ou de filtrer les espèces parvenant à l'électrode pour rendre la détection sélective.

1.3.5.3 Mesures ampérométriques

La détection par mesure ampérométrique repose sur les phénomènes d'oxydation et de réduction d'espèces chimiques actives en solution [28]. Les mesures sont généralement effectuées en appliquant une tension de polarisation constante entre une électrode ou un réseau d'électrodes interdigitées et une électrode de référence et en mesurant le courant qui traverse le système. Le courant mesuré est directement lié à la variation de concentration des espèces actives électrochimiquement ou à la vitesse de réaction de production ou de consommation de cette espèce.

Bien que cette méthode ne permette pas une mesure directe de l'espèce recherchée et reste étroitement dépendante des phénomènes de diffusion des espèces en solution, elle présente une très bonne sensibilité due en partie à la dépendance logarithmique (Equation de Nernst) entre les concentrations des espèces et les variations de potentiels mesurées.

1.3.5.4 Mesures impédancemétriques

De nombreuses réactions, en particulier des réactions enzymatiques, peuvent être étudiées par des mesures de conductances ou de capacités. Ces réactions consomment ou au contraire produisent des ions en solutions. Des mesures à tension constante permettent de mesurer les variations de capacité ou de conductivité entre deux électrodes ou des réseaux d'électrodes dont la surface est modifiée de façon à fixer sélectivement certains des produits des réactions [29].

1.4 Vers un Nano-adressage électrique

La transduction directe d'une interaction entre biomolécules en signal électrique, comme dans le cas de l'électrochimie, est une méthode intéressante pour une intégration simple du dispositif. C'est dans cette perspective que nous avons inscrit notre étude.

1.4.1 Une idée simple ...

Une idée simple que nous pourrions même qualifier de naïve consisterait à utiliser la conductivité intrinsèque des biomolécules pour leur détection. Dans un système conventionnel de reconnaissance basé sur une interaction entre une molécule cible et une molécule sonde, la différence de conductivité entre la molécule cible et le complexe formé pourrait être directement exploitée pour modifier un signal électrique. Les avantages apportés par cette approche résident d'une part dans la simplicité de la mesure qui peut être effectuée au travers du suivi de l'évolution des caractéristiques $I(V)$ du dispositif et d'autre part dans le fait qu'aucune étape de marquage n'est nécessaire pour mener à bien la détection.

Comme l'illustre la figure 1.11, la mise en place d'un système de détection tel que celui que nous venons de décrire passe par le développement de structures d'adressage électrique qui permettent de collecter et de mesurer la conductivité des molécules protagonistes.

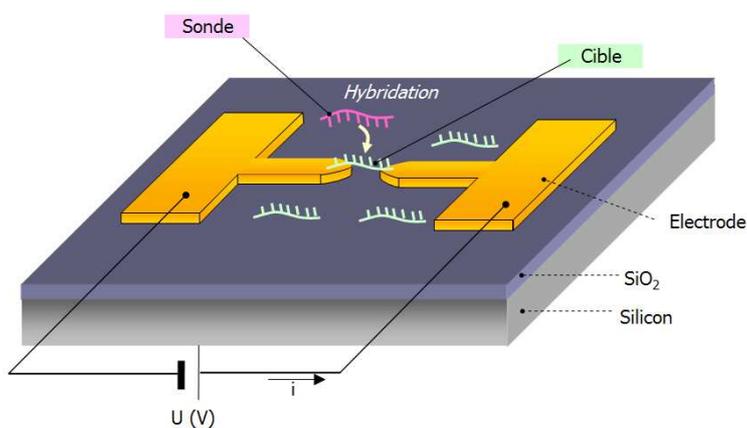


FIG. 1.11 – Schéma illustrant un système de détection basé sur la détection électrique d'une molécule cible (ici un oligonucléotide) par mesure de conductivité. Une molécule sonde (un autre oligonucléotide) est initialement greffée sur la surface du dispositif. La formation d'un complexe entre la molécule cible et une molécule sonde modifie la conductance du milieu entre les deux électrodes fabriquées sur la surface. La mesure est réalisée en suivant l'évolution de la caractéristique $I(V)$ du dispositif.

Dans ce schéma de détection, le système que nous avons imaginé est basé sur l'immobilisation de biomolécules sur un substrat entre deux électrodes planes et sur la mesure de leur conductivité par l'intermédiaire de deux électrodes en vis-à-vis intégrées sur la surface du dispositif. Une première molécule sonde est immobilisée sur la surface. Une solution contenant les molécules cibles est ensuite incubée sur le dispositif. Dans le cas

d'une interaction entre les deux molécules, la formation du complexe entre ces deux molécules peut être détectée en mettant à profit la différence de conductivité engendrée. La mesure repose simplement sur le suivi de l'évolution du courant traversant le dispositif lorsqu'il est polarisé.

Ce système ne nécessite donc, a priori, aucune étape de marquage des molécules cibles et repose sur une mesure très simple de conductivité.

1.4.2 Des nanoélectrodes pour une détection ultra sensible

Dans cette approche simple, les perspectives et les avantages liés à l'utilisation des nanotechnologies apparaissent clairement. Le développement de systèmes d'adressage électrique à l'échelle nanométrique paraît particulièrement pertinent : en diminuant les dimensions du dispositif, en particulier la distance entre les deux électrodes, nous voyons qu'à une échelle ultime, une seule molécule ou complexe est présent dans l'espace inter-électrodes. Ainsi, si nous parvenons à immobiliser des molécules sur la surface et en particulier dans cet espace, la mesure de conductivité n'est effectuée que sur une molécule ou un complexe. Si nous parvenons à mesurer cette conductivité, nous disposerions alors d'un système de détection travaillant à l'échelle d'une seule molécule et disposant donc d'une sensibilité ultime. Un tel dispositif combine donc les avantages liés à la détection électrique (mesure simple, rapide, intégrable) et à l'apport des nanotechnologies, à savoir une très haute sensibilité directement couplée à la possibilité d'utiliser une faible quantité de composés.

La première étape vers la réalisation d'un tel schéma de détection consiste donc à réaliser des dispositifs permettant l'adressage de biomolécules jusqu'à la connexion de molécules uniques. Les dimensions des objets auxquels nous allons nous intéresser (ADN, protéines, ...) sont généralement inférieures à 100nm. Dans le cas d'une architecture basée sur des électrodes en vis à vis telle que celle que nous venons de présenter, cette condition se traduit donc par des espaces inter-électrodes eux aussi inférieurs à 100nm.

1.4.2.1 Nanoélectrodes pour l'adressage électrique de molécules

Dans ce paragraphe, nous allons présenter quelques exemples de techniques de réalisation de dispositifs d'adressage électrique permettant la connexion de nano-objets entre deux électrodes elles mêmes reliées à un système de mesure électrique macroscopique. Une large partie des recherches dans le cadre desquelles ont été réalisés ces dispositifs s'inscrit dans le domaine de l'électronique moléculaire définie comme la réalisation de composants constitués d'une ou plusieurs molécules [30].

1.4.2.2 Utilisation d'une sonde tunnel

L'utilisation de la microscopie à effet tunnel (STM) est à l'origine de nombreuses études dédiées aux phénomènes de transport électronique au sein de molécules individuelles. Cette technique permet de générer des jonctions métal-molécule-métal de très petites dimensions en déplaçant et positionnant une pointe métallique de très faible rayon de courbure (10 à 20nm) sur une molécule ou un ensemble de molécules immobilisées sur un substrat lui aussi conducteur.

Cette approche permet par exemple d'étudier des molécules déposées sur une surface sous la forme de monocouches autoassemblées, d'objets isolés ou encore englobés dans une monocouche [30].

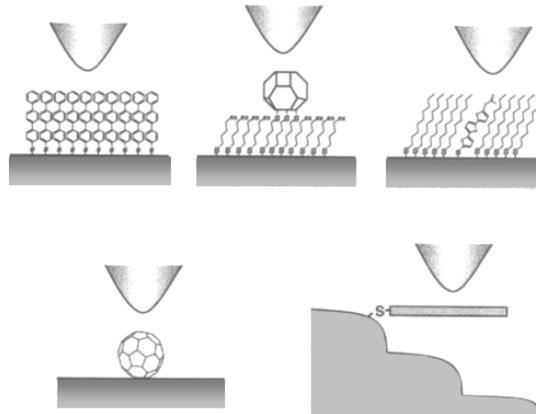


FIG. 1.12 – *Illustration des différents types d'expériences réalisables pour la connexion électrique de molécules grâce à un microscope à effet tunnel (STM) [30].*

Ces expériences ont pu mettre en évidence les problèmes des contacts électriques entre la pointe STM ou AFM et les molécules, en particulier lorsque celles-ci ne sont pas liées de façon covalente. Les mesures sont dominées par le contact et non pas par la molécule elle-même. Le nombre de molécules connectées dépend du rayon de courbure de la pointe mais il est possible d'adresser des objets individuellement lorsqu'ils sont isolés. Un exemple d'application concerne l'étude très controversée du transport électrique dans l'ADN pour lequel cette technique a constitué une approche fréquemment utilisée [31].

Un des avantages majeur du STM est de pouvoir réaliser des images et des mesures avec le même instrument. Ces microscopes en champ proche constituent donc des outils d'investigation uniques qui permettent dans certaines conditions de préparation de la surface, de réaliser des mesures de grande qualité à l'échelle de la molécule unique. L'interprétation de ces mesures n'est pas toujours facile en raison de la complexité liée au contact pointe/molécule. De plus, l'acquisition de mesures électriques reproductibles, dénuées d'artefact reste extrêmement délicate d'un point de vue expérimental. Ce type d'adressage électrique "vertical" est de ce fait très peu compatible avec une intégration du système visant à effectuer plusieurs mesures en parallèle. Un schéma "horizontal" ou "planaire" semble plus compatible avec cet objectif. Néanmoins cette technique présente un certain nombre d'inconvénients liés entre autre au manque de stabilité mécanique de la pointe lors de la mesure qui peut influencer la nature du contact ainsi que la conformation de l'objet étudié [32] et au problème de la résistance du contact entre la pointe et la molécule qui masque les propriétés de la molécule.

1.4.2.3 Réalisation d'électrodes planaires par lithographie électronique

Nous allons désormais nous intéresser à la recherche de techniques permettant la fabrication de dispositifs d'adressage planaires à l'échelle nanométrique. La lithographie

électronique reste à ce jour un technique de choix pour la production de nanostructures. Les progrès effectués autour des résines électrosensibles, des procédés de développement permettent désormais de produire de façon reproductible des structures planes sur une large variété de substrats avec une résolution proche de 5nm [33] et de combiner de très hautes densités [34]. Aussi, comme nous le verrons tout au long de ce chapitre, l'utilisation de la lithographie électronique reste, au travers des technologies Silicium, une voie très largement utilisée pour la fabrication de nanodispositifs d'adressage électrique.

Le principe général de la technique sera présenté en détail au chapitre 3. Il consiste à structurer un film de résine électrosensible déposé sur un substrat par insolation via un faisceau d'électrons et à la révélation des structures insolées. La technique dite de "lift-off" permet ensuite de transférer les structures générées dans la résine par l'intermédiaire d'un dépôt métallique et de fabriquer des pistes métalliques planes.

La figure 1.13 nous donne un aperçu de quelques architectures de nanoélectrodes fabriquées sur substrat silicium par la technique de lift-off.

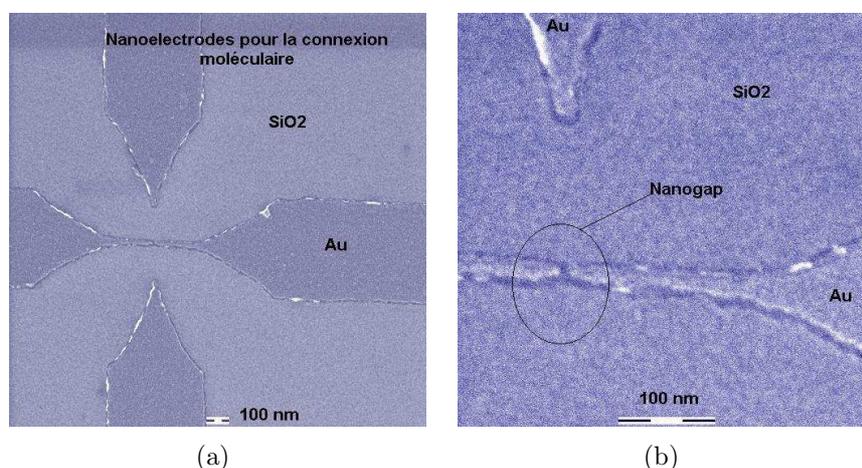


FIG. 1.13 – Exemple d'un dispositif composé de 4 nanoélectrodes métalliques planes fabriquées sur un substrat de silicium par lithographie électronique et lift-off (Titane/Or) [35]. La dimension de l'espace inter-électrodes (b) est de l'ordre de 5nm.

Comme nous pouvons le voir, cette technique présente l'avantage de pouvoir fabriquer des électrodes avec des résolutions proches de 5nm et des architectures très variées. Bien que relativement lente, la lithographie électronique reste très bien adaptée au développement de structures pour la recherche en laboratoire.

Toutefois, malgré la très forte résolution offerte par la lithographie électronique, la fabrication reproductible de nanogaps inférieurs à 10nm reste difficile et peu accessible du fait du coût élevé et de la lenteur de la technique. Des solutions alternatives ont été proposées entre autre pour diminuer les dimensions des espaces séparant les électrodes. Quelques exemples de ces méthodes sont présentés dans les paragraphes qui suivent.

1.4.2.4 Utilisation de nanoparticules

Les nanoparticules métalliques constituent des objets très intéressants de part la gamme de dimension qu'elles présentent (1nm à plusieurs centaines de nanomètres) et de part les multiples possibilités de fonctionnalisation chimique de leur surface.

Ainsi, ces nano-objets ont été utilisés pour l'électronique moléculaire en combinaison avec des nanoélectrodes fabriquées généralement par lithographie électronique. Le principe de l'adressage est basé sur l'immobilisation d'une ou plusieurs particules en réseaux dans l'espace séparant deux électrodes [36, 37, 38, 39]. La surface des particules ou des électrodes est couverte de la molécule à étudier. Les nanoparticules servent alors d'électrodes intermédiaires et permettent d'étudier le transport électrique au travers de jonctions métal-molécule-métal en série. Un exemple de réalisation [36] est donné dans la figure 1.14.

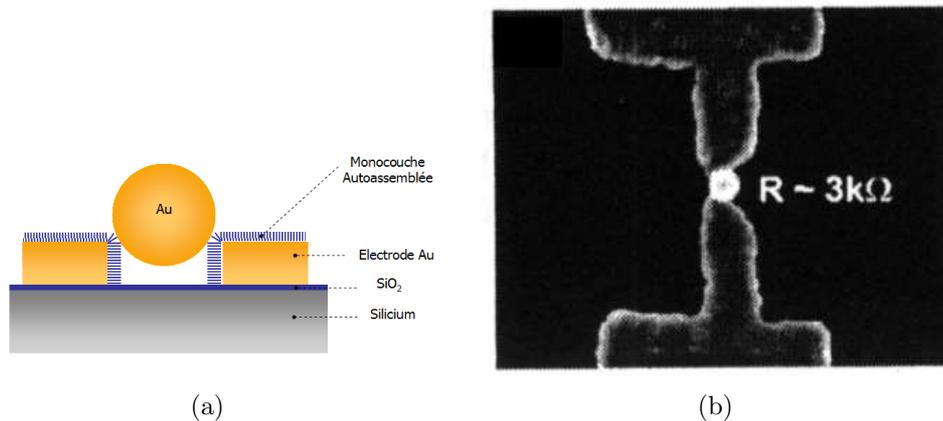


FIG. 1.14 – (a) Principe de l'étude du transport électrique au travers de molécules déposées sur la surface de deux électrodes. Une nanoparticule permet de relier les deux électrodes et de créer deux jonctions métal-molécule-métal. (b) Image MEB d'une nanoparticule de 80nm de diamètre immobilisée dans l'espace séparant deux électrodes métalliques fabriquées sur une surface de silicium oxydée [36].

Cette approche reste contraignante car l'adressage se fait sur un grand nombre de molécules et il est seulement possible d'obtenir un ordre de grandeur moyen de la conductance. De plus, la géométrie électrode-jonction-particule-électrode complique les caractéristiques du transport électrique.

1.4.2.5 Réduction de la distance inter-électrodes

Des techniques permettent de réduire la distance inter-électrodes des dispositifs fabriqués par exemple par lithographie électronique. Ces méthodes utilisent par exemple des techniques de dépôt par pulvérisation [40] ou par dépôt électrolytique [41]. La première de ces techniques permet de réduire la distance entre deux électrodes à 4nm [40] mais nécessite la fabrication d'électrodes suspendues. La deuxième méthode peut être utilisée sur des électrodes en contact avec le substrat. Le suivi du dépôt effectué par voie électrochimique permet de contrôler l'apport de matière. Des gaps de 3.5nm ont pu être obtenus par cette voie qui reste pour l'instant peu utilisée.

1.4.2.6 Ouverture d'un nanofil

Une alternative à la réalisation de nanojonctions par lithographie électronique est basée sur la réalisation de nanojonction par rupture d'un nanofil conducteur. Cette

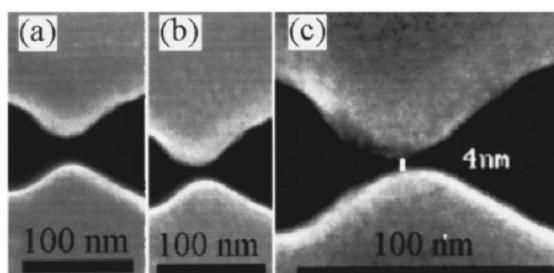


FIG. 1.15 – Images MEB de l'espace situé entre deux électrodes de platine fabriquées sur un substrat de nitrure de Silicium. Un dépôt supplémentaire de métal par sputtering permet de réduire la distance entre deux électrodes suspendues, de 25nm à environ 4nm.

approche est intéressante pour la réalisation de nanogaps car leur réalisation ne dépend plus de la résolution de procédé de lithographie. Le nanofil est toujours fabriqué par lithographie électronique mais ses dimensions restent supérieures à la résolution ultime de la technique. Ces techniques sont donc plus accessibles car elle permettent de relâcher les contraintes liées à la résolution du procédé qui nécessitent une mise au point précise des paramètres de fabrication.

Ouverture d'un nanofil par flexion

Le principe de cette technique a été proposé en 1995 par C. Zhou et al [42]. Il consiste à rompre, par flexion, un nanofil métallique suspendu à la surface d'un substrat déformable. Les dimensions latérales du fil sont de l'ordre de 100nm. La déformation du substrat est généralement induite par un actionnement piezoélectrique.

Cette technique permet de générer de très petits gaps dont la dimension est ajustable par le jeu de la déformation du substrat. Bien que le contrôle du nombre de molécules connectées reste difficile, il est ainsi possible d'adresser des molécules de très petite taille [43, 44]. Cette technique permet d'éviter certaines limitations par rapport à l'emploi d'une sonde tunnel, en particulier en ce qui concerne la stabilité mécanique de la jonction et la symétrie [45]. Toutefois, l'utilisation de cette technique reste délicate car la réalisation de ses jonction nécessite un contrôle individuel de la rupture de chaque fil et limite considérablement les possibilités d'intégration et de mise en parallèle sur un substrat. Par ailleurs, il est nécessaire de fabriquer des nanofils suspendus ce qui complique le protocole de fabrication mais surtout rend cette approche incompatible avec la stratégie de dépôt de la sonde entre les électrodes.

Ouverture d'un nanofil par électro-migration

Ce procédé a été mis au point par l'équipe de Mc Euen [46]. En faisant circuler un fort courant dans un nanofil métallique, les atomes métalliques qui le constituent sont mis en mouvement par électro-migration. En contrôlant l'évolution du courant dans le fil, il est ainsi possible de rompre le fil métallique et de générer deux électrodes indépendantes qui présentent des espaces compris entre 1 et 3nm [30]. La figure 1.17 présente un exemple de dispositifs réalisés par cette voie.

Des travaux récents ont permis de démontrer la fabrication de ces structures en uti-

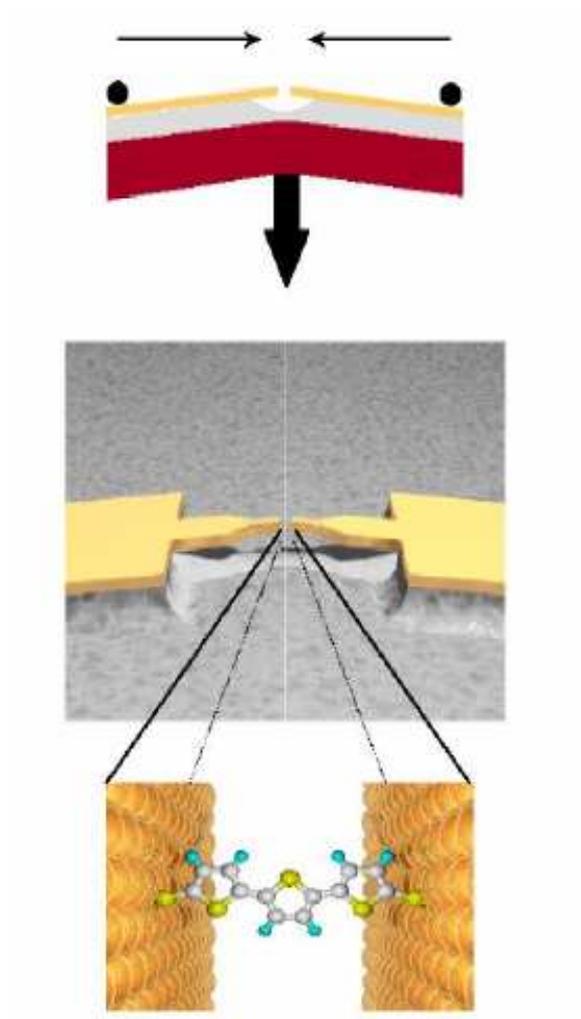


FIG. 1.16 – Illustration de la fabrication de nanjonctions par flexion sur un substrat déformable. Un fil suspendu est rompu par déformation du substrat. La distance inter-électrodes est ajustée en contrôlant cette déformation.

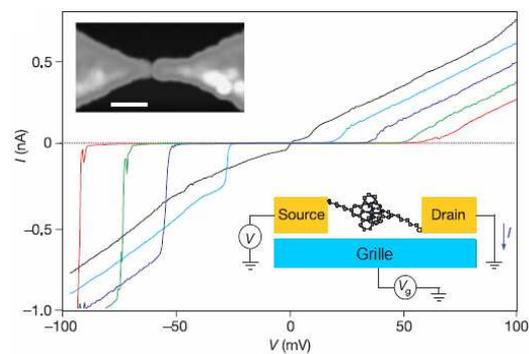


FIG. 1.17 – Illustration de l'utilisation de nanoélectrodes espacées de 1 à 2nm obtenues par électromigration et utilisées pour l'étude du transport électrique dans des complexes de Cobalt [47].

lisant la technique de NanoImpression pour la fabrication du fil conducteur [48]. Des travaux ont également démontré la combinaison de cette technique avec un dépôt de nanoparticules des gaps inférieurs à 10nm [49]. Cette approche présente de nombreux avantages pour l'électronique moléculaire entre autres liés à la réalisation de jonctions stables mécaniquement et fabriquées sur un substrat pouvant être utilisé comme électrode de grille. Toutefois, la fabrication des nanogaps nécessite de rompre un par un les nanofils en suivant l'évolution de la caractéristique électrique du nanofil générée par le processus d'électromigration. Aussi la fabrication en grand nombre de ces dispositifs reste très contraignante et peu adaptée au développement de biopuces.

1.4.2.7 Synthèse

Comme nous venons de le voir, de nombreuses stratégies sont envisageables pour l'adressage électrique de molécules. Les nombreux travaux menés dans le cadre de l'électronique moléculaire ont permis de proposer des solutions d'adressage à l'échelle nanométrique. Toutefois, la réalisation de ces dispositifs engendre de nombreuses contraintes dans la perspective de nos applications. La réalisation de ces dispositifs se fait généralement à l'unité et nécessite des temps de fabrication relativement longs. Parmi toutes les solutions proposées, la réalisation de nanoélectrodes métalliques par lithographie électronique reste la plus intéressante. Elle permet d'utiliser un schéma de détection classique basé sur l'immobilisation de biomolécules sur un substrat. Elle permet également de pouvoir réaliser, avec une très haute résolution, des architectures d'électrodes variées et pas uniquement limitées à des jonctions nanométriques.

1.4.3 Le problème de la conductivité des biomolécules

Le deuxième paramètre important de l'approche très simple que nous avons décrite dans le premier paragraphe concerne bien évidemment le caractère conducteur des biomolécules et son utilisation pour la détection électrique.

1.4.3.1 Le cas de l'ADN

Le principe de la méthode de détection par mesure directe de la conductance est, comme nous l'avons répété, basé sur les propriétés de conduction électrique des biomolécules que nous souhaitons détecter. Cette idée trouve un écho tout particulier avec les nombreuses expériences qui ont été menées à ce jour sur la compréhension des phénomènes de conduction à l'échelle d'une molécule. Ces expériences ont été motivées en grande partie par les perspectives d'applications dans le domaine de l'électronique moléculaire. Dans ce que nous pourrions qualifier de famille des biomolécules, le candidat le plus probable en tant que conducteur est la molécule d'ADN. Dès 1962, Eley et Spivey ont suggéré que la molécule d'ADN était susceptible de conduire le courant électrique [50], le mécanisme de conduction étant lié à la superposition des orbitales moléculaires entre les bases constituant la molécule. Depuis quelques années, de nombreuses expériences ont été menées dans le but de démontrer le comportement conducteur de l'ADN. La plupart des approches utilisent des systèmes basés sur des nanoélectrodes permettant de connecter ces molécules et d'étudier la réponse électrique d'un petit nombre d'entre elles. Malgré les nombreuses expériences menées à ce sujet, les résultats obtenus

sont très controversés. Les comportements observés vont de la supraconductivité [51], aux comportements de type conducteur ou semi-conducteur [52, 53, 54, 55] jusqu'à des comportements isolants [56, 57, 58, 59]. Il semble que dans l'ensemble de ces recherches, les paramètres expérimentaux soient d'une importance capitale dans les mesures. Les caractéristiques électriques observées semblent dépendre de la longueur des molécules, de leur séquence mais également de l'environnement dans lequel est effectuée la mesure (humidité, température, ...), des dispositifs de connexion, de la nature des contacts entre les dispositifs de connexion et la molécule, etc.

Très récemment, les résultats d'un projet européen intitulé "DNA electronic" (IST-1999-13099) ont permis d'apporter une vision plus claire des propriétés électriques de l'ADN en particulier dans le cas de molécules déposées sur un substrat à l'état sec [57, 60]. Dans les expériences présentées, les différentes mesures ont été réalisées en utilisant des nanoélectrodes métalliques planaires fabriquées par lithographie électronique sur un substrat en silicium. La figure 1.18 nous donne un aperçu de quelques uns des dispositifs utilisés dans une approche semblable à celle que nous souhaitons mettre en place.

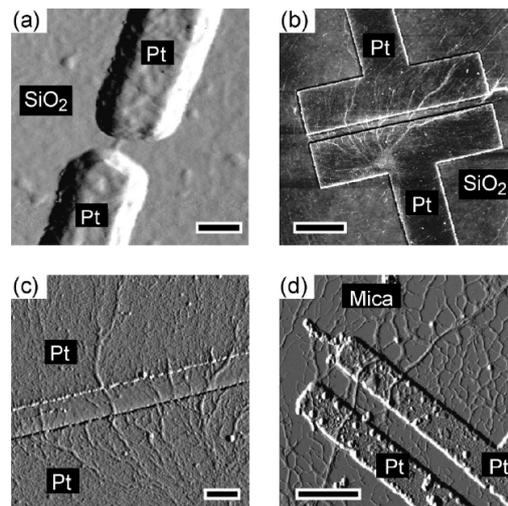


FIG. 1.18 – Images AFM de différents dispositifs permettant l'adressage électrique d'une molécule d'ADN placée entre deux électrodes de platine sur un substrat de silice séparées de 40nm (a). Même expérience pour des faisceaux de molécules d'ADN placés entre deux électrodes de platine séparées d'environ 200nm sur un substrat de silice (b) et (c) et de mica (d).

Les conclusions de ces recherches semblent clairement indiquer que pour des longueurs supérieures à 40nm, les molécules d'ADN présentent une résistance supérieure à 10 TOhms. Plus généralement, ces molécules témoignent d'un caractère fortement isolant lorsqu'elles sont déposées sur un substrat dans un environnement sec et ce quelle que soit leur séquence.

Les résultats indiquent également que le taux d'humidité du milieu dans lequel les mesures sont réalisées a une influence majeure sur les propriétés électriques des oligonucléotides [54, 61, 62]. Le comportement isolant de l'ADN à l'état sec semble disparaître sous l'influence d'une augmentation d'humidité. Deux phénomènes sont alors envisageables pour l'interprétation de ces résultats [31]. La conduction peut être de type

ionique et donc très sensible à l'humidité. La deuxième hypothèse met en jeu l'influence de l'humidité sur la conformation des molécules d'ADN qui pourrait évoluer d'une forme conductrice à isolante.

La séquence des brins étudiés modifie également la réponse électrique. Dans la plupart des expériences, les molécules d'ADN composées de l'hybridation d'un brin poly-G (brin constitué uniquement de bases de type G) avec un brin poly-C présentent des conductivités sensiblement plus importantes que les systèmes constitués de brins poly-A/poly-T ou de brin de séquence quelconque (λ -DNA). Ces résultats ont été confirmés par les travaux de T.Heim [31] qui ont montré la dépendance des caractéristiques en fonction de l'environnement et le caractère isolant de l'ADN à l'état sec.

Aussi, bien que l'interprétation des phénomènes de conduction électrique au travers de l'ADN reste encore controversée, l'exploitation des propriétés intrinsèques de conduction des molécules d'ADN reste très limitée et très sensible aux conditions expérimentales. La mesure des variations de la conductivité de molécules telles que l'ADN paraît très difficilement utilisable pour une application de biodétection : les courants restent très faibles, difficilement mesurables et l'obtention d'une réponse stable et reproductible devrait nécessiter un contrôle très précis des conditions opératoires.

1.4.3.2 De la détection des biomolécules

L'exemple de la molécule d'ADN illustre assez bien les problèmes liés à l'utilisation directe de la conductivité des "biomolécules" pour des applications de détection.

Qu'il s'agisse de molécules d'ADN ou de protéines, le caractère conducteur de ces biomolécules reste pour l'instant controversé. Bien que des mécanismes de transfert de charge au sein des molécules soient identifiés (Transfert d'électrons par sauts, super-échange) [31], les expériences montrent de nombreux résultats contradictoires et il reste difficile d'utiliser ces résultats pour les appliquer à un système de détection. Les phénomènes de conduction observés restent en général de courte portée, de faible intensité et dépendent de façon dramatique des conditions de mesure et des dispositifs utilisés pour leur connexion. En particulier dans le cas de l'ADN, les études semblent clairement démontrer les effets majeurs de l'humidité et de la nature des contacts électriques. Par ailleurs, même dans le cas le plus favorable correspondant à des doubles brins poly(G)-poly(C) qui permet un recouvrement des orbitales moléculaires, le transfert d'électrons dans la molécule reste limité et la résistance des oligonucléotides demeure très élevée [31, 60] et donc peu compatible avec notre objectif.

Au cours des premiers travaux menés dans le cadre de cette thèse, nous avons pu procéder à des mesures de la conductivité, en milieu sec, de molécules d'ADN déposées sur un substrat. Pour réaliser ces mesures, nous avons mis en oeuvre les dispositifs qui seront décrits au chapitre 2. Nous avons utilisé des molécules d'ADN de 100nm de long (double et simple brins poly(G)-poly(C) et poly(A)-poly(T)) avec des gaps de dimensions variables de 20 à 100nm. Aucune des conditions étudiées ne nous a permis d'obtenir un courant mesurable traversant le dispositif. De la même façon nous avons reproduit ces expériences sur des dépôts de protéines (anticorps) et comme nous le verrons au chapitre 3, nous sommes arrivés aux mêmes résultats. Ces derniers en cohérence avec les résultats parus dans la littérature à cette même période nous ont confortés dans l'idée que la conductivité des biomolécules déposées sur un substrat et séchées est

extrêmement faible et quasiment non mesurable.

La conclusion essentielle de ce paragraphe est donc qu'il semble particulièrement difficile d'utiliser les propriétés de conduction des biomolécules pour réaliser une procédé de biodétection électrique. Notre objectif nécessite premièrement de pouvoir mesurer une variation de conductivité et deuxièmement de parvenir à une réponse reproductible. Or comme nous l'avons vu les résistances des biomolécules semblent très élevées et les mesures trop sensibles aux paramètres expérimentaux pour répondre à ces deux critères.

Pour autant, l'approche que nous avons décrite dans la première partie reste particulièrement attractive du fait de la grande sensibilité qu'elle permettrait d'atteindre et des possibilités d'intégration envisageables. Quelles sont alors les solutions que nous pouvons apporter pour pallier au problème de la non conductivité des biomolécules ? Deux approches sont envisageables. Tout d'abord, nous pouvons travailler au développement de structures de connexion plus sensibles en proposant des architectures plus perfectionnées que la solution des nanoélectrodes. Nous pouvons également modifier la nature de l'objet détecté électriquement. Le but, dans ce cas, est d'augmenter la conductivité du complexe généré après l'association des molécules cibles et sondes. Pour cela, la solution du marquage des molécules paraît particulièrement bien adaptée puisqu'elle permet de conserver les affinités entre les molécules tout en associant les propriétés du marqueur utilisé.

1.4.4 Les solutions existantes

Parmi les nombreux systèmes de biodétection développés récemment, plusieurs utilisent une mesure de conductivité. Toutefois, ces systèmes n'utilisent pas les propriétés électriques des biomolécules étudiées. Certains systèmes utilisent directement la modification des propriétés électriques d'un matériau induite par le greffage d'une molécule cible. D'autres sont basés sur l'utilisation des molécules cibles comme point d'ancrage d'objets conducteurs. Dans les deux cas, le courant électrique mesuré ne circule pas dans la molécule cible. Aussi, le signal obtenu n'est modifié que par la présence ou l'absence de la molécule sur la surface.

1.4.4.1 Les nanotubes de carbone et nanofils conducteurs

La fonctionnalisation de fils ou de nanotubes de sections nanométriques constitue une voie intéressante pour des applications à la biodétection.

Parmi les premières applications utilisant des nanofils conducteurs, citons les travaux de Y.Cui et al. [63]. Le principe de la détection est basé sur l'utilisation d'un nanofil semiconducteur en silicium (dopé p) de 15nm de diamètre et de $2\mu\text{m}$ de longueur, pour la réalisation d'un transistor à effet de champ. L'ensemble du dispositif est placé directement en solution, par exemple par l'utilisation de dispositif de microfluidique en PDMS [64]. La surface de fil peut être fonctionnalisée de façon à immobiliser une molécule d'intérêt. Les modifications de charges engendrées par une réaction chimique impliquant les molécules greffées ou l'immobilisation d'une molécule sonde permettent de modifier la conductance du dispositif. Une telle approche a pu être utilisée avec succès pour la mesure de variation de pH ainsi que pour la détection d'interactions de type biotine-streptavidine [63]. Dans ce dernier cas (Cf. Figure 1.19), une molécule de biotine

est greffée sur la surface. Ces molécules peuvent alors servir de site de greffage pour des molécules de streptavidine. Lors de ce greffage, les variations de charges de surface due à la molécule de streptavidine (chargées négativement dans les conditions de pH de l'expérience) permettent de moduler la conductance du dispositif.

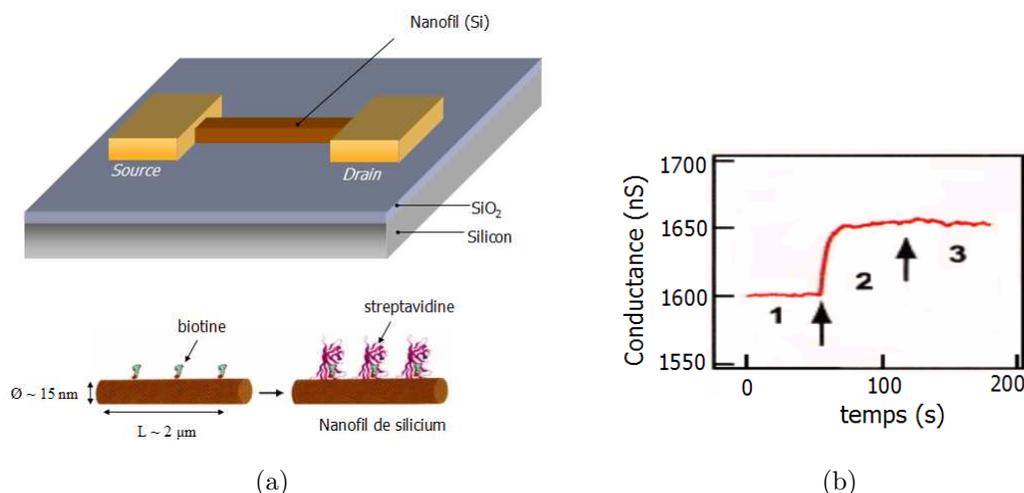


FIG. 1.19 – (a) Schéma illustrant la détection d'une interaction biotine-streptavidine par l'intermédiaire d'un transistor à effet de champ basé sur un nanofil semiconducteur de silicium. La surface du nanofil est fonctionnalisée par des molécules de biotine qui permettent l'immobilisation de molécules de streptavidine en solution sur la surface du nanofil. La variation de charge causée par la streptavidine (chargée négativement dans les conditions de l'expérience) permet de moduler la conductance du nanofil. (b) Exemple de réponse électrique obtenue en temps réel lors de l'incubation d'une solution de streptavidine sur ce dispositif : les régions 1 et 3 de la courbe correspondent à l'introduction d'une solution tampon et la région 2 à l'incubation de la solution de streptavidine.

Dans ces expériences, le greffage des molécules de streptavidine se traduit par une variation de la conductance du dispositif qui augmente d'environ 50 nS et qui reste stable dans le temps.

Des travaux similaires ont été réalisés en utilisant des nanotubes de carbone, en particulier des nanotubes mono-feuillet (SWCNT : Single Wall Carbon Nanotube) utilisés en tant que nanofils semiconducteurs. De nombreux travaux ont été menés autour de ces dispositifs et ont pu démontrer la possibilité de détection de composés gazeux (NO_2 et NH_3) [65], de protéines [66, 67] et d'enzymes [68] avec des niveaux de sensibilité permettant la détection d'une seule enzyme.

Les techniques de détection basées sur l'utilisation de nanofils semiconducteurs révèlent bien les possibilités offertes par les nanotechnologies en particulier en ce qui concerne l'amélioration de la sensibilité des méthodes de détection. Il s'agit également d'une technique de détection en temps réel, ne nécessitant aucun marquage des molécules cibles et utilisant une simple mesure de conductivité. Cette méthode est facilement intégrable et permet des mesures directes en solution par l'intermédiaire de dispositifs simples de microfluidiques. Tout comme nous le verrons dans les applications qui seront présentées par la suite, la mise au point de procédures de fonctionnalisation qui concernent ici les parois des nanofils, reste de première importance.

1.4.4.2 Membranes biomimétiques, Nanopores

Une autre voie prometteuse pour la détection de biomolécules par mesure de conductance repose sur l'utilisation de structures nanométriques telles que des membranes biomimétiques. Les récents travaux de O. Saleh et al. [69] ont permis de démontrer la possibilité de détection de molécule d'ADN en solution à l'aide de canaux nanométriques ou nanopores réalisés par moulage de structures en PDMS reportées sur lames de verre. Comme l'illustre le schéma de la figure 1.20, le principe de la détection repose sur la mesure du courant ionique traversant un canal nanométrique de 200nm de diamètre et de $3\mu m$ de long.

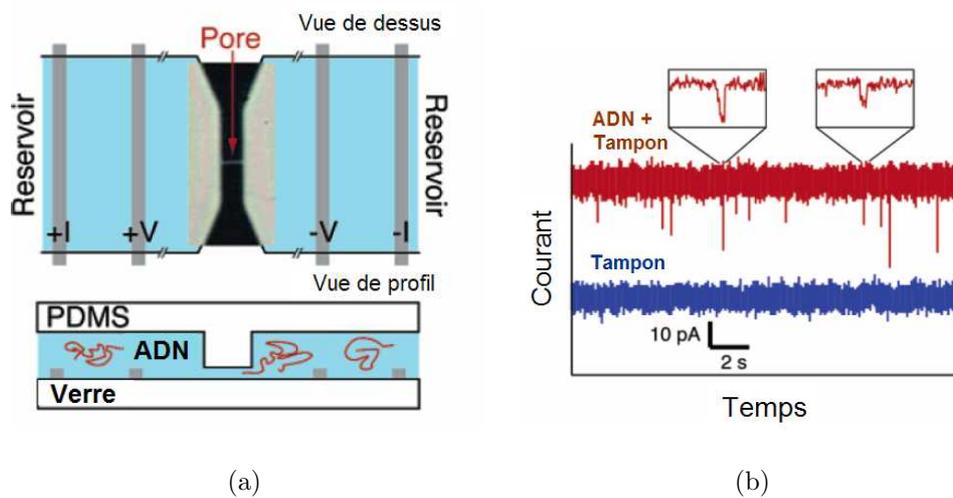


FIG. 1.20 – Schéma de principe de la détection de molécules d'ADN par mesure électrique de la conduction ionique au travers d'un nanopore (d'après [69]).

Les molécules d'ADN en solution sont dirigées vers le nanopore et lors de leur passage bloquent partiellement le flux de solutions et donc des ions présents en solution. Ce phénomène se traduit par une augmentation de la résistance électrique du nanopore qui est mesurée à l'aide d'électrodes situées de part et d'autre du nanopore. Les avantages de cette méthode de détection reposent ici aussi sur la grande sensibilité de détection, jusqu'à une molécule unique, offerte par la réduction de la taille du canal. La détection se fait directement en solution, en temps réel, sans marquage de la molécule cible. De prochaines améliorations, en particulier la réduction de la taille du nanopore, devraient permettre la détection de molécules de très petites dimensions. Enfin, la fonctionnalisation des parois du dispositif laisse envisager la possible utilisation de ces systèmes pour la détection d'interactions de biomolécules. La mesure de la résistance du nanopore devrait permettre de détecter toute variation de flux au sein du dispositif liée à une diminution de la taille du canal lors de l'immobilisation des molécules cibles ou à un ralentissement de ces mêmes molécules du à leur interaction avec les molécules greffées sur les parois du nanopore.

1.4.4.3 Métallisation

Les développements récents effectués dans le domaine de l'électronique moléculaire ont permis d'identifier certaines biomolécules, en particulier l'ADN comme brique éventuelle de construction de nanocircuits. Pour illustrer cette approche, nous avons choisi l'exemple des travaux menés par E. Braun et al. [70].

Dans cette approche (Cf. Figure 1.21) deux électrodes métalliques fabriquées sur un substrat de verre et séparées de 12 à 16 μm sont fonctionnalisées de façon indépendante avec deux oligonucléotides de 12 bases fonctionnalisés par des groupements thiols pour leur attachement. Dans un deuxième temps, un oligonucléotide présentant à chaque extrémités des séquences de 12 bases complémentaires des séquences présentes sur les oligonucléotides greffés est incubé sur la surface. L'oligonucléotide s'hybride à chaque extrémité et pontre les électrodes. Enfin, une solution ionique d'argent permet la formation d'un complexe d'ion argent avec l'ADN qui peut être réduit par une solution d'hydroquinone pour générer des agrégats métalliques. Un fil métallique conducteur se forme donc autour de la molécule d'ADN et pontre électriquement les microélectrodes.

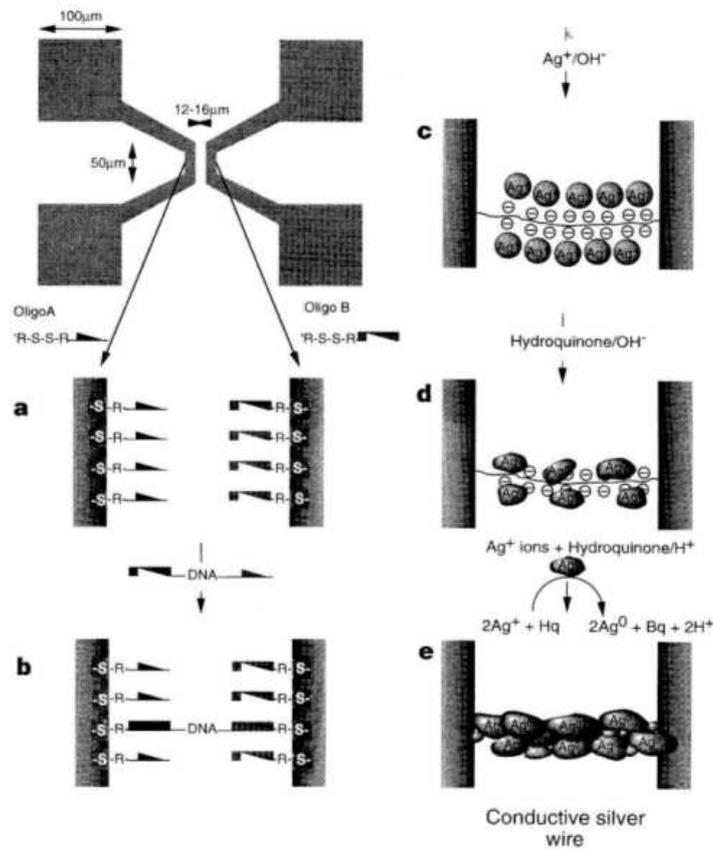
Les expériences on pu démontrer d'une part la possibilité de métalliser l'ensemble de l'oligonucléotide déposé mais aussi que cette métallisation conduisait à des augmentations de la conductivité de plus de 6 ordres de grandeurs comparées au pontage des électrodes par la molécule d'ADN seule pour laquelle aucune conductivité n'a pu être détectée.

1.4.4.4 Marquage par des nanoparticules métalliques

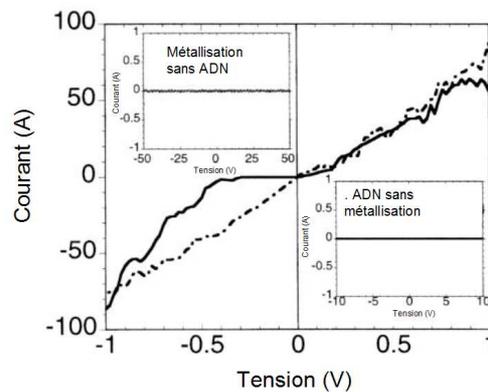
Les nanoparticules inorganiques constituent des blocs de construction et de fonctionnalisation particulièrement intéressants dans le domaine des nanotechnologies. Ces nano-objets peuvent être synthétisés en grande quantité, à partir d'une large variété de matériaux à l'aide de protocoles simples. L'intérêt principal des nanoparticules provient de leurs dimensions qu'il est possible de contrôler dans une gamme de dimensions de 1 nm à plusieurs centaines de nanomètres [71]. Sur une échelle de dimension, ces objets se situent donc à l'interface entre les édifices moléculaires ou supramoléculaires créés par voie chimique et les structures créés dans une approche "top-down" de structuration de la matière. Elles peuvent donc servir de trait d'union entre les "nano" et les biotechnologies et sont, à ce titre, particulièrement utilisées dans le domaine de la biodétection.

Les méthodes de préparation des particules inorganiques sont très nombreuses et ont été largement documentées [71, 72]. Dans le cas particulier des nanoparticules métalliques la méthode principalement employée est basée sur la réduction de sels métalliques. Dans le cas de l'Or, les nanoparticules sont fabriquées à partir de sels métalliques de type $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ par du citrate de sodium. Cette réaction permet de fabriquer des nanoparticules sphériques monodisperses dont les dimensions dépendent essentiellement des concentrations des réactifs employés [73, 74]. Les gammes de dimensions vont de 1 nm à plusieurs centaines de nanomètres.

Il est par ailleurs possible de fonctionnaliser la surface des nanoparticules par des groupements silanes [75], citrates, dendrimères [76, 77], polymères [78], etc. Ces groupements permettent d'une part de stabiliser les solutions colloïdes générées et d'autre part d'apporter une fonctionnalité chimique permettant leur greffage. Ainsi, il est possible de greffer les nanoparticules sur les surfaces ou les objets étudiés en utilisant directement



(a)



(b)

FIG. 1.21 – (a) Schéma de principe de la métallisation d'une molécule d'ADN simple brin hybridée à ses deux extrémités à deux oligonucléotides eux mêmes greffés à chacune des électrodes métalliques. Un procédé de métallisation basé sur la réduction de sels d'argent permet la métallisation du brin d'ADN. (b) Exemples de caractéristiques $I(V)$ obtenue après et avant métallisation en absence et en présence d'une molécule d'ADN immobilisée entre les deux électrodes (d'après [70]).

leur réactivité ou leur affinité vis-à-vis des objets cibles. Dans le cas des biomolécules, les méthodes employées pour ce greffage sont bien décrites dans [79] et [80]. Ce greffage repose généralement sur la reconnaissance biotine-streptavidine, sur la fonctionnalisation d'acides aminés par des groupements thiols et leurs réactions avec des particules d'Or ou avec des particules fonctionnalisées par des groupements amines, ou encore par exemple par interactions électrostatiques entre certains acides aminés et des groupements anioniques permettant la stabilisation des particules.

Les nanoparticules disposent de propriétés optiques, électriques, magnétiques très variées et bien souvent très différentes du matériau à l'état massif. De part leurs faibles dimensions, ces objets sont donc particulièrement intéressants pour des applications de biodétection car ils permettent de modifier ou d'apporter des propriétés nouvelles aux biomolécules que nous souhaitons détecter tout en conservant leur activité biologique.

De nombreuses applications [80, 71] utilisent les nanoparticules pour des systèmes de détection optique (absorption, diffusion, Résonance Plasmon de surface) [81, 82, 83, 84, 85, 86, 87] ou magnétique [11, 12, 13]. Dans le cas de la détection électrique par mesure de conductivité, une méthode simple pour compenser les propriétés isolantes des biomolécules est d'utiliser un marquage avec des nanoparticules métalliques conductrices. Un premier exemple d'application est présenté dans la figure 1.22 au travers des résultats obtenus par O.D. Velev et al. [88].

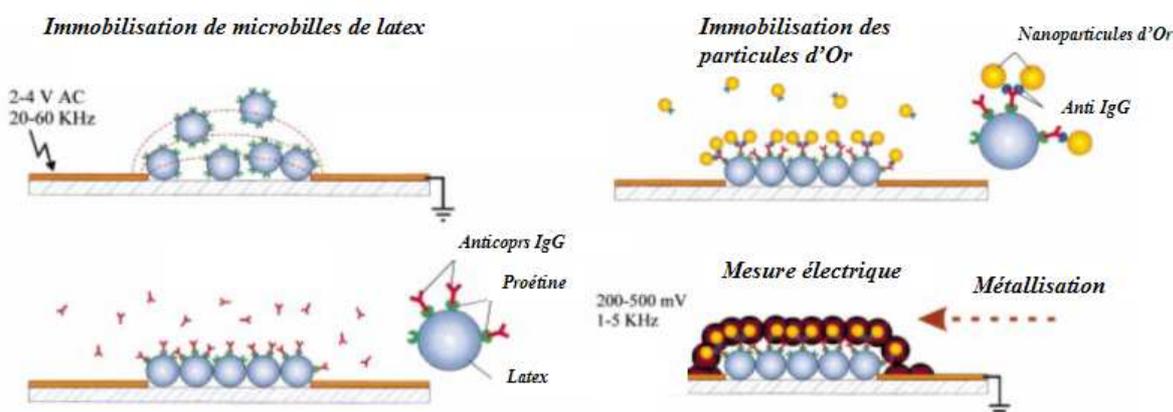


FIG. 1.22 – Schéma de principe du protocole de détection immunologique présenté par O.D. Velev et al. Des microbilles de latex et fonctionnalisées par des protéines A sont tout d'abord immobilisées entre deux électrodes séparées de 7 à 15 μm puis fonctionnalisées par un premier anticorps (IgG) spécifique des protéines A. Une deuxième solution d'anticorps (Anti-IgG) fonctionnalisés par des nanoparticules d'Or de 5nm de diamètre est incubée sur la surface. Dans le cas d'une reconnaissance entre les deux anticorps (IgG/Anti-IgG), des nanoparticules d'Or sont immobilisées sur le dispositif. Un dernier traitement de la surface par une solution de métallisation (à partir de sels d'argent) permet de métalliser le dépôt de particules. Si aucune reconnaissance n'a lieu entre les anticorps l'absence de nanoparticules métalliques empêche la métallisation et donc la modification de la conductivité des électrodes.

Dans cet exemple des microbilles de latex d'environ 1 μm de diamètre sont collectées par diélectrophorèse (Tension de 2 à 4V sous une fréquence de 20 à 60kHz) dans

l'espace inter-électrodes de deux électrodes coplanaires séparées de 7 à $15\mu\text{m}$. Les billes de latex utilisées sont initialement couvertes d'une protéine A qui est capable de se lier spécifiquement à un anticorps de type IgG. Un deuxième anticorps anti-IgG présent à la surface de nanoparticules d'Or de 5nm de diamètre est alors incubé sur la surface. Cet anticorps reconnaît spécifiquement l'anticorps IgG initialement greffé sur les micro-billes et se fixe donc dans l'espace inter-électrodes. Un procédé de métallisation à base d'argent, généralement utilisé pour la métallisation d'échantillons pour la microscopie électronique, est utilisé pour métalliser le dépôt effectué dans l'espace inter-électrodes à partir des nanoparticules d'Or qui y sont présentes. L'interaction entre les deux anticorps se traduit donc par un court-circuit des électrodes.

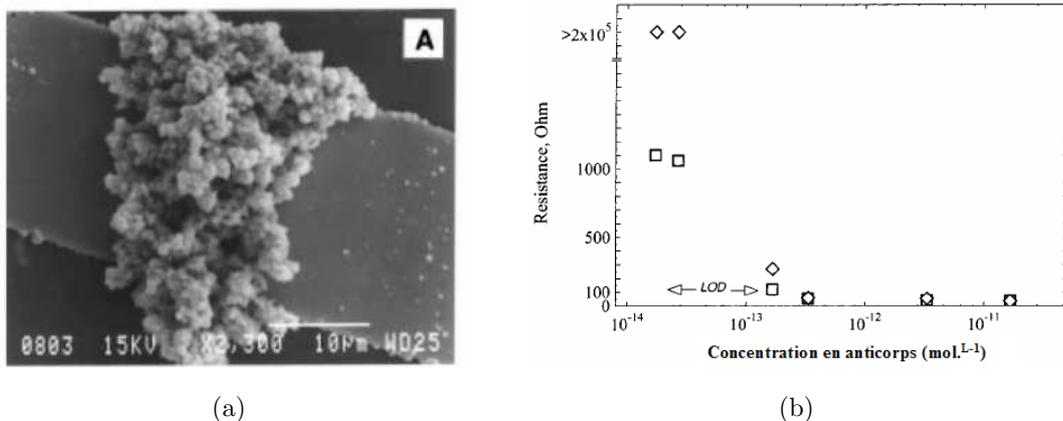


FIG. 1.23 – (a) Observation MEB de l'espace inter-électrodes des dispositifs après immobilisation des billes de latex, incubation des deux solutions d'anticorps et métallisation. (b) Graphe témoignant de la baisse de résistance du dispositif sous l'influence des particules métalliques (d'après [88]).

La détection de l'interaction entre les deux anticorps résulte donc d'un phénomène collectif de fixation de nanoparticules permettant la métallisation de l'espace inter-électrodes. Ces premiers résultats ont permis de démontrer qu'il est possible de détecter des concentrations en anticorps de l'ordre de 10^{-18} 10^{-19} mol.L^{-1} .

L'avantage majeur de cette technique réside dans la possibilité d'utiliser des réseaux d'électrodes qui permettent d'immobiliser de façon localisée un anticorps différent dans chaque espace inter-électrodes. Toutefois cette approche, qui nécessite une étape de marquage, présente également de nombreuses limitations. La première provient du nombre important d'étapes de greffages et de traitements avant d'arriver à la détection électrique ce qui complique considérablement le protocole. D'autre part, l'obtention d'une réponse quantitative paraît difficilement réalisable suivant cette approche : en effet, le nombre, la position, la taille de l'espace inter-électrodes et finalement l'étape de métallisation des particules sont autant de paramètres qui limitent la réalisation de mesures quantitatives.

La reconnaissance de séquences d'oligonucléotides a également été accomplie en utilisant une méthode de détection très similaire à la précédente [89]. Le schéma de la méthode mise par S.-J. Park et al. est reportée dans la figure 1.24.

Dans cette expérience deux électrodes séparées de 12 et $16\mu\text{m}$ sont fabriquées sur

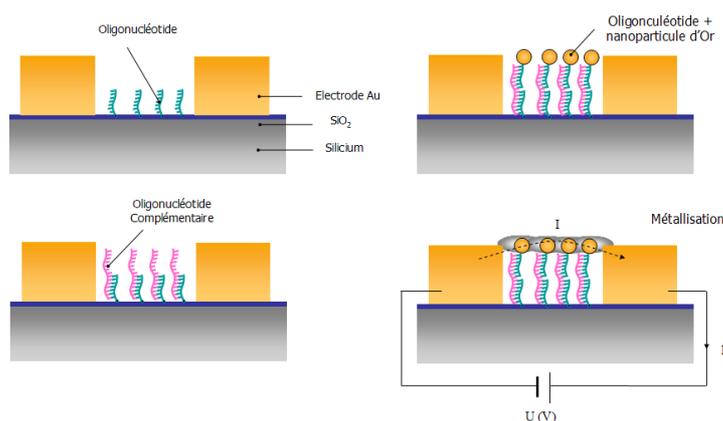


FIG. 1.24 – Principe de la détection électrique de séquence d'ADN présenté par S.-J. Park et al. [90]. Des oligonucléotides sondes sont immobilisés dans l'espace séparant deux électrodes distantes de $20\mu\text{m}$. Une solution d'oligonucléotides cibles est alors incubée sur la surface. Cette molécule peut se lier par une de ses extrémités à la sonde présente sur la surface. Enfin, une solution de nanoparticules d'Or fonctionnalisées de 13nm de diamètre par un dernier oligonucléotide présentant une séquence complémentaire de l'extrémité libre de l'oligonucléotide cible est introduit. Si la cible a été immobilisée sur la surface, une métallisation de l'espace inter-électrodes par une réaction de type miroir d'Argent est rendue possible par la présence des particules d'Or. L'interaction de l'oligonucléotide cible se traduit donc finalement par une modification de la conductivité du dispositif.

un substrat isolant de type SiO_2 par un dépôt d'une couche d'Or sur une couche de titane. Après traitement de la surface, un premier oligonucléotide sonde est immobilisé sur la surface entre les deux électrodes. Dans un deuxième temps, un deuxième oligonucléotide cible fonctionnalisé par des nanoparticules d'Or de 13nm est incubé sur la surface. Dans cette approche classique de reconnaissance cible-sonde, l'interaction entre les oligonucléotides de séquences complémentaires permet de fixer des nanoparticules entre les deux électrodes. Un procédé de métallisation basé sur la réduction de sels d'argent par de l'hydroquinone permet alors de métalliser le dépôt. Dans le cas d'une hybridation entre les deux molécules, la résistance des électrodes décroît pour atteindre 500Ω . Dans le cas contraire, la résistance du dispositif n'est pas modifiée et reste proche de $200\text{M}\Omega$. Les modifications de conductivité induites sont de plus de trois ordres de grandeur. Par ailleurs, la sélectivité du protocole permet de différencier deux oligonucléotides présentant une seule base différente à partir d'oligonucléotides cibles de 27mers. Toutefois, le nombre de molécules ayant interagi qui permet une métallisation reste considérable compte tenu de la dimension des électrodes et du gap.

Le dernier exemple que nous avons choisi de présenter est basé sur une approche similaire mais qui cette fois est basée sur l'utilisation directe de la conductivité des nanoparticules à l'aide de dispositifs à nanoélectrodes [91].

Cette méthode de détection illustre bien les perspectives offertes par les nanotechnologies pour la biodétection. Cette approche repose sur la fabrication, sur un substrat isolant, de dispositifs de type nanoélectrodes présentant des espaces inter-électrodes typiquement inférieurs à 100nm . Le principe de la mesure (Cf. Figure 1.25) consiste à

greffer de façon covalente une première protéine A entre les électrodes. Dans un deuxième temps, une solution d'anticorps B fonctionnalisés par des nanoparticules d'Or de 10nm de diamètre est incubée sur la surface. Dans le cas d'une interaction entre les deux protéines, la fixation de particules d'Or entre les deux électrodes permet d'augmenter la conductivité du dispositif.

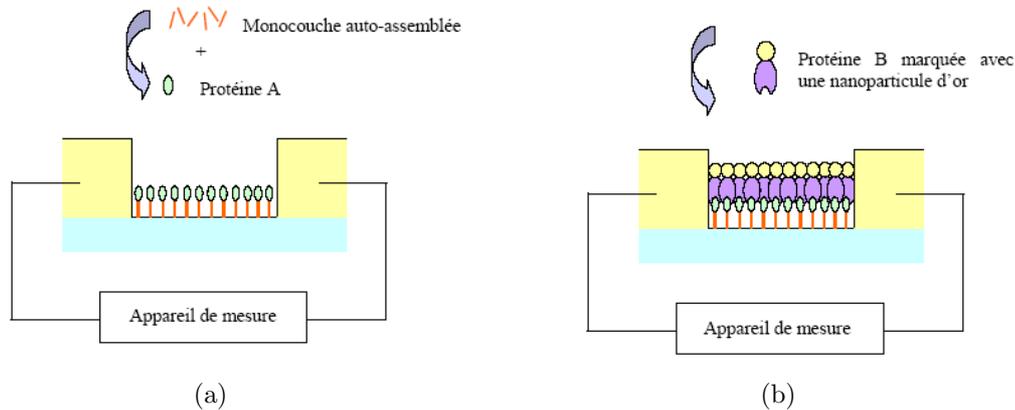


FIG. 1.25 – Principe de la détection d'interactions entre protéines présenté par V.Haguet [91]. (a) Fonctionnalisation de l'espace inter-électrodes par une monocouche permettant le greffage covalent d'une protéine A. (b) Incubation d'une protéine B marquée par des nanoparticules d'Or qui, dans le cas d'une interaction avec la protéine A, modifie la conductivité du dispositif.

Cette approche est intéressante car elle illustre bien les améliorations apportées par la miniaturisation des dispositifs. La diminution de l'espace inter-électrodes permet d'augmenter la sensibilité de la détection et de s'affranchir de toute étape de métallisation telle que celles présentées dans les deux premiers exemples.

Le principe de détection mis en oeuvre permet d'obtenir des variations de conductivité comprises entre 1 et 3 décades sous des tensions de polarisation de 0,1V. Le principe de la détection semble validé. Toutefois, comme nous pouvons l'observer sur la figure 1.26, les niveaux de courant avant l'incubation des nanoparticules d'Or sont relativement élevés (200pA). La contribution des différents traitements de surface influence donc la conductivité globale du dispositif. Des développements supplémentaires sont en cours en ce qui concerne l'étude de la sélectivité du protocole vis-à-vis de la détection électrique des particules ainsi que l'amélioration des traitements et dépôts effectués sur la surface.

1.5 Vers une immunodétection électrique à très haute sensibilité

A la vue des différents travaux que nous venons de présenter, il convient maintenant de mettre en place un "schéma de détection" en précisant les solutions que nous avons choisies en particulier en ce qui concerne le problème de la conductivité des biomolécules, le choix de l'architecture des nanoélectrodes ainsi que le protocole de greffage qui nous permettra d'immobiliser les molécules cibles et sondes sur la surface.

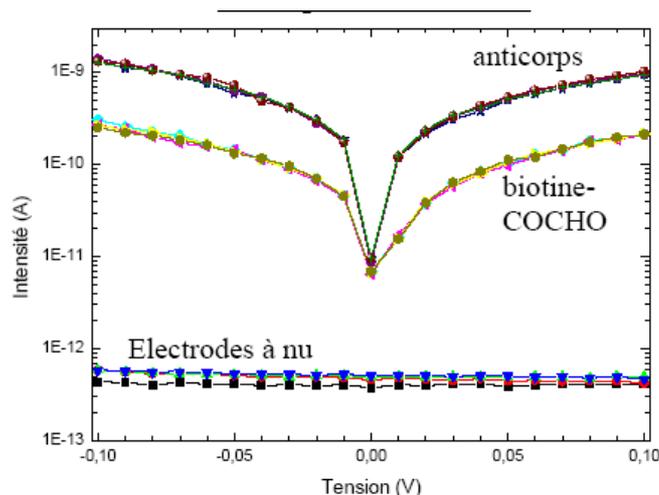


FIG. 1.26 – Exemples de mesures effectuées pour la détection de l'interaction entre une molécule de biotine et un anticorps de type antibiotine fonctionnalisé par des particules d'Or [91]. La longueur des électrodes est de $5\mu\text{m}$ pour un espace inter-électrodes de 80nm .

1.5.1 Présentation du schéma de détection

Rappelons les objectifs principaux que nous avons énoncés en introduction : nous cherchons un dispositif de détection électrique présentant une haute sensibilité, intégrable et capable de donner une réponse quantitative d'une interaction. L'utilisation de nanoélectrodes planaires paraît être une approche bien adaptée. Elle permet l'immobilisation des biomolécules sur une surface et un adressage électrique sur un faible nombre d'entre elles. Nous savons également qu'il est possible de fonctionnaliser une biomolécule par des nanoparticules métalliques pour contourner le problème de la conduction au sein de la molécule elle-même. Quelle architecture d'électrode et plus globalement quel schéma de détection pouvons nous proposer à partir de ces éléments ?

Nous nous sommes appuyés sur deux exemples de réalisations que nous avons décrits dans les paragraphes précédents (Cf. Figure 1.27). Dans ces deux exemples, des nanoparticules métalliques sont utilisées pour leurs propriétés conductrices.

Le premier exemple a déjà été décrit dans la section 1.4.4.4. Il concerne les résultats des travaux de O.D. Velez et al. [88]. Dans cette approche, des anticorps sont greffés sur des particules de latex immobilisées entre deux électrodes micrométriques. L'utilisation d'un anticorps cible marqué par des nanoparticules d'Or couplée à un procédé de métallisation permet de détecter l'immobilisation des anticorps cibles par une simple mesure de résistance. De la même façon, cette approche a été utilisée dans les travaux de V.Haguet [91] et de S.J. Park et al [90]. Il est donc possible de révéler une interaction entre deux biomolécules par un greffage de nanoparticules métalliques et ce avec une grande sélectivité.

Le deuxième exemple concerne les résultats obtenus par I.Amlani et al [36] qui ont été décrits au paragraphe 1.4.2. Dans cette expérience des nanoparticules métalliques sont utilisées pour créer des jonctions molécules-métal-molécules dans le but d'étudier les propriétés de conduction de ces mêmes molécules. Ces particules sont immobilisées

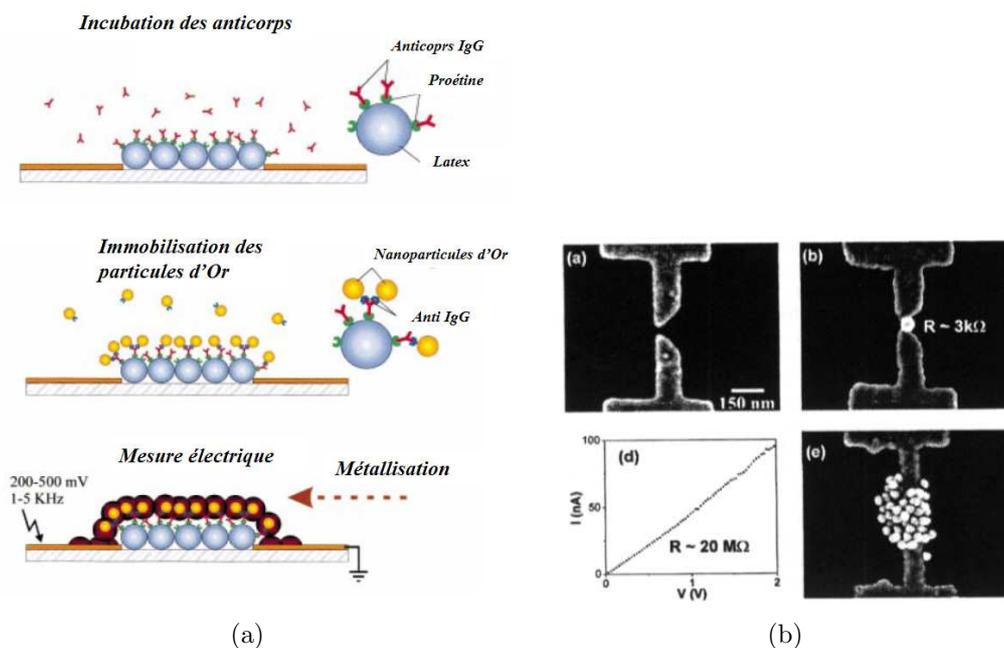


FIG. 1.27 – (a) Schéma de principe du protocole de détection immunologique présenté par O.D. Velev et al [88]. (b) Image MEB du dispositif développé par I. Amlani et al. pour l'étude de jonctions métal-molécule-métal [36].

dans l'espace séparant deux électrodes planaires métalliques déposées sur un substrat de silicium oxydé. Ces expériences montrent que le dispositif formé est particulièrement sensible et que la détection de la présence d'une seule nanoparticule est possible par une mesure électrique très simple.

Vers une réponse quantitative

Nous avons vu dans le premier exemple qu'il était possible de révéler l'interaction entre deux biomolécules par l'intermédiaire du greffage de nanoparticules. Dans notre approche nous souhaiterions appliquer ce résultat à une interaction entre protéines et plus exactement entre deux anticorps (Cf. Annexe C). Ces molécules sont très bien adaptées pour les premiers développements de nos expériences. Elles présentent de très fortes affinités, une grande spécificité et requièrent des protocoles de greffage simples et robustes. Comme nous l'avons vu en introduction, ces molécules ont également un intérêt majeur dans le domaine de l'immunologie.

Vers une détection à haute sensibilité

Dans le deuxième exemple, nous avons vu qu'il est possible de détecter le greffage de nanoparticules dans l'espace séparant deux électrodes. Cet événement se traduit par une variation très importante de la conductivité du dispositif global offrant ainsi la possibilité de détecter la présence d'une nanoparticule placée dans le gap. En retranscrivant cette approche dans notre schéma de détection il nous serait donc possible de détecter, avec une très grande sensibilité, la présence de particules dont la présence est en liaison directe avec l'interaction de la sonde immobilisée sur la surface et de la cible. Notre premier objectif consiste donc à réaliser des dispositifs dont les dimensions inter-électrodes

correspondent à la dimension d'une nanoparticule.

Le schéma de détection retenu

Notre objectif est de proposer un schéma de détection basé sur une combinaison de ces deux approches. Son principe est reporté dans la figure 1.28 (a).

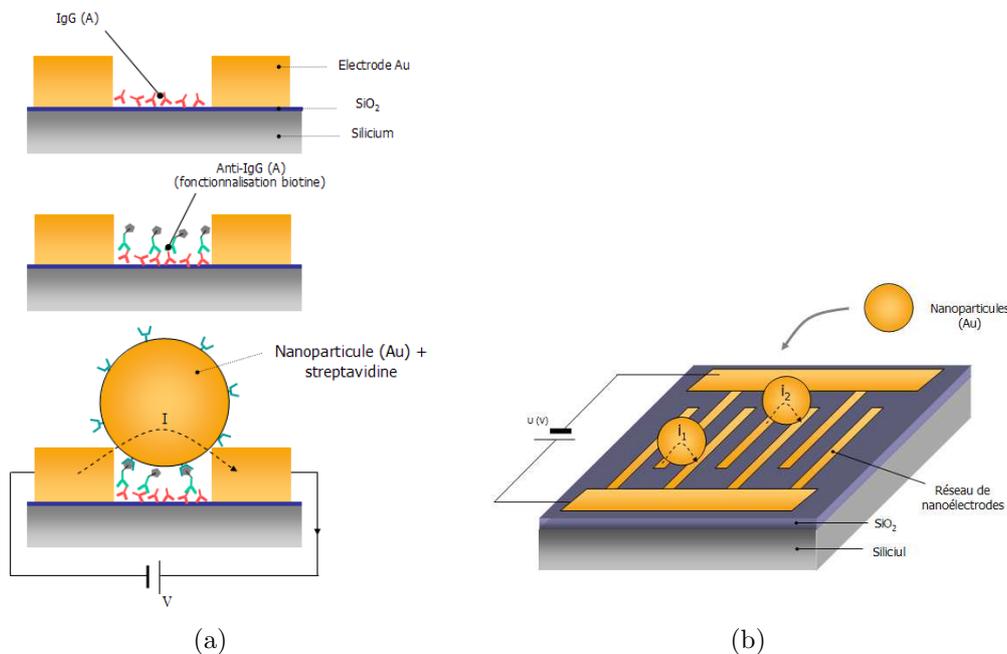


FIG. 1.28 – Illustrations du schéma de détection envisagé appliqué à la détection d'anticorps. Chaque nanoparticule est capable de ponter électriquement les nanoélectrodes.

Tout comme dans le premier schéma présenté, la première étape consiste à greffer sur la surface une molécule sonde (dans ce cas un anticorps noté IgG). Dans un deuxième temps une solution contenant une molécule cible est incubée sur la surface.

Cette molécule peut être fonctionnalisée par des molécules de biotine dont la très grande affinité vis-à-vis des molécules de streptavidine (ou d'antibiotine) peut être utilisée pour le greffage de nanoparticules métalliques. L'utilisation du couple biotine-streptavidine pour des applications de greffage est largement documentée et elle constitue une méthode simple et robuste pour immobiliser des nanoparticules. Ainsi, dans le cas d'une interaction de l'anticorps cible avec l'anticorps sonde la présence des molécules de biotine sur la surface permettra la fixation de nanoparticules dont la surface peut être fonctionnalisée par de la streptavidine (ou de l'anti-biotine). Ainsi, les anticorps ne sont plus utilisés directement pour la détection mais seule leur présence sur la surface est révélée par la présence de nanoparticules métalliques qui pourront ponter les électrodes et donner lieu à une variation de la conductivité du dispositif.

Nous disposons donc d'un principe de détection sensible, à priori, à l'échelle d'une nanoparticule. Le schéma de détection ne permet toujours pas de répondre à une exigence : la capacité de réaliser des mesures quantitatives c'est-à-dire, par exemple, de pouvoir évaluer la quantité de molécules cibles présentes dans la solution. Si nous saturons la surface du dispositif avec la molécule sonde, nous voyons intuitivement que la quantité de particules greffées nous donne une image de la quantité de molécules cibles

immobilisées sur la surface (chacune d'entre elles offrant un site potentiel d'accroche sur la surface). Une solution pour réaliser ces mesures consiste donc à compter le nombre de particules. Pour cela, le développement d'architectures telles que des réseaux d'électrodes interdigitées paraît particulièrement intéressant. En effet, la conductance de tels réseaux d'électrodes sera directement liée au nombre de chemins de conduction capables de coupler électriquement les électrodes, c'est à dire au nombre de nanoparticules fixées sur le réseau.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 1.28(b), ces structures nous permettent de combiner des espaces inter-électrodes de faibles dimensions avec de grandes longueurs d'interactions. C'est cette approche que nous avons souhaité développer au travers de ces travaux.

Il est important de noter que la détection de l'interaction entre les molécules cibles et sondes ne pourra avoir lieu que si la condition de pontage des électrodes est respectée c'est-à-dire uniquement si les particules établissent un contact électrique simultanément entre les deux électrodes. Nous pouvons bien entendu adapter la géométrie des électrodes vis-à-vis de la taille des particules mais cette condition ne pourra être vérifiée qu'expérimentalement par des mesures électriques. Par ailleurs, nous avons choisi d'utiliser des anticorps pour cette étude mais il est important de noter que le principe n'est pas exclusivement limité à cette classe de molécule et que tout couple de molécule pour lequel nous pouvons définir une notion d'affinité est potentiellement utilisable.

1.5.2 Objectifs du projet

Le premier objectif de ce projet est d'ordre technologique. Il concerne la fabrication de dispositifs d'adressage basés sur des réseaux de nanoélectrodes planaires. Cette étude sera décrite dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Nous aborderons en particulier la mise au point des paramètres technologiques permettant la fabrication de réseaux de nanoélectrodes interdigitées en utilisant la lithographie électronique à partir d'un équipement spécifique basé sur un microscope TEM/STEM. Comme nous le verrons, la lithographie présente, malgré ses performances en terme de résolution, de nombreuses contraintes liées au rendement et au coût de fabrication. Une technique de lithographie alternative sera présentée en Annexe D.3 comme une solution possible à la réplication de nanodispositifs fabriqués par lithographie électronique.

Dans un deuxième temps, il conviendra de vérifier la validité du schéma de détection que nous avons développé à partir des réseaux d'électrodes interdigitées décrits au Chapitre 2. Avant de nous intéresser à l'utilisation de ces dispositifs pour une application biologique telle que l'immunodétection, nous nous intéresserons donc, dans le chapitre 3, à l'étude de la réponse des électrodes au greffage direct de nanoparticules sur la surface des dispositifs. En particulier, il sera important de vérifier si le greffage de particules conduit effectivement au pontage des électrodes par des nanoparticules métalliques et à une variation mesurable de conductivité. Une partie importante sera consacrée à l'étude de la sensibilité de ce schéma de détection lié en grande partie à la nature des contacts entre les électrodes et les particules.

Le chapitre 4 concernera enfin l'application du schéma de détection que nous venons de décrire à un procédé d'immunodétection. Notre objectif sera de démontrer d'une part que le procédé de détection permet toujours le greffage de nanoparticules sur la

surface des électrodes et d'autre part qu'il se traduit par une variation de conductivité du dispositif. Une attention particulière sera attachée au protocole d'immobilisation des anticorps qui devra permettre de conserver leur activité biologique. Ce dernier point sera vérifié au travers de l'étude de la sélectivité du greffage des particules et de la corrélation de la réponse électrique à la densité de greffage. Nous concluons enfin sur la possibilité de traduire l'interaction entre les anticorps en un signal électrique directement mesurable à partir des électrodes.

Dans les chapitres 3 et 4, nous aborderons un aspect plus "théorique" de ces recherches en nous intéressant en particulier à l'interprétation de la localisation du dépôt des particules ainsi que des mécanismes de transport électrique que nous avons pu identifier au travers des mesures des caractéristiques électriques des dispositifs.

Enfin, nous envisagerons en conclusion les perspectives de développement de ce procédé de détection. Nous engagerons une discussion autour de la possibilité de réduire les dimensions des particules et des électrodes pour améliorer la sensibilité et les capacités de détection. Nous nous intéresserons également aux possibilités offertes par l'utilisation de dispositifs microfluidiques pour permettre des mesures directes en solution, premier pas vers le développement d'un procédé intégré d'immunodétection et plus généralement de biodétection.

Chapitre 2

Réalisation de nanoélectrodes par lithographie électronique

Sommaire

2.1	Introduction	46
2.2	Lithographie électronique dans une résine organique	47
2.2.1	Principe	47
2.2.2	La lithographie électronique dans une résine organique : le PMMA	48
2.2.2.1	Dégradation du PMMA sous faisceau d'électrons	49
2.2.2.2	Développement	50
2.2.3	Description du système de lithographie utilisé	51
2.2.3.1	Description des modules dédiés à la lithographie	52
2.2.3.2	Le système NPGS	52
2.2.3.3	Gestion de l'insolation	52
2.2.3.4	Principales limitations de l'équipement	53
2.2.3.5	Synthèse	56
2.3	Procédé technologique	56
2.3.1	Réalisation des motifs de connexion	57
2.3.1.1	Description des structures réalisées	57
2.3.1.2	Protocole expérimental	58
2.3.2	Réalisation des nanoélectrodes	60
2.4	Etude des paramètres de fabrication des nano électrodes	63
2.4.1	Préparation des dessins des structures	64
2.4.2	Choix de l'épaisseur de résine	66
2.4.2.1	Influence sur tenue mécanique des structures révélées	66
2.4.2.2	Influence sur le lift-off	69
2.4.2.3	Synthèse	71
2.4.3	Effets de proximité	72
2.4.3.1	Généralités	72
2.4.3.2	Influence de la dose et des effets de proximité	77
2.4.4	Choix de l'épaisseur et de la nature du métal déposé	81
2.4.5	Influence du procédé de développement	81
2.4.6	Synthèse	83
2.5	Caractérisation électrique des dispositifs vierges	85
2.6	Conclusion	86

2.1 Introduction

Ce chapitre est dédié à la présentation de la procédure de fabrication des nanoélectrodes dont nous avons présenté les caractéristiques essentielles dans le chapitre précédent. Les solutions que nous avons retenues sont basées sur la réalisation de réseaux d'électrodes planaires sur substrat silicium présentant de faibles espaces inter-électrodes typiquement inférieur à 100nm . La réalisation de telles structures pose naturellement le problème du choix d'une procédure de fabrication, ou plus exactement d'une technique d'écriture, compatible avec de telles résolutions.

La lithographie électronique reste une technique de choix pour la réalisation de nano-structures. Elle offre encore à ce jour les plus fortes résolutions atteintes dans une approche "top-down" et présente de nombreux avantages en particulier de part sa souplesse et sa versatilité. Le moyen de lithographie électronique dont dispose le LAAS repose sur un équipement très spécifique, un microscope à transmission et à balayage (TEM/STEM) travaillant à 200kV. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un système initialement conçu pour la lithographie, ce microscope permet d'atteindre des résolutions d'environ 3 à 5nm. Toutefois, même sur un équipement aussi performant, la réalisation de structures denses dans des gammes de dimensions bien inférieures à 100nm reste délicate et nécessite la prise en compte et l'optimisation de nombreux paramètres technologiques.

L'utilisation d'un tel équipement reste bien plus contraignante en comparaison avec un système dédié de type masqueur électronique. Aussi, de nombreux paramètres sont liés à la spécificité de notre équipement. Toutefois, notre objectif ne sera pas de décrire en détail le protocole mis en place au laboratoire mais de dégager les tendances générales, les paramètres communs à tout système de lithographie pour rendre ces résultats exploitables sur la majorité des systèmes existants.

Le chapitre sera divisé en trois parties. La première partie concerne des rappels généraux du principe et des paramètres principaux de la technique de lithographie électronique. Cette partie comprendra également une description détaillée de l'équipement utilisé dans le cadre de nos expériences pour la lithographie électronique haute résolution. Dans un deuxième temps, nous décrirons le protocole expérimental mis au point au regard des différentes contraintes spécifiques imposées par cet équipement. Enfin, nous étudierons l'influence de chacun de ces paramètres sur la réalisation de nanoélectrodes en nous intéressant plus particulièrement à la fabrication de réseaux de nanoélectrodes interdigitées. Cette dernière partie aura pour objectif l'optimisation des paramètres de fabrication et nous permettra également d'évaluer les limites de dimensions et de densités d'intégration accessibles par lithographie électronique haute résolution.

Comme nous allons le voir tout au long de la description du procédé de fabrication, l'ensemble des paramètres technologiques sont interdépendants et souvent antagonistes. En conséquence, la mise au point d'un procédé de fabrication passe inévitablement par la recherche de compromis. Aussi, nous avons préféré étudier les répercussions des paramètres technologiques sur le résultat final plutôt que de donner une description de leur influence sur chacune des étapes de fabrication. Cette approche nous est apparue plus cohérente car, selon nous, elle correspond mieux à la réalité du travail expérimental que nous avons développé pour la réalisation des dispositifs.

2.2 Lithographie électronique dans une résine organique

La lithographie électronique est à l'origine des premières réalisations de structures à l'échelle nanométrique [92] ouvrant ainsi le champ de recherche et d'application des Nanosciences. Le procédé général met en jeu l'insolation d'un matériau sensible aux électrons et appelé de façon générique résine. Initialement basées sur l'insolation d'une résine organique, de nombreuses expériences visant à déterminer la résolution limite de la technique, ont permis de démontrer la réalisation de structures de 5 à 7nm sur substrat massif [93]. L'utilisation de matériaux inorganiques appelés par abus de langage "résines inorganiques" ont permis d'atteindre des résolutions inférieures à 5nm sur membranes [94]. Aussi, même si elle ne répond pas aux critères d'une technique de production de masse puisque limitée par sa vitesse et son coût, la lithographie électronique paraît pleinement adaptée à la production de dispositifs de très faible dimension en particulier dans le cadre de travaux de recherche et reste la technique de nanolithographie la plus utilisée dans ce domaine.

Il faut cependant bien distinguer procédé d'écriture et procédé de fabrication de dispositifs. En effet, la réalisation de structures "utiles" c'est à dire destinées à une application précise est bien plus contraignante et plus complexe que la "simple" réalisation de motifs dans une résine. Aussi, même avec un outil particulièrement performant, les étapes post insolation constitueront les étapes limitantes dans la fabrication de nos dispositifs. Plus particulièrement, nous nous intéresserons à la technique dite de Lift-Off, permettant le dépôt localisé de métal sur une surface. La résolution limite de cette technique est de l'ordre de 10nm ([33]) mais nous verrons que la densité des structures que nous cherchons à fabriquer constituera une limitation importante pour le lift-off. Un travail important a donc été consacré d'une part à la mise au point d'une stratégie d'insolation et d'autre part à l'adaptation des paramètres de l'insolation (doses, prise en compte effets de proximité,...) et des paramètres technologiques (épaisseur de résine, épaisseur de la couche de métal déposée, ...).

Enfin, bien que très performant en terme de résolution, l'équipement de lithographie par faisceau d'électrons disponible au laboratoire présente de nombreux désavantages en particulier liés à sa lenteur et aux tailles des échantillons utilisables ($4 \times 4mm^2$). Les spécificités de cet équipement nous obligeront entre autre à développer un protocole de fabrication spécifique en deux étapes nécessitant une phase d'alignement.

2.2.1 Principe

Le principe de la lithographie électronique consiste à irradier localement un matériau sensible au bombardement électronique à l'aide d'un faisceau d'électrons finement focalisé (Cf. schéma 2.1). Ce matériau généralement déposé en couche mince sur un substrat, constitue le support de l'écriture électronique. On le désigne usuellement par le terme de résine.

L'irradiation de la résine provoque des modifications chimiques au sein du matériau. Ces modifications sont à l'origine de l'apparition de différences de solubilité ou de vitesse d'attaque chimique entre les parties intactes et les parties irradiées de la résine. Cette "image latente" créée dans la résine peut donc être *révélée* par attaque ou dissolution

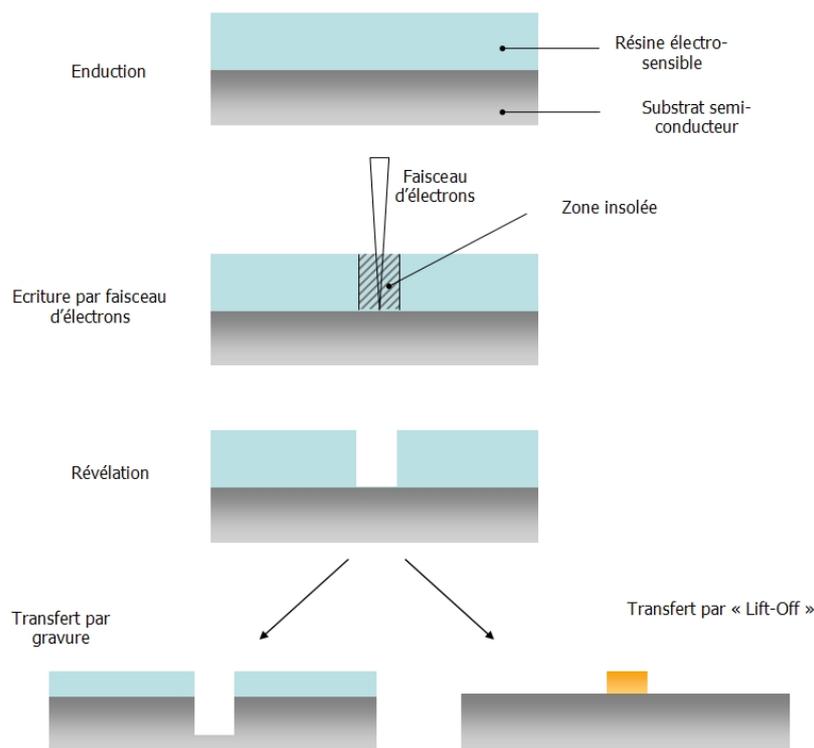


FIG. 2.1 – Schéma général des étapes principales de lithographie électronique et du transfert des motifs par "lift-off" ou gravure.

des parties irradiées de la résine. On parle de résine positive dans le cas où les zones insolées sont solubilisées et de résine négative dans le cas inverse où les zones isolées sont "durcies" par la révélation . Les motifs produits dans la résine servent alors de masques et pourront être transférés dans le substrat par gravure, croissance électrolytique ou bien encore Lift-Off.

2.2.2 La lithographie électronique dans une résine organique : le PMMA

Le PMMA (PolyméthylMétacrylate) est resté, depuis les premiers développements de la lithographie électronique, la résine organique la plus utilisée et la plus connue pour sa forte résolution intrinsèque. Parmi les nombreux composés recensés dans la famille des résines inorganiques (AlF_3 , SrF_2 , CaF_2 , BaF_2 , SiO_2 , SiO , WO_3 , MgO , Al_2O_3 ,...), certains matériaux tel que le AlF_3 ont pu démontrer des résolutions inférieures à 10nm sur échantillon massif [95, 96] mais restent peu adaptés à la nanofabrication au sens décrit en introduction. Comme nous le verrons dans les paragraphes qui suivent, le PMMA semble par contre bien adapté aux étapes de transfert, qu'il s'agisse de gravure ou bien encore de lift-off. Aussi le PMMA ,qui reste la résine la plus conventionnelle pour la lithographie électronique, sera à la base de l'ensemble des réalisations qui sont décrites dans ce chapitre.

2.2.2.1 Dégradation du PMMA sous faisceau d'électrons

La brique élémentaire de cet homopolymère est représentée sur la figure 2.2.

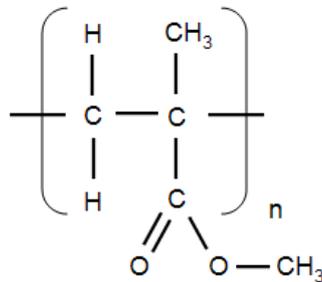


FIG. 2.2 – Formule chimique de la brique élémentaire du PMMA

On peut caractériser le PMMA par la distribution en taille ou en masse molaire des chaînes constituant le matériau. Nous utiliserons la notion de poids moléculaire qui est M_n :

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad (2.1)$$

où M_i représente la masse molaire d'une chaîne i et N_i le nombre de ces chaînes.

Les valeurs des poids moléculaires (ou molecular weight Mw) utilisées en lithographie électronique varient typiquement entre 5×10^3 g/mol et 2×10^6 g/mol. La couche de résine PMMA est donc constituée d'un polymère de très haut poids moléculaire formé de très longues macromolécules fortement enchevêtrées.

La propriété du polymère qui nous intéresse ici est sa sensibilité à un bombardement électronique. Le mécanisme correspondant à l'insolation du PMMA par un faisceau d'électrons est désormais bien connu [97, 98] et résulte des interactions inélastiques qui ionisent les molécules constituant le polymère. L'énergie nécessaire pour amorcer cette réaction est très faible et de l'ordre de 5eV [99]. Ceci signifie que la quasi totalité des électrons du faisceau primaire et des électrons rétrodiffusés et secondaires pourront engendrer des modifications chimiques du polymère. Ainsi, les effets de proximité dont nous discuterons l'importance ultérieurement sont liés à cette faible valeur du seuil d'insolation de la résine. Les réactions chimiques initiées dans le PMMA sont assez complexes et conduisent principalement à la scission des liaisons carbone-carbone des chaînes du polymère. La principale conséquence de l'insolation est donc un abaissement localisé du poids moléculaire de la résine.

Il est possible de relier la masse molaire finale M_f des chaînes du PMMA à la masse initiale M_i par une équation simple [100] :

$$M_f = \frac{M_i}{1 + (g\varepsilon M_i)/N_A} \quad (2.2)$$

où g représente le nombre de scissions provoquées par unité d'énergie absorbée par la résine lors de l'insolation, ε l'énergie déposée par unité de volume lors du bombardement électronique, ρ la masse volumique de la résine et N_A le nombre d'Avogadro.

Nous voyons au travers de cette expression que la connaissance de la distribution de l'énergie dans la résine nous permet de déterminer en chaque point la valeur du poids moléculaire. Comme nous allons le voir dans le paragraphe qui suit, l'étape de développement va nous permettre de révéler ces variations du poids moléculaire en jouant sur les différences de solubilité de la résine. Par conséquent, c'est l'énergie déposée dans la résine qui va fixer la taille et la forme des structures après développement.

D'un point de vue expérimental, la quantité d'énergie déposée dans la résine reste un paramètre difficilement accessible. D'un point de vue pratique, on utilise la notion de dose D qui s'exprime généralement en Coulombs par m^2 ou encore $\mu C/cm^2$ et qui définit la quantité de charges (électrons qui bombardent une surface unité de résine). Cette dernière grandeur est facilement accessible à l'expérimentateur : elle repose sur la mesure du courant du faisceau d'électron et sur la mesure du temps d'insolation en chaque point de la surface. Toutefois, le passage de la dose D , qui chiffre *l'intensité* du bombardement, à la densité d'énergie déposée ε , qui chiffre *l'effet* de ce bombardement dans la résine, n'est pas immédiat. Il passe en général par le calcul des sections efficaces de collisions élastiques et inélastiques des électrons avec les atomes de la résine et le suivi des trajectoires des électrons lors de leur pénétration dans la couche de résine et le substrat.

2.2.2.2 Développement

Comme nous venons de le mentionner l'étape de développement va permettre de révéler l'image latente créée dans la résine après l'insolation. Le choix du solvant et dans un cadre général du procédé de développement est d'une importance capitale dans le procédé de lithographie car c'est au cours de cette étape que les variations de poids moléculaires engendrées dans la résine lors de l'insolation sont traduites par une variation de la topographie de la surface. De la sélectivité de la méthode de révélation dépendra la forme et la taille des motifs générés dans la résine donc la résolution du procédé.

Dans le cas du PMMA, nous avons vu que l'insolation engendrait une diminution du poids moléculaire de la résine. En choisissant un solvant approprié au PMMA, il est possible de dissoudre sélectivement les zones insolées de la résine. En effet, les propriétés de dissolution d'un polymère sont étroitement dépendantes de son poids moléculaire. Il est possible d'exprimer la vitesse de dissolution V de la résine en fonction de son poids moléculaire M_f par la relation empirique suivante :

$$V = V_o + \frac{\beta}{M_f^\alpha} \quad (2.3)$$

où V_o représente la vitesse de dissolution de la résine pour un poids moléculaire infini, β et α des paramètres déterminés expérimentalement [100]. Les vitesses de dissolution sont, comme le montre cette relation, d'autant plus fortes que le poids moléculaire de la résine est faible. Ainsi, en utilisant les différences de vitesse d'attaque il est possible de dissoudre sélectivement les zones insolées tout en préservant le reste du film de résine. On voit tout l'intérêt ici de partir d'une couche de résine vierge de très fort poids moléculaire (quasiment infini) qui dans un solvant approprié présentera une vitesse de dissolution très faible, au contraire des régions insolées par les électrons, qui du fait des scissions des macromolécules irradiées, présenteront des vitesses de dissolution très élevées.

Cette relation nous montre également que si nous connaissons la répartition de l'énergie dissipée dans la résine et par conséquent la distribution du poids moléculaire (Cf. relation 2.2), il est en principe possible de déterminer les tailles et la forme des motifs après révélation .

Jusqu'en 1993, les travaux de A.N. Broers [101] en 1981 et de H.G. Craighead [102] en 1983 établissaient l'état de l'art de la résolution de la lithographie électronique sur PMMA à 10nm. Bien que la taille du faisceau utilisé pour leur étude soit inférieure à 2nm, les effets attribués au parcours des électrons secondaires et à la taille des fragments des chaînes de polymère après insolation semblaient constituer les limitations majeures et donc indiquer que la limite de 10nm constituait la résolution *intrinsèque* à la résine de type PMMA. Pourtant en 1993, l'équipe du Pr. Ahmed [93] démontre la fabrication de ligne de 5–7nm dans le PMMA en assistant le développement de la résine par une agitation du milieu aux ultra-sons. L'apport d'énergie assuré par les ultrasons permet aux fragments de molécules de franchir les barrières de potentiels créés par les Forces de Van der Waals exercées par les zones intactes situées de part et d'autre de la zone insolée. L'ouverture de tranchées dans la résine est alors possible pour des largeur de lignes inférieures à 10nm. Ainsi, la limite des 10nm, longtemps acquise comme la résolution intrinsèque de la résine, s'avérait provenir des difficultés à dissoudre des fragments de molécules lors de la révélation. L'étape du développement de la résine, longtemps négligée dans les premiers travaux, est devenue la question centrale dans le procédé de lithographie électronique.

Ainsi, dans le cadre de nos expériences nous avons utilisé deux solutions de révélation. La première solution est basée sur un mélange de MIBK (Methyl Isobutyl Ketone ou 4-methyl-2-pentanone)/IPA (Propanol 2). La deuxième solution repose sur l'utilisation d'IPA pur en combinaison avec une agitation sous ultrasons. Nous reviendrons en détail sur les propriétés de ces deux solutions dans la section 2.4.5.

2.2.3 Description du système de lithographie utilisé

Le système de lithographie électronique haute résolution utilisé au laboratoire est basé sur un microscope électronique fonctionnant en mode transmission et en mode balayage (STEM) (CM20-Philips) équipé d'une pointe à émission de champ Shottky et travaillant sous une tension d'accélération de 200kV. Une photo du microscope est donnée dans la figure 2.3.

Ses avantages majeurs sont liés, comme pour les systèmes de lithographie électronique dédiés, à sa souplesse puisqu'il est possible de modifier très rapidement les paramètres et le dessin des motifs à insoler mais aussi et surtout à ses performances en terme de résolution.

Cet appareil n'est pas prédestiné à la lithographie mais a été équipé d'un module de pilotage et d'escamotage du faisceau d'électrons ainsi que d'un module de contrôle de déplacement de l'échantillon. Les possibilités de balayage du faisceau et la présence d'un détecteur d'électrons secondaires qui permet l'observation et la mise au point de paramètres d'insolation sur échantillons massifs, rendent le microscope compatible avec la lithographie et nous permettent de tirer profit de la très faible taille de sonde afin de l'utiliser pour la réalisation de motifs nanométriques. Grâce à son canon à émission de champ, ce microscope délivre une sonde caractérisée par un courant d'environ 20pA pour



FIG. 2.3 – Microscope électronique à Transmission et à balayage FEG 20.

un diamètre de l'ordre de 1nm. Cette très faible taille de sonde permet de structurer une couche de résine telle que le PMMA avec une résolution de l'ordre de 3 à 5nm dans le cas de lignes isolées et de 10nm pour des réseaux de points au pas de 30nm [33]. La taille des structures obtenues est toujours plus grande que la taille de la sonde en raison des phénomènes d'élargissements dus d'une part au développement et d'autre part à la diffusion des électrons dans la résine et dans le substrat. Nous reviendrons en détail sur ces phénomènes dans les paragraphes suivants.

2.2.3.1 Description des modules dédiés à la lithographie

2.2.3.2 Le système NPGS

La gestion des insolutions est assurée par un ordinateur pourvu du système NPGS (Nano Pattern Generation System) [103] qui comprend un logiciel de pilotage et de gestion des paramètres des insolutions ainsi qu'un module assurant les communications et le pilotage du microscope. Ce système permet de contrôler d'une part la position du faisceau d'électrons mais également la platine de déplacement de l'échantillon dans le microscope.

Les dessins des motifs à insoler sont, quant à eux, préparés à l'aide du logiciel DesignCad à partir duquel le logiciel NPGS programme les coordonnées de l'insolation en fonction des paramètres programmés (dose, courant de faisceau, ...). Le logiciel NPGS dispose également d'un module de gestion des étapes d'alignement.

2.2.3.3 Gestion de l'insolation

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'utilisation du microscope pour la lithographie repose en partie sur ses capacités de fonctionnement en mode balayage. Lorsqu'il est utilisé pour l'imagerie, ce mode permet de balayer la surface de l'échantillon avec le

faisceau d'électron pour obtenir, en chacun des points de balayage, un signal provenant de l'interaction du faisceau avec l'échantillon. Les différents détecteurs installés dans le microscope permettent de reconstituer point par point une image de l'échantillon. Le déplacement du faisceau sur la surface est engendré par un ensemble de bobines électromagnétiques réparties le long de la colonne du microscope qui constituent "l'optique" du microscope. L'insolation de motifs dans la résine recouvrant l'échantillon repose elle aussi sur un balayage de la surface, mais un balayage localisé uniquement dans des zones définie par l'utilisateur. Le balayage des zones à insoler est géré par le système NPGS qui traduit les dessins réalisés sous DesignCad en coordonnées de points successifs de déplacement du faisceau. A chacune de ces coordonnées est associé un temps d'insolation c'est-à-dire un temps durant lequel le faisceau d'électrons sera maintenu à la coordonnée programmée. Le pas entre chacun des points de déplacement est défini par l'utilisateur. La relation 2.4 nous permet de relier la dose au courant i caractérisant le faisceau, au temps t d'insolation par point et aux pas p_x et p_y représentent les espaces entre chaque point suivant les axes x et y du plan de l'échantillon (Cf. Figure 2.4).

$$D = \frac{i \times t}{p_x \cdot p_y} \quad (2.4)$$

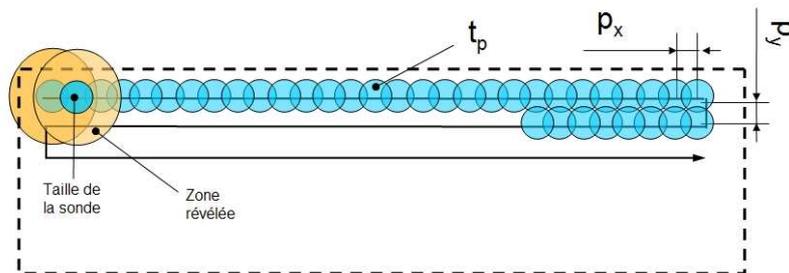


FIG. 2.4 – Schéma illustrant les déplacements du faisceau d'électrons lors de l'insolation. Les motifs sont décomposés en un ensemble de coordonnées de points d'insolation. A chaque point est attribué un temps de maintien du faisceau à la coordonnée programmée.

Chaque motif est donc décomposé en une succession de points d'insolation. La séparation entre chaque point peut avoir une influence importante sur la définition des motifs insolés. Chaque point d'insolation conduira après développement à une zone révélée dont la taille est approximativement égale à trois fois la taille de la sonde. La définition des motifs à partir de ces points d'insolation nécessite donc de considérer les effets de recouvrement entre points. Si le pas entre point est trop grand, chaque point d'insolation apparaîtra individuellement et la zone insolée sera définie de façon irrégulière voire discontinue (sous la forme d'un réseau de point si aucun recouvrement n'a lieu).

2.2.3.4 Principales limitations de l'équipement

Outre les contraintes de manipulation liées à la nécessité de travailler dans une enceinte sous vide poussé, l'utilisation d'un microscope TEM/STEM même équipé d'un

système tel que NPGS présente de nombreuses contraintes et inconvénients que nous allons décrire dans ce paragraphe. Il est important de mentionner que les limitations engendrées par l'utilisation de notre équipement n'existent pas, ou du moins, sont gérées de manière transparente pour l'utilisateur sur les systèmes de lithographie dédiés (masqueurs électroniques). Aussi, notre objectif n'est pas de faire une description détaillée de la gestion des limitations spécifiques à notre équipement mais uniquement de présenter les différentes contraintes auxquelles nous avons été confrontés. Ces limitations ont influencé le protocole expérimental de fabrication et considérablement limité le rendement de la technique.

Limitation de la taille des échantillons

La première limitation réside dans la taille maximale des échantillons acceptés par le microscope. En effet, l'appareil est conçu pour l'observation en transmission à haute résolution et donc étudié pour offrir les meilleures résolutions sur des surfaces d'observations de faibles dimensions. La taille des échantillons est ainsi limitée à $4\text{mm} \times 4\text{mm}$ et seule une zone circulaire de 2mm de diamètre est accessible à l'observation et donc à l'insolation. La capacité d'intégration de nanostructures même sur des champs de quelques millimètres reste très importante et cette limitation sera peu contraignante vis à vis de nos applications. Par contre, la production d'échantillons de devra se faire à l'unité et il sera nécessaire de répéter l'ensemble des étapes d'insolation (mise au point, alignement, insolation ...) pour chaque échantillon. Cette première contrainte, associée à la faible vitesse d'insolation, contribue au faible rendement de production des dispositifs et constitue l'inconvénient majeur du système.

Limitation du champ d'insolation

La deuxième limitation concerne plus particulièrement la gestion de "l'optique" du microscope. En effet, dans le mode "Scanning" ou balayage utilisé pour les insolutions, deux configurations de courants de lentilles électromagnétiques sont accessibles. L'une correspond à des jeux de courants de lentilles adaptés à la haute résolution (Mode HMS : High Magnification Scale) et l'autre correspond à un mode basse résolution (Mode LMS : Low Magnification scale). Le mode HMS permet d'optimiser la focalisation du faisceau sur l'échantillon et sera donc le mode de choix pour l'insolation de nanostructures (résolution 3–5 nm). Par contre comme son nom l'indique il n'autorise que des agrandissements élevés. Ces derniers sont compris entre 3000 et 300000 ce qui limite la taille du champ d'insolation à $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ au maximum. Dans le mode LMS, par contre des champs de $800 \times 800 \mu\text{m}^2$ sont accessibles pour l'insolation avec une résolution cette fois limitée à environ 100nm qui restera insuffisante compte tenu des dimensions et de la densité des structures que nous cherchons à réaliser.

Cette limitation pose le problème de la réalisation des motifs de connexion qui permettront de relier les nanoélectrodes avec le système externe de mesure électrique. Ces motifs doivent comporter de larges surfaces de contact ($> 100 \times 100 \mu\text{m}^2$) pour permettre le dépôt de pointes de mesures ou la réalisation de soudures. Il reste impossible de réaliser ces structures en mode HMS. Deux stratégies ont été envisagées et seront décrites en détail dans le protocole de fabrication. La première repose sur la fabrication de ces motifs par photolithographie UV. La deuxième est basée sur la réalisation de ces motifs en utilisant le mode LMS du microscope. Dans les deux cas, une étape supplémentaire de

lithographie sera donc nécessaire ainsi qu'une étape d'alignement permettant de relier les deux insulations.

Gestion des étapes d'alignement

Comme nous venons de le voir, une étape d'alignement sera nécessaire pour pouvoir connecter les nanoélectrodes aux structures permettant la connexion au système de mesure. Cette étape d'alignement nécessite le repérage des motifs d'alignements fabriqués en lithographie optique et leur alignement par rapport à la zone de l'échantillon à insoler. Or, la limitation de la taille des champs d'insolation ou d'observation ne permet pas d'accéder à l'ensemble de la surface de l'échantillon. Le système NPGS permet de contrôler la platine de déplacement et gère en particulier les étapes d'alignement. Toutefois, la mise en oeuvre d'une procédure d'alignement reste très contraignante. En effet, la recherche des motifs d'alignement sur la surface doit se faire manuellement et doit être répétée plusieurs fois pour compenser les erreurs sur les déplacements de la platine motorisée. Aussi, la durée de cette étape est-elle généralement comprise entre 30 et 60 minutes durant lesquelles la présence de l'utilisateur est indispensable.

Fréquence de travail

Le pilotage du faisceau d'électrons pendant les phases de lithographie est assuré par deux convertisseurs analogique-numérique 16bits pilotés par un ordinateur et relié à l'électronique de balayage du microscope (x,y). La fréquence de travail du convertisseur est de 50kHz autorisant donc des temps minimums d'insolation par point de $20\mu\text{s}$. Comparées aux systèmes dédiés, autorisant des fréquences de travail de plusieurs MHz (généralement 25MHz), les performances de notre système sont médiocres et seront une limitation permanente en ce qui concerne le choix du courant de faisceau et du pas entre points insolés. En effet, nous savons grâce à la relation 2.4 que pour une dose d'insolation donnée (permettant la révélation de la résine) et un pas entre point donné, le temps d'insolation par point est inversement proportionnel au courant du faisceau. Si nous considérons un courant de faisceau d'environ 20pA, une dose d'insolation standard (pour nos réalisations) de 5nC/cm et un pas entre point de 1nm, le temps d'insolation par point est de $25\mu\text{s}$ valeur très proche de la limite du système.

Limitation du système d'escamotage

Ce système gère également les opérations d'escamotage du faisceau ("blanking"). En effet, l'insolation de motifs isolés implique que le passage du faisceau d'une zone d'insolation à une autre se fasse sans insoler la zone intermédiaire entre les deux motifs. Pour cela, le système d'escamotage du faisceau utilise les bobines électromagnétiques de déplacement pour dévier le faisceau hors de la zone accessible de l'échantillon. Ce système est piloté par l'ordinateur et travaille donc lui aussi à une fréquence limitée à 50kHz. En effet, lors l'escamotage les lentilles électromagnétiques sont sollicitées avec des courants très différents de leur configuration de travail. Ce phénomène est à l'origine de défauts de stabilisation et donc de positionnement du faisceau après l'escamotage. Dans l'ensemble de nos insulations nous avons choisi de désactiver ce système et nous avons préféré optimiser les dessins pour minimiser les effets d'insolation entre motifs isolés.

Déformation des champs d'insolation

La dernière limitation majeure de notre système de lithographie est lié à la précision du positionnement de la sonde électronique à l'intérieur d'un champ d'insolation. En effet, les modifications des courants de lentille lors des réglages du microscope engendrent des distorsions dans le champ d'observation et donc d'insolation. Concrètement ces effets de distorsion se traduisent par une déformation des motifs insolés dans la résine. Les modifications des dimensions de ces derniers peuvent atteindre 10% et ont une répercussion dramatique en particulier dans le cas de nanostructures. Le système NPGS permet de corriger ces déformations par l'utilisation d'une matrice dite de "distorsion", déterminée à partir de l'observation de motifs calibrés. Celle-ci permet de recalculer les coordonnées de chaque point d'insolation pour compenser les effets de la distorsion. Toutefois, cette matrice est spécifique d'une configuration donnée du microscope et chaque réglage apporté sur le microscope est susceptible de la modifier.

2.2.3.5 Synthèse

Les limitations engendrées par l'utilisation d'un microscope tel que celui nous avons utilisé pour la lithographie n'existent plus, ou du moins, sont gérées en parfaite transparence sur les masqueurs électroniques. Ces derniers permettent de travailler sur des wafers entiers, intègrent des procédures d'alignement automatiques et possèdent des champs d'insolations calibrés. Aussi, nous n'avons pas souhaité donner une description détaillée de ces problèmes spécifiques à notre équipement et privilégier l'étude des paramètres généraux tels que la stratégie de dessin, la dose et les problèmes liés au développement et au transfert par lift off. Dans ce paragraphe nous avons présenté les contraintes liées à notre équipement de lithographie ainsi que leur influence, tout au long de nos travaux, sur la fabrication des dispositifs utilisés. Ces limitations ont d'une part nécessité une optimisation précise des paramètres liés au microscope mais ont surtout limité considérablement le rendement de production des dispositifs de part le temps consacré à chaque insolation et la nécessité d'une présence permanente de l'utilisateur durant chaque insolation.

2.3 Procédé technologique

L'objectif de ce paragraphe est de présenter les solutions technologiques mises en oeuvre pour la réalisation des nanoélectrodes et des dispositifs de connexion. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les contraintes et les limitations liées à notre équipement de lithographie ont conditionné le choix du procédé de fabrication. Toutefois, les différentes étapes et procédures (procédure d'alignement, réalisation des motifs de contact, matrice de correction du champ, ...) impliquées spécifiquement par cet équipement ne feront pas l'objet d'une étude détaillée. Tout au long de cette description, nous dégagerons les étapes et les paramètres importants du procédé de fabrication en nous attachant plus particulièrement aux paramètres les plus généraux.

2.3.1 Réalisation des motifs de connexion

2.3.1.1 Description des structures réalisées

La première étape du procédé de fabrication des nanodispositifs concerne la réalisation des motifs de contact qui permettront la connexion électrique des nanoélectrodes au dispositif de mesure externe. Ces motifs de connexion des structures doivent offrir des surfaces de contact suffisamment larges pour permettre soit la connexion par microsoudures soit la connexion par pointes de test. Comme nous l'avons déjà mentionné au paragraphe 2.3.2, notre équipement présente de nombreuses limitations pour la réalisation de motifs étendus sur de larges surfaces. Aussi, même si la réalisation de large zones de contact reste possible en utilisant le mode LMS, le champ accessible dans ce mode reste limité ($800 \times 800 \mu\text{m}^2$) ce qui présente un inconvénient majeur pour l'utilisation des premiers dispositifs de microfluidiques que nous avons souhaité utiliser et qui présentent des dimensions de l'ordre du millimètre (Cf. Chapitre 3).

La réalisation de ces structures de connexion ne nécessitant pas une technique de fabrication de résolution élevée, la lithographie optique en proximité nous est apparue comme une bonne alternative. Son principe est similaire à celui de la lithographie électronique (Cf. Section 2.2) et repose sur l'insolation d'une résine photosensible au travers d'un masque optique sur lequel sont retranscrits les structures à insoler. Il s'agit par contre d'une technique d'écriture en parallèle qui permet d'insoler simultanément la totalité de la surface d'un wafer de silicium et donc de produire en une étape de nombreux échantillons.

Une deuxième stratégie mise au point récemment est basée sur l'utilisation des deux modes de fonctionnement de l'appareil et repose sur une première insolation des nanoélectrodes en mode HMS puis une deuxième insolation des motifs de contact en mode LMS qui autorise un champ maximal d'insolation de $800 \times 800 \mu\text{m}^2$. Cette méthode limite les étapes de fabrication puisqu'une seule étape de lift-off est nécessaire. Toutefois, la limitations du champ pose un problème vis-à-vis de l'adaptation de dispositifs de microfluidiques tels que ceux que nous avons réalisés qui nécessitent des distances entre nanoélectrodes et plots de contact d'au moins 1mm.

La figure 2.5 nous donne un aperçu de la structure que nous avons retenue. Celle-ci a été conçue pour des échantillons compatibles avec les exigences du microscope et est contenue dans une cellule de $4\text{mm} \times 4\text{mm}$. Les motifs de connexion sont constitués de 12 plots de contact de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ situés à la périphérie de l'échantillon. Chacun de ces plots est connecté à une piste de largeur décroissante dont l'extrémité aboutit dans un champ d'insolation de $40 \times 40 \mu\text{m}^2$.

Des motifs d'alignements sont également présents à proximité des plots de contact. Ils permettront le repérage des coordonnées du champ d'insolation ainsi que leur calibration.

Chaque structure de connexion constitue une cellule de $4\text{mm} \times 4\text{mm}$ qui a été dupliquée sur l'ensemble du masque optique. La lithographie UV nous permet donc en une seule insolation de transférer ces structures sur l'ensemble de la surface d'un wafer à partir duquel nous pourrions obtenir environ une centaine d'échantillons de connexion.

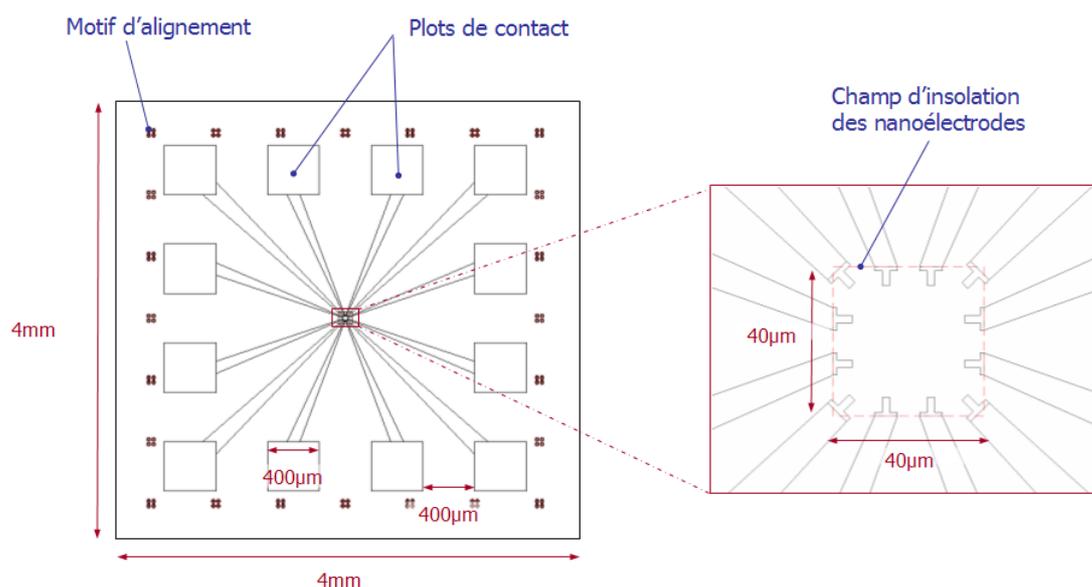


FIG. 2.5 – Schéma de la structure de connexion réalisée par photolithographie UV. Des plots de connexion situés à la périphérie du dispositifs permettent la connexion électrique des nanoélectrodes qui seront réalisées dans le champ d'insolation ($40 \times 40 \mu\text{m}^2$) situé au centre.

2.3.1.2 Protocole expérimental

Le schéma 2.6 rassemble les différentes étapes du protocole utilisé pour la fabrication des motifs de contact.

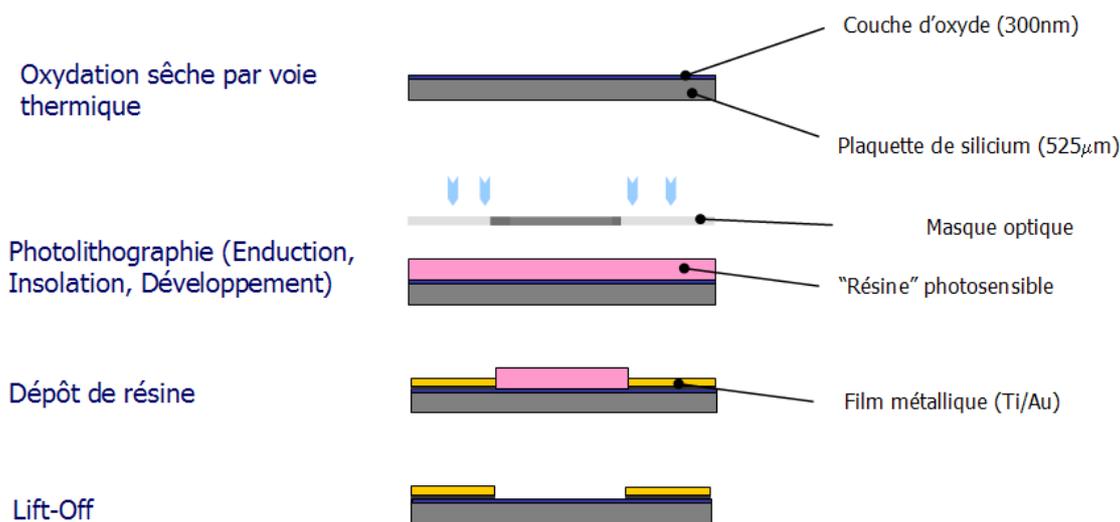


FIG. 2.6 – Description schématique des principales étapes de fabrication (Oxydation, Photolithographie, Lift-Off) des motifs de contact permettant la connexion électrique des nanoélectrodes aux dispositifs de mesure.

Les étapes essentielles du procédé concernent d'une part la croissance d'un couche d'oxyde sur la surface des échantillons.

Préparation des substrats et oxydation thermique

Les dispositifs ont été réalisés sur substrat Silicium à partir de wafers 4 pouces (orientation cristalline [100]) dopés N (Phosphore : 10^{13} atomes. cm^{-3}) de $525\mu\text{m}$ d'épaisseur. Ces plaquettes de silicium ont tout d'abord subi un nettoyage "standard" permettant d'enlever les contaminants présents sur la surface (Cf. protocole ci-dessous). La couche d'oxyde est ensuite obtenue par croissance à partir de la surface de silicium en utilisant un procédé d'oxydation thermique par voie sèche. Ce procédé permet d'obtenir un oxyde de très bonne qualité (tension de claquage voisine de 5×10^6 V/cm, Indice de réfraction ~ 1.46). Lors des étapes de mesure, cette couche d'oxyde garantira une bonne isolation électrique entre les nanoélectrodes et le substrat. En vue des premières caractérisations électriques, nous avons fixé l'épaisseur de la couche d'oxyde à 300nm pour nous affranchir de tout effet induit par le substrat.

Fabrication des motifs de contact

Comme nous l'avons déjà mentionné, la réalisation des motifs de contact a été effectuée par photolithographie UV. Plus exactement, nous avons réalisée une étape de photolithographie en contact dans une résine positive (AZ 1529). Avant le dépôt de la résine par enduction sur une tournette ("spin-coating"), un traitement de surface du dispositif par HMDS (HexaMethylDiSilazane) a été effectué dans le but de favoriser l'adhérence de la résine sur le dispositif. L'utilisation d'une résine positive n'étant pas favorable pour le lift off, nous n'avons pas effectué de recuit après l'étape de développement pour éviter d'arrondir les flancs de la résine.

Le protocole mis en oeuvre est le suivant :

- Recuit de la plaquette de silicium à 200° pendant 30 minutes dans une étuve (séchage de la surface)
- Traitement de surface : Dépôt d'HMDS (HexaMethylDiSilazane) en phase vapeur
- Photolithographie
 - Enduction de résine positive (AZ 1529) par centrifugation (Épaisseur = $2.7\mu\text{m}$)
 - Insolation développement sans post recuit
 - Rinçage Eau DI et séchage sous flux d'azote

Lift-Off

L'étape de photolithographie nous permet de transférer une image des structures de connexion dans la résine qui après l'étape de développement a été enlevée dans les zones correspondant aux structures. L'étape de lift-off consiste ensuite à transférer les motifs de résine obtenus en déposant sur l'ensemble de la surface une couche de métal. Après dépôt de cette couche métallique, la résine est dissoute dans un solvant. Les zones métallisées sont emportées lors de la dissolution de la résine. Seul le dépôt métallique présent dans les zones insolées de la résine est donc conservé sur la surface (Cf. Figure 2.6).

Nous avons procédé à deux dépôts successifs de Titane puis d'Or sur la surface de la plaquette en utilisant une méthode d'évaporation sous vide. Le rôle de la couche de Titane est de favoriser l'accroche sur la silice de la couche d'Or qui servira de conducteur électrique. L'épaisseur de la bicouche est un paramètre important pour la réalisation des électrodes et doit être choisie en fonction de l'épaisseur de la couche métallique définissant les nanoélectrodes. Il est en effet nécessaire de minimiser la différence de marche entre les deux dépôts pour assurer un bon raccord électrique entre les deux niveaux. Nous avons choisi une épaisseur totale de 20nm (5nm Ti / 15nm Au) a été déposée (Cf. Section 2.4.4) qui correspondra également à l'épaisseur des structures de contact réalisées par photolithographie.

Le protocole utilisé est le suivant :

- Dépôts successifs de Titane et d'Or sur la surface de la plaquette par évaporation (par faisceau d'électrons).
 - Dépôt de 5nm de Titane
 - Dépôt de 15nm d'Or
- Dissolution de la résine dans un bain d'acétone + ultrasons (t= 10 minutes)
- Rinçage à l'acétone puis à l'eau désionisée
- Séchage et stockage sous flux d'azote

2.3.2 Réalisation des nanoélectrodes

Le schéma 2.7 rassemble les différentes étapes du protocole de fabrication des nanoélectrodes.

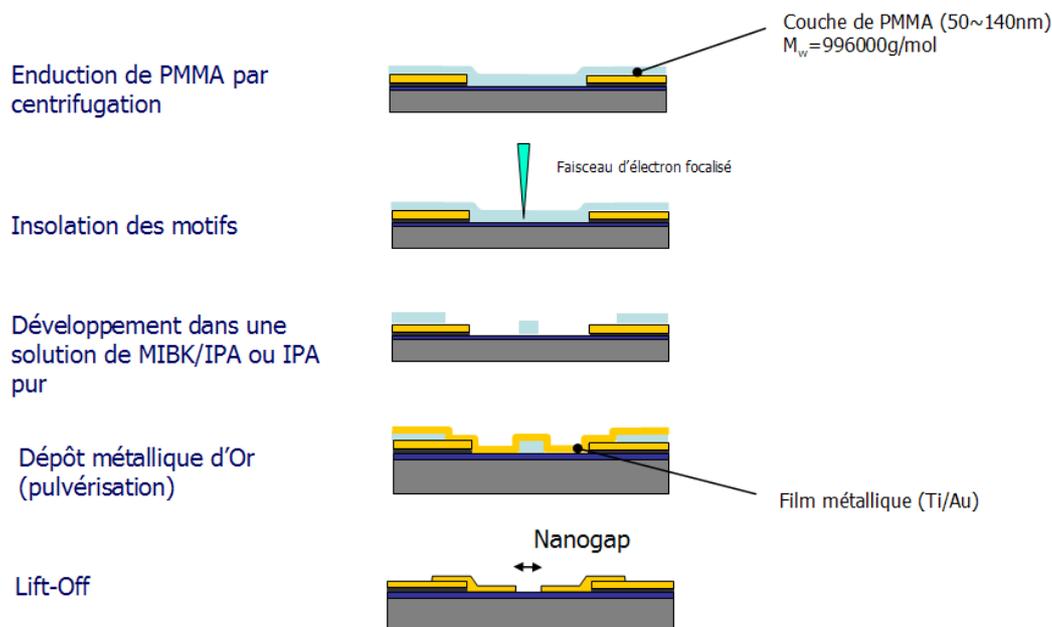


FIG. 2.7 – Description schématique du procédé de fabrication des nanoélectrodes et de leur alignement sur les motifs de connexion.

Le protocole mis en place est similaire à celui que nous venons de décrire et repose lui aussi sur une étape de lithographie puis sur une étape de lift-off. Toutefois, la réalisation de motifs nanométriques, dans notre cas de dimensions inférieures à 100nm, reste bien plus délicate et nécessite un contrôle précis des différents paramètres technologiques. Au cours de la description du protocole qui va suivre nous allons donc dégager chacun de ces paramètres.

Préparation des échantillons

Le dépôt de la couche de PMMA sur la surface des échantillons est en général obtenue par centrifugation (ou "spin-coating"). Les échantillons sont tout d'abord lavés en utilisant la succession de solvants Trichloroéthylène + Ultra-Sons, Acétone + Ultra-Sons, Eau. Ces différents lavages sont particulièrement utiles lorsque les échantillons ont été obtenus après découpage par scie diamantée. Ils permettent d'une part de dissoudre la couche de résine de protection utilisées pour la découpe (Résine Optique de type 1529) et également d'éliminer les éclats éventuels provoqués par la découpe. Après séchage sous azote, les échantillons sont rincés au trichloroéthylène puis séchés à nouveau.

- Découpage des échantillons
 - Enduction d'une couche de résine de protection
 - Découpage des cellules de 4mm×4mm par scie diamantée.
- Préparation des échantillons
 - Lavages des échantillons dans une série de bains d'acétone + Ultrasons
 - Rinçage Acétone, Eau DI , séchage sous flux d'azote
 - Rinçage au trichloroéthylène et séchage

Enduction des échantillons

Chaque échantillon est ensuite enduit d'une couche de PMMA par enduction sur tournette ("spin-coating") à partir d'une solution de PMMA dans le MIBK (MethylIsoButylKetone). Le premier paramètre important concerne le choix de l'épaisseur de résine. Comme nous le verrons dans les paragraphes 2.4.5 et 2.4.4 ce paramètre influence d'une part la tenue mécanique des motifs transférés dans la résine mais également la dernière étape de lift pour laquelle la morphologie des motifs sera capitale. Le contrôle de l'épaisseur de résine est effectué, pour une concentration donnée de PMMA, en modifiant la vitesse de rotation de l'échantillon lors de l'enduction par "spin-coating". Les épaisseurs habituelles utilisées sont comprises entre 50 et 300nm.

L'enduction de résine a été effectuée à partir de solutions de PolyméthylMétacrylate de poids moléculaire moyen $M_w=996000\text{g/mol}$ dissous dans le MIBK (MethylIsobutyl-Kétone ou 4-methyl-2-pentanone) sous une concentration comprise entre 20 et 40g.L⁻¹.

- Enduction des échantillons
 - Enduction par "spin-coating" à partir d'une solution de PMMA (996000) dans le MIBK.
 - Concentration comprise entre 20 et 40g.L⁻¹
 - Vitesse de rotation comprise entre 3000 et 5000 tours/min (accélération 5000 tours/min/s)
 - Temps de rotation : 30s
 - Recuit à 160°C pendant 1minute sur plaque chauffante
 - Stockage des échantillons à l'abri de la lumière

Lithographie électronique

La première étape concerne la préparation des fichiers de dessin. Ces derniers sont réalisés sous Design CAD. Ils sont ensuite traduits par le logiciel NPGS. Les différents types de structures étudiés seront présentés dans la section 2.4.1.

Les paramètres des insolations seront longuement détaillés dans la section suivante qui sera dédiée à la réalisation des nanoélectrodes.

Développement

Le choix de la technique de développement est, comme nous l'avons décrit au paragraphe 2.4.5, un paramètre fondamental de la fabrication de motifs nanométriques. C'est lors de cette étape que sera révélée l'image latente insolée dans la résine.

Deux protocoles particuliers ont été étudiés. Ils reposent sur l'utilisation de solutions de développement de compositions différentes. La première méthode est basée sur une solution de MIBK (Methyl Isobutyl Ketone ou 4-methyl-2-pentanone)/IPA (Propanol-2) sous une dilution de 1 pour 3. La vitesse de développement utilisée pour la détermination des temps de développement est de 200nm par minute. La deuxième solution utilisée repose sur l'utilisation combinée d'IPA pur et d'une agitation sous ultrasons. Dans ce cas, la vitesse de développement utilisée est de 60nm par minute.

- Développement MIBK/IPA
 - Immersion de l'échantillon dans une solution de MIBK/IPA (1 :3)
 - Vitesse d'attaque : v=200nm/min
 - Rinçage immédiat par de l'IPA pur
 - Séchage et stockage sous azote

- Développement IPA+ ultrasons
 - Immersion de l'échantillon dans une solution d'IPA pur et agitation sous ultrasons
 - Vitesse d'attaque : v=60nm/min
 - Rinçage immédiat par de l'Eau désionisée
 - Séchage et stockage sous azote

Lift-Off et choix des matériaux métalliques

Il s'agit de la dernière étape de fabrication qui consiste à déposer le matériau métallique constituant les électrodes dans les ouvertures faites dans le PMMA. L'épaisseur maximale de métal déposé est bien sûr en étroite relation avec les facteurs de formes

des structures dans la résine et les paramètres d'insolation. Le choix de la technique de dépôt s'est orienté non pas vers l'évaporation mais vers une technique dite de sputtering basée sur l'érosion d'une cible métallique (sur un équipement PECS Gatan). Outre la facilité d'utilisation de cet équipement (faibles temps de pompage, simplicité d'utilisation), sa polyvalence avec un grand nombre de matériaux, cette technique nous a permis de réaliser des dépôts d'Or sans avoir recours à une couche d'accroche. En effet, l'énergie conférée aux atomes arrachés à la cible permet d'accroître l'adhérence du film sur la surface de silice.

Il s'agit là d'un avantage majeur pour la réalisation des structures présentées car un contact direct entre la couche d'Or des structures de contact et les électrodes est possible sans couche intermédiaire de type Titane ou Chrome. Ces deux métaux s'oxydent très rapidement et augmentent considérablement la résistance de contact entre les deux dépôts. Des tests sur des dépôts effectués par évaporation de couches Ti/Au (10nm/50nm) sur des structures de contacts Ti/Au (50nm/150nm) nous ont permis de mettre en évidence une évolution de la résistance de la jonction de quelques dizaines d'Ohms à quelques dizaines de KOhms entre le moment de la fabrication des dispositifs et des mesures effectuées deux semaines plus tard.

- Dépôt du film métallique
 - Dépôt d'Or (99,999%) dans un bâti de pulvérisation par faisceau d'ion (PECS - GATAN) sous vide secondaire
 - Tension d'accélération des canons 4kV
 - Vitesse de dépôt $v=0.04\text{nm/s}$
- Lift-Off
 - Immersion de l'échantillon dans une solution de trichloroéthylène chaud ($T=60^{\circ}\text{C}$) sous agitation par ultrasons
 - Rinçages successifs au Trichloroéthylène, Acétone et à l'Eau désionisée
 - Séchage et stockage sous azote

2.4 Etude des paramètres de fabrication des nano électrodes

Dans ce paragraphe, nous allons nous consacrer à l'étude des différents paramètres fondamentaux qui influencent la fabrication de nano-électrodes agencées sous la forme de réseaux denses et présentant des pas de l'ordre de la centaine de nanomètres. Les structures les plus denses obtenues après lift-off qui ont été reportées dans la littérature ont été réalisées sur l'équipement disponible au LAAS. Elles sont caractérisées par des réseaux de lignes de 20nm de large au pas de 40nm [33]. Même si ces résultats confirment a priori la faisabilité des structures, la réalisation de dispositifs utilisables nécessite la prise en compte de deux paramètres supplémentaires. Dans notre cas, les réseaux d'électrodes ne devront présenter que très peu de défauts pour pouvoir être exploitables. Leur réalisation devra donc s'accompagner d'une mise au point précise des paramètres d'insolation et de l'étude de la latitude disponible pour leur fabrication. Par ailleurs, la prise en compte de la reproductibilité est essentielle compte tenu des contraintes de rendement imposée par le microscope. La mise au point d'un protocole fiable et

reproductible est donc un critère essentiel.

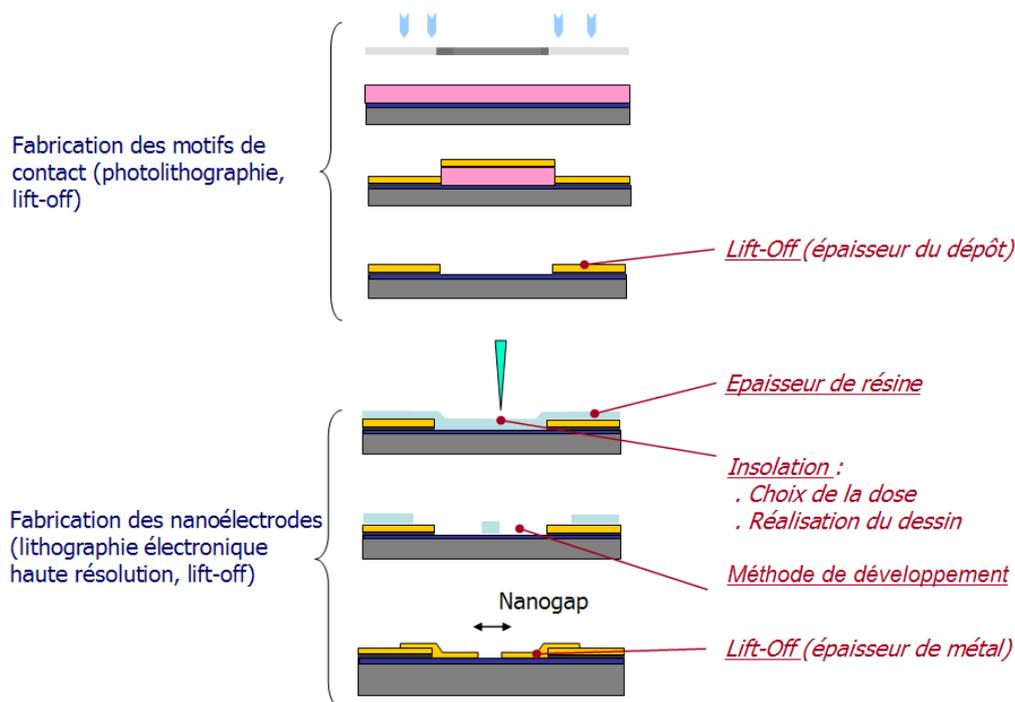


FIG. 2.8 – Description schématique des principales étapes de fabrication des nanoélectrodes et des principaux paramètres de leur réalisation

Les paramètres du protocole de fabrication auxquels nous allons nous attacher sont illustrés sur la figure 2.8. Ils concernent essentiellement les effets dus à la dose d'insolation, aux effets de proximité qui sont particulièrement présents du fait de la densité des structures que nous recherchons, et enfin à l'étape de développement qui permet de transférer les structures insolées à partir de l'image latente créée dans la résine. Tous ces paramètres vont conditionner la dernière étape de fabrication des dispositifs : le lift-off. Cette étape de transfert est particulièrement sensible aux profils et à la topologie des structures générées dans la résine. Aussi, chacun des paramètres cités sera étudié indépendamment en fonction de son influence directe sur cette dernière étape de lift-off. Une dernière partie de synthèse nous permettra de dégager les valeurs des paramètres qui nous sont apparues comme optimales.

2.4.1 Préparation des dessins des structures

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre d'introduction, notre stratégie de détection est basée sur l'utilisation de dispositifs de type nanoélectrodes présentant d'une part des espaces inter-électrodes de faible dimension ($< 100\text{nm}$) et d'autre part des surfaces d'interaction élevées. Dans ce contexte, nous avons choisi de développer deux types de structures.

La première architecture est constituée de deux réseaux enchevêtrés de nanoélectrodes (Cf Figure 2.9). Ces nanoélectrodes interdigitées présentent l'avantage de com-

biner des faibles espaces entre les électrodes tout en offrant une surface d'interaction très importante. Les zones larges correspondant aux armatures de contact sont représentées sous la forme de polygones dont la surface sera balayée pendant l'insolation. La dose d'insolation de ces structures a été fixée pour l'ensemble de nos réalisations à $2000\mu C/cm^2$. Les nanoélectrodes, par contre, sont représentées sous la forme de lignes et seront insolées en effectuant un seul passage du faisceau d'électron. La dose caractéristique des nanoélectrodes sera donc exprimée en unité de charge par unité de longueur (ici en nC/cm).

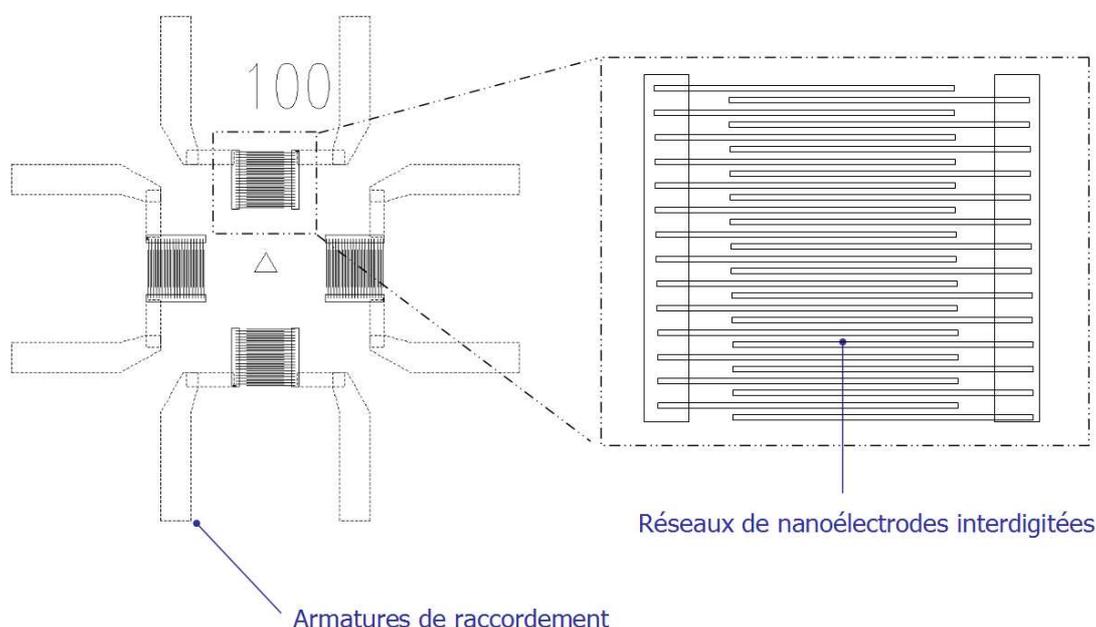


FIG. 2.9 – Dessin réalisés sous DesignCad LT pour l'insolation de réseaux de nanoélectrodes interdigitées. Dans chaque champ de $40 \times 40 \mu m^2$ sont insolés 4 réseaux d'électrodes reliés aux structures de connexion par des armatures métalliques (image de gauche). Chaque réseau d'électrodes (image de droite) est constitué de deux réseaux de lignes imbriquées au pas de 100nm pour cet exemple.

La deuxième approche que nous avons étudiée est basée sur un dispositif à trois électrodes. Comme nous le verrons dans la section 2.4.3.2, le nombre réduit d'électrodes permet de limiter les effets de proximité lors de l'insolation et par conséquent de réduire les dimensions des espaces entre électrodes. La figure 2.10 nous donne un aperçu du dessin réalisé pour l'insolation de ces structures.

Cette structure n'a été utilisée que rarement dans nos expériences. Elle présente toutefois l'avantage de pouvoir adresser des nano-objets de plus faibles dimensions (jusqu'à 15nm) tout en présentant des longueurs d'interaction entre électrodes de plusieurs centaines de nanomètres. Ces nanoélectrodes sont elles aussi insolées en un seul passage du faisceau d'électrons et ont donc été codées par des lignes.

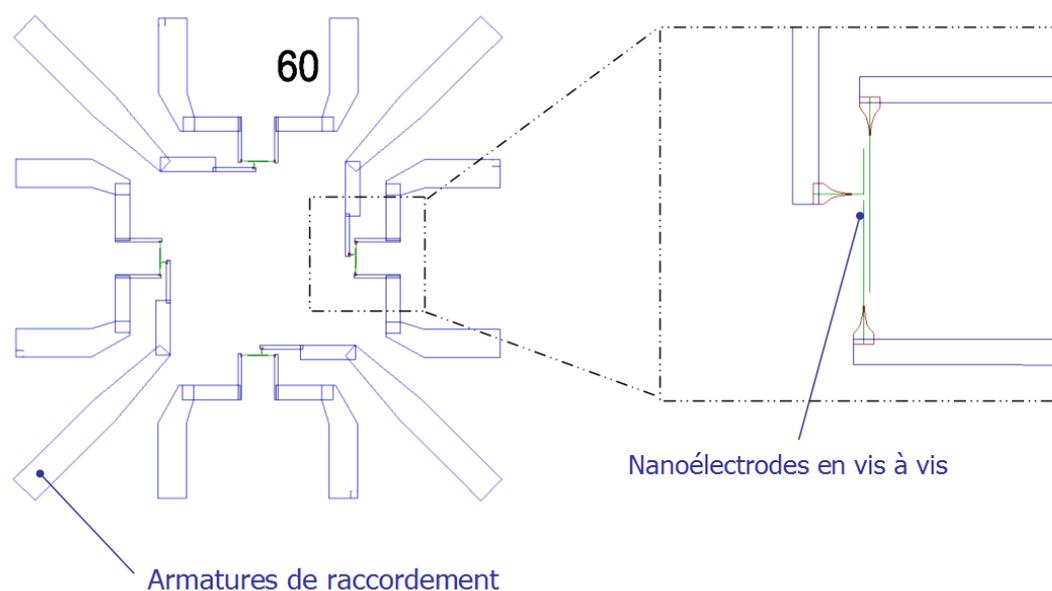


FIG. 2.10 – Dessins réalisés sous DesignCad LT pour l'insolation de réseaux de dispositifs à trois électrodes. Les structures de connexion (à gauche) permettent d'adresser de façon indépendante chacune des trois nanoélectrodes (à droite) (L'espacement entre chaque électrode est ici codé à 60nm).

2.4.2 Choix de l'épaisseur de résine

Comme nous l'avons mentionné au début de ce chapitre, pour des tensions d'accélération des électrons de 200kV, l'épaisseur de résine n'a que très peu d'influence sur la répartition de l'énergie lors de l'insolation. En effet, l'utilisation de hautes tensions d'accélération limite considérablement les phénomènes de diffusion du faisceau incident et nous pouvons donc considérer que la répartition de l'énergie dans la résine est identique dans toute l'épaisseur. Ce paramètre ne modifie donc pas les doses nécessaires pour le développement des structures. Toutefois, la topologie des structures de résines influence considérablement les étapes de transfert. En effet, leur réalisation est basée sur l'exploitation des forts contrastes de topographie induits par les structures de résines sur la surface. Dans le cas particulier du lift-off, la hauteur des structures doit être suffisamment élevée pour permettre un transfert fidèle des structures sans toutefois dépasser les facteurs de formes maximaux tolérés par la résine. Il s'agit donc de trouver un compromis entre ces deux facteurs antagonistes.

2.4.2.1 Influence sur tenue mécanique des structures révélées

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de ce paragraphe, les limites des facteurs de formes accessibles pour les structures révélées et insolées dépendent en premier lieu des caractéristiques mécaniques de la résine. La rigidité et la résistance mécanique de celle-ci doivent permettre la stabilité des structures révélées. Comme nous pouvons l'observer sur le schéma de la figure 2.11, les structures que nous cherchons à transférer, qu'il s'agisse de réseaux d'électrodes ou de dispositifs à trois électrodes en

parallèle, sont constitués de "murs" de résine de quelques dizaines de nanomètres de large et de plusieurs centaines de nanomètres de long (correspondant à l'espace inter-électrodes des dispositifs).

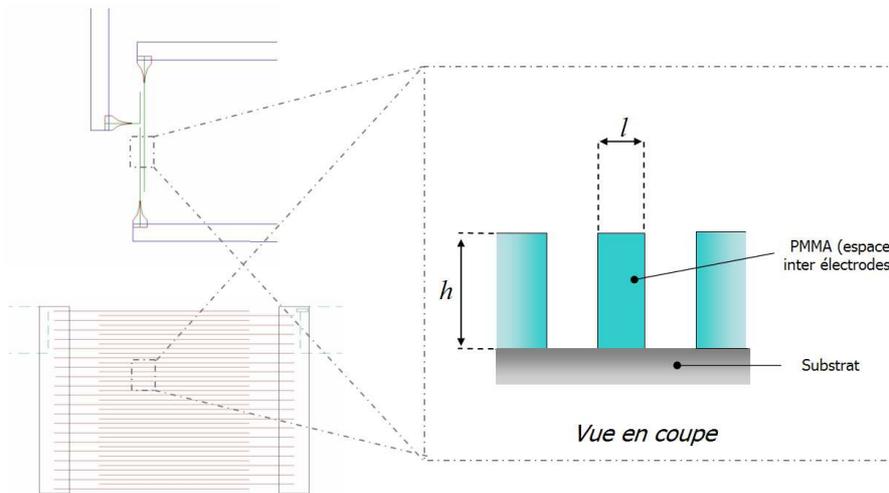


FIG. 2.11 – Illustration de l'influence de l'épaisseur de résine sur les facteurs de formes des structures générées dans la résine pour la fabrication des nanoélectrodes

Dans le cas de ces dispositifs, seules les extrémités des structures sont reliées et donc soutenues par la couche de résine. Aussi, si la hauteur de résine h devient trop importante par rapport à leur largeur l , les limites de résistance du matériau peuvent être dépassées provoquant un "effondrement" des structures.

Cet effet est illustré dans la figure 2.12 dans le cas de deux réseaux d'électrodes au pas de 80nm réalisées dans 140nm de PMMA et obtenus pour deux doses d'insolation de 6 et 12nC/cm.

L'image 2.12(b) nous montre un exemple de structure parfaitement transférée. L'augmentation de la dose d'insolation conduit à un élargissement des électrodes et donc à une diminution de l'espace inter-électrodes. Ainsi, nous pouvons observer, sur l'image 2.12(d), de nombreuses discontinuités sur les électrodes métalliques. Ces discontinuités découlent du phénomène que nous venons de décrire à savoir un effondrement des structures dans les zones où le soutien de la couche de résine est le plus faible. L'appariement des murs de résine deux à deux se traduit par la présence d'une électrode métallique sur deux dans le réseau. Par contre, les extrémités des électrodes sont, les structures de résine étant soutenues par les régions non insolées ce qui évite leur effondrement. Ces zones nous permettent d'évaluer la largeur de l'espace inter-électrodes et d'estimer la largeur l de la structure de PMMA initialement présente. Nous avons pu estimer $l \simeq 20\text{nm}$ soit un facteur de forme $h/l \simeq 6,5$.

Une autre illustration de ce phénomène est donnée dans la figure 2.13 qui illustre deux exemples de réalisation de dispositifs à trois électrodes distantes de 60nm de centre à centre. Ces structures ont été obtenues pour la même dose d'insolation (6nC/cm) après insolation dans deux épaisseurs de PMMA différentes : 100 et 140nm.

Comme dans le cas précédent, nous voyons que pour une même largeur d'électrode, l'augmentation de la hauteur de résine a conduit à un effondrement des structures avant

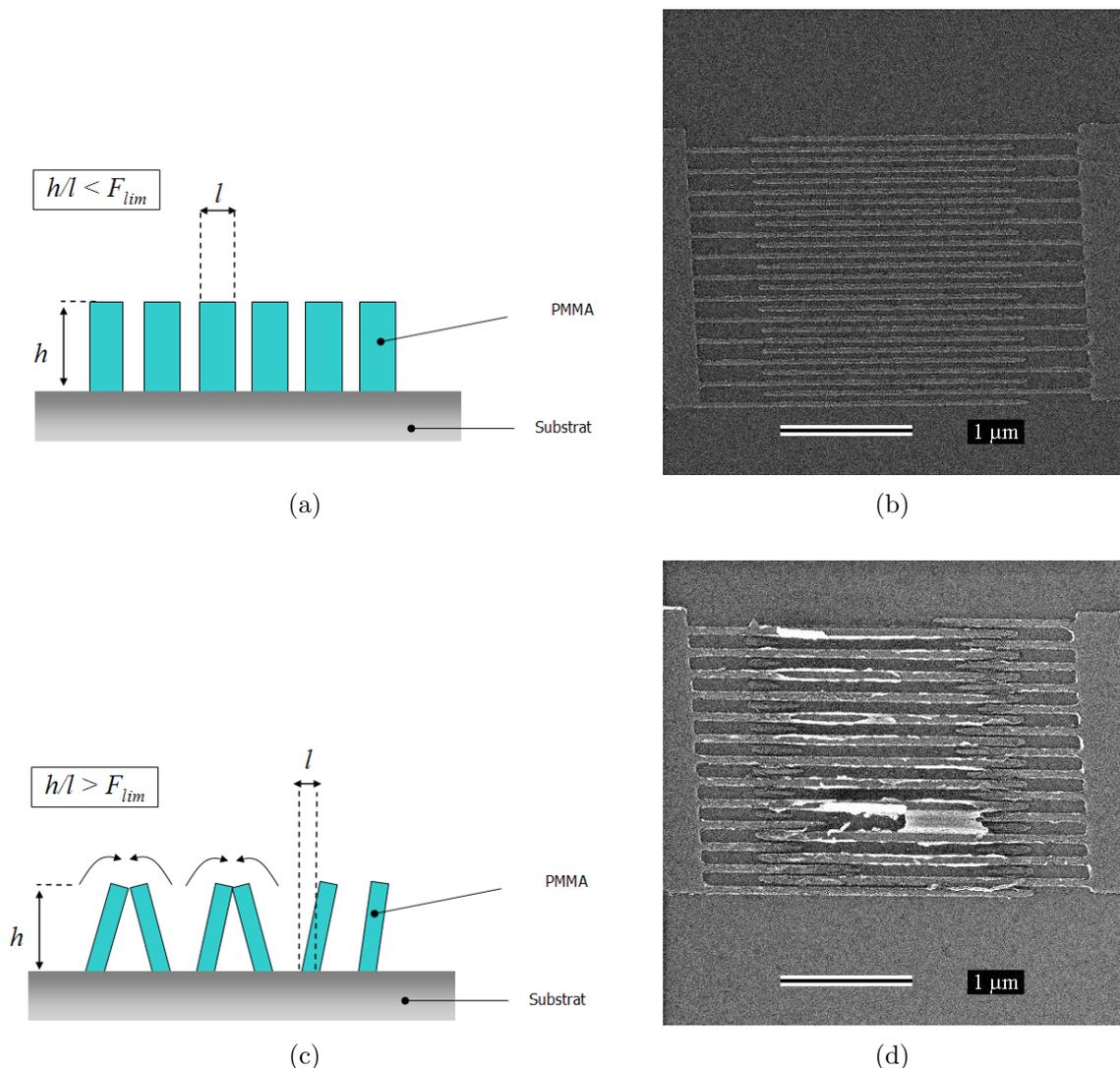


FIG. 2.12 – Illustration de l'influence des facteurs de formes des structures. Les structures présentées ont été obtenues dans une couche de PMMA de 140nm d'épaisseur après développement dans une solution de MIBK/IPA(1 :3) pendant $1\text{ min }30\text{s}$ et lift-off. Les doses utilisées sont de 6nC/cm dans le cas (b) et de 14nC/cm dans le cas (d)

le lift-off. Nous pouvons évaluer le facteur de forme correspondant : nous trouvons $l \simeq 16\text{nm}$ et une valeur de $h/l \simeq 6,25$.

Une étude systématique des résultats obtenus pour des nanoélectrodes interdigitées et des dispositifs à trois électrodes nous a permis de définir un facteur de forme limite $F_{lim} = h/l$, au delà duquel l'effondrement des structures de résine après développement empêche la réalisation des motifs. Cette valeur limite, pour nos conditions de développement (MIBK/IPA 1 : 3 sans ultra-sons), se situe autour de $F_{lim} = 6$.

L'étude du comportement mécanique de la résine nous permet donc de déterminer un premier critère quant à la limite supérieure de l'épaisseur de résine utilisable pour la réalisation de nos dispositifs.

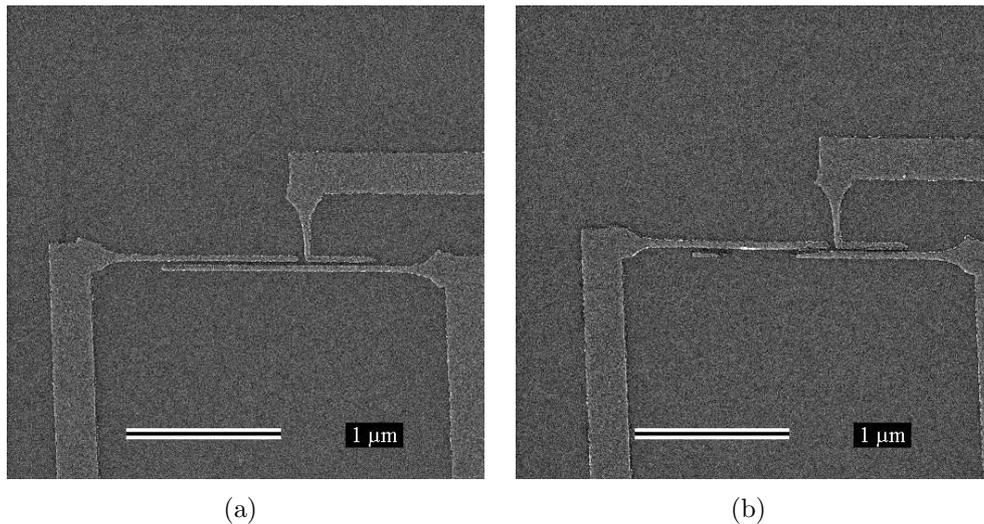


FIG. 2.13 – Illustration de l'influence de l'épaisseur de résine. Les deux structures ont été insolées avec une dose de $8nC/cm$. Dans le cas (a) l'épaisseur de résine est de $100nm$ et de $140nm$ dans le cas (b).

2.4.2.2 Influence sur le lift-off

L'obtention des électrodes métalliques repose sur l'étape de lift-off qui est illustrée en figure 2.14. Le dépôt métallique doit être emporté par la dissolution de la résine hormis dans les zones insolées où il est contact direct avec le substrat. Un problème se pose cependant au niveau des "interfaces" entre les zones insolées et les zones intactes de la résine. En effet, les méthodes de dépôt métallique conduisent dans certaines conditions à l'obtention d'un film métallique continu sur l'ensemble de l'échantillon y compris sur les flancs de motifs révélés. C'est le cas de la méthode utilisée pour la réalisation de nos dispositifs (Cf. Paragraphe 2.3.1.2) pour laquelle la proximité de la cible ne permet pas d'obtenir un dépôt directionnel et provoque donc une métallisation des flancs des motifs.

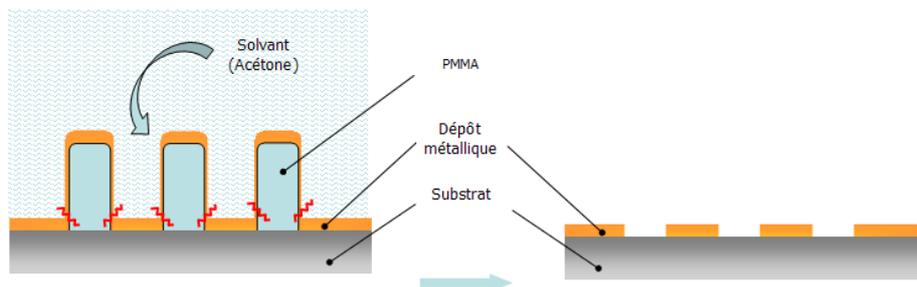


FIG. 2.14 – Illustration de la technique de lift-off. Un dépôt métallique est effectué après révélation des structures insolées. La dissolution de la résine permet de retirer les zones métallisées de l'échantillon qui ne sont pas en contact avec le substrat et ainsi de transférer les motifs insolés.

Lors de la dissolution de la résine, il sera donc nécessaire de rompre le film métallique

présent sur le flanc des motifs pour pouvoir effectuer le transfert des structures révélées. La résistance du film à la rupture est en grande partie contrôlée par son épaisseur qui dépend d'une part de l'épaisseur globale déposée mais aussi de l'épaisseur de la couche de résine. Comme l'illustre la figure 2.15, l'épaisseur de métal sur les flancs sera d'autant plus faible que la hauteur de résine est importante. Nous voyons donc clairement que la hauteur de résine est un paramètre clef de la réalisation du lift-off. Nous verrons au paragraphe 2.4.3.2 que le profil des structures révélées joue également un rôle important. Les effets de proximité particulièrement importants dans nos structures provoquent généralement un arrondissement des structures et donc un épaissement de l'épaisseur de métal déposée sur le flancs. Une hauteur de résine importante permettra, ici aussi, de minimiser cette épaisseur et donc de faciliter le lift-off.

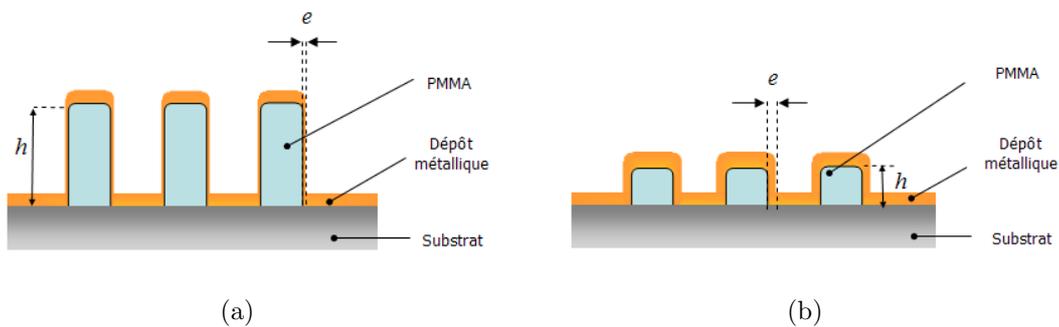


FIG. 2.15 – Illustration de l'influence des facteurs de forme des structures révélées sur la réalisation du lift-off. L'augmentation de ce facteur de forme permet de diminuer l'épaisseur de métal présent sur les flancs des structures et donc de favoriser le lift-off.

La première conclusion de cette analyse nous indique donc que l'utilisation d'une hauteur de résine la plus grande possible semble la plus favorable. Il est communément admis que les conditions les plus favorables de lift-off sont atteintes lorsque l'épaisseur de résine est 3 fois supérieure à l'épaisseur de métal. Toutefois, il nous sera encore nécessaire de trouver un compromis pour le choix de la hauteur de résine. Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, la tenue mécanique de la résine qui limite les facteurs de forme des structures révélées, définira la limite supérieure de l'épaisseur de résine.

La figure 2.16 donne deux exemples de réseaux d'électrodes interdigitées au pas de 100nm réalisés pour deux épaisseurs de PMMA différentes : 50nm (a) et 130nm (b). Les deux structures ont été insolées en utilisant le même dessin et la même dose ($7\text{nC}/\text{cm}$). L'étape de lift-off a été effectuée après un dépôt de 20nm d'Or et dissolution de la résine pendant 10 minutes dans une solution d'acétone sous ultrasons.

L'apport d'énergie permet de rompre plus facilement le film métallique sans endommager les électrodes métalliques. Toutefois, nous voyons dans le cas (a) que pour des épaisseurs de résines trop faibles, l'étape de lift-off reste impossible en raison des dépôts métalliques sur les flancs des structures de résines. Les zones claires présentes sur le réseau d'électrodes confirment la présence d'un film métallique continu sur les structures. Sur les larges surfaces non insolées situées autour du réseau, le film métallique a par contre été retiré pendant le lift-off. Nous voyons donc que la densité des réseaux influence la réalisation du lift-off. En effet, lorsque la distance entre les structures devient trop faible, le film métallique présente de nombreux points d'ancrage sur la surface

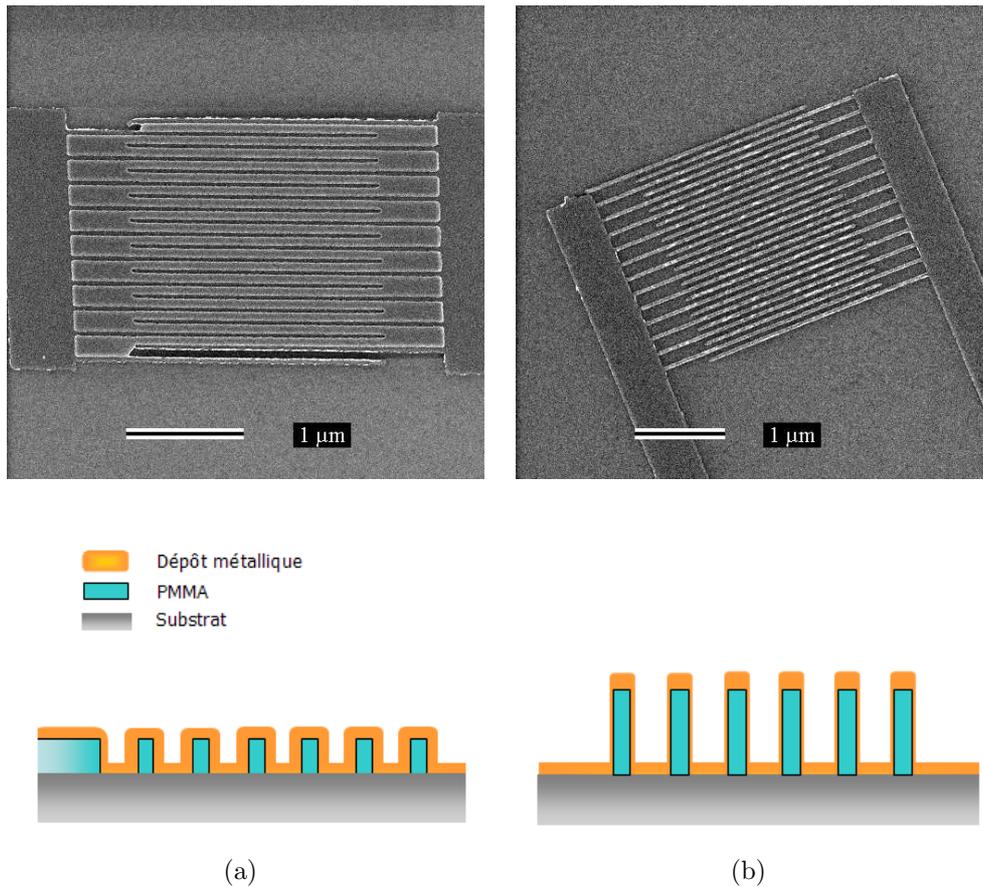


FIG. 2.16 – Influence de l'épaisseur de résine sur la réalisation du lift-off pour des électrodes inter-digitées au pas de 100nm insolées avec une dose de $7nC/cm$. Une épaisseur de résine de 50nm (a) est insuffisante pour la réalisation du lift off. L'utilisation d'une épaisseur de 130nm (b) permet de diminuer l'épaisseur de résine présente sur les flancs des structures et réaliser le lift-off.

(au niveau de chaque électrode) et est suffisamment épais pour résister au lift-off. La résistance du film peut être d'ailleurs être illustrée par l'observation des bords des structures. Les images MEB font apparaître des fragments du film métallique initialement présent sur les flancs des structures. Dans le cas (b), obtenu pour une hauteur de résine de 140nm, nous voyons que le réseau d'électrodes a pu être transféré et que le dépôt métallique à été complètement retiré des zones non-insolées. Nous voyons également que les irrégularités présentes sur les bords des structures sont beaucoup moins importantes.

2.4.2.3 Synthèse

Suivant le type de structure réalisée, l'épaisseur de la couche de PMMA doit être ajustée de façon à trouver le meilleur compromis entre la tenue mécanique de la résine (faibles facteurs de forme) et une épaisseur de résine suffisamment élevée qui favorisera le lift-off. Bien que ces deux paramètres sont étroitement dépendants des dimensions des structures et des paramètres de l'insolation, il nous est tout de même possible de donner un ordre de grandeur des hauteurs les plus favorables. Dans le cas des réseaux

d'électrodes interdigitées au pas de 80 et 100nm, une épaisseur de résine comprise entre 100 et 130 nm semble offrir le meilleur compromis. Dans le cas plus particulier des dispositifs à trois électrodes, qui présentent des espaces inter-électrodes plus faibles, une hauteur de 140nm conduit à l'effondrement des structures et nous avons donc retenu la valeur de 100nm pour leur fabrication.

2.4.3 Effets de proximité

Les structures que nous cherchons à réaliser sont caractérisées par des réseaux très denses d'électrodes qui vont nécessiter la prise en compte de phénomènes dits de proximité. Ces effets sont liés à la délocalisation spatiale du dépôt d'énergie des électrons dans la résine consécutive aux multiples événements de diffusion des électrons primaires et secondaires. Ainsi, chaque structure insolée influence les structures adjacentes et l'obtention de nanostructures en réseau dense s'avère beaucoup plus complexe que dans le cas de structures isolées.

2.4.3.1 Généralités

Notions de sensibilité et de contraste

Nous avons décrit dans les premiers paragraphes de ce chapitre les mécanismes conduisant à la formation, dans la résine, d'une image latente liée aux modifications chimiques engendrées par le bombardement des électrons. La révélation de cette image latente est obtenue en dissolvant les zones du polymères insolées. Plus exactement, il s'agit de mettre à profit la différence de vitesse de dissolution de la résine en fonction du poids moléculaire des chaînes qui la constitue pour dissoudre sélectivement les zones insolées et conserver les zones non insolées. Nous savons par ailleurs que les modifications du poids moléculaire des chaînes lors de l'insolation peuvent être liées à la dose d'insolation. Expérimentalement, il est possible de représenter une courbe dite de contraste de la résine qui relie les variations de l'épaisseur de la résine avant et après révélation et que nous noterons respectivement e_i et e_f , avec la dose d'insolation. Cette courbe est spécifique à la résine choisie ainsi qu'à son poids moléculaire et aux conditions de développement (agitation, température, nature du solvant). Un exemple de courbe illustrant le cas d'une résine positive (telle que le PMMA dans la gamme de dose utilisée) est donné dans la figure 2.17(a).

Pour une résine idéale, la notion de sensibilité correspondrait à la dose limite au delà de laquelle le polymère présente un poids moléculaire suffisamment faible pour être dissous. En dessous de cette valeur, au contraire, aucune révélation ne serait possible. Dans le cas de cette résine positive, D_o définit la dose seuil à partir de laquelle l'épaisseur finale de résine devient non mesurable. D_1 définit la dose seuil à partir de laquelle l'épaisseur finale de résine n'est pas significativement différente de la valeur initiale de l'épaisseur avant insolation.

Dans un système réel, la variation de la vitesse de révélation par rapport à la dose est une fonction continue. La notion seuil de sensibilité de la résine est déterminée à partir de la courbe et correspond à la dose offrant un rapport $e_f/e_i = 0.7$. Par exemple, dans le cas du PMMA, la dose minimale d'insolation pour un poids moléculaire initial de 996000 et une solution de révélation de MIBK/IPA(1 : 3), est de 4nC/cm. L'observation

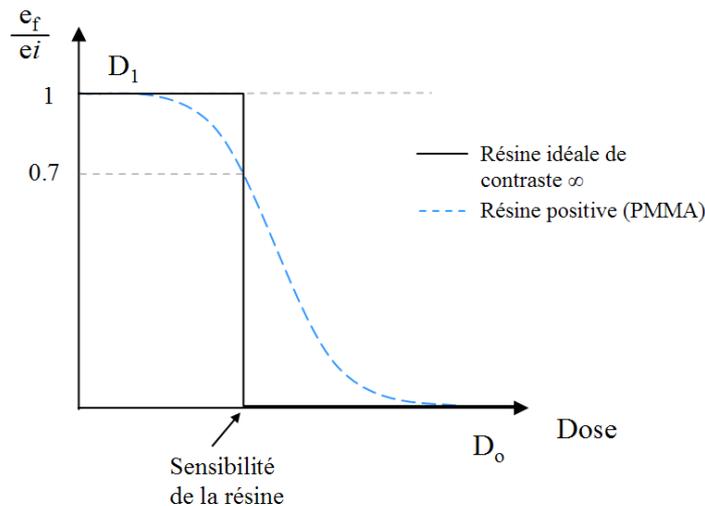


FIG. 2.17 – Courbe de variations relative de l'épaisseur de résine après développement e_f par rapport à l'épaisseur initiale e_i en fonction de la dose d'insolation. La valeur de la dose correspondant à un rapport $e_f/e_i=0.7$ définit le seuil de sensibilité de la résine. La raideur de la courbe traduit le contraste de la résine.

de cette courbe nous amène à définir la notion de contraste. Le contraste n'est pas une notion intrinsèque à la résine. Il reste lié à l'ensemble du procédé de fabrication et en particulier à la nature de la solution de développement. Le contraste de la résine γ définit la raideur de la courbe entre les doses D_0 et D_1 et s'exprime sous la forme :

$$\gamma = (\log(D_0) - \log(D_1))^{-1} \quad (2.5)$$

Aussi, plus le contraste est élevé, plus la résine aura de capacités à révéler des faibles écart de doses. En d'autre termes le contraste détermine donc la capacité de la résine à révéler de faibles écarts de poids moléculaire de résine. L'utilisation d'une résine à fort contraste est donc capitale dans le cas de nos réalisations. En effet, comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, la localisation spatiale de l'insolation et donc les variations du poids moléculaires dans la résine ne sont jamais abruptes. Des zones de transitions sont présentes au bords des zones insolées et vont influencer la définition des motifs et donc la résolution spatiale du procédé. Aussi, plus une résine présente un contraste élevé moins ces effets de bords auront un effet important sur la résolution des motifs.

Répartition de l'énergie dans la résine

La compréhension et l'optimisation de la résolution du procédé de lithographie repose en partie sur la connaissance de la répartition du poids moléculaire de la résine après insolation par le faisceau d'électron. Les électrons traversant la résine apportent l'énergie nécessaire aux multiples réactions conduisant aux scissions des macromolécules constituant la résine. La connaissance de la répartition de l'énergie dissipée dans la résine nous donne donc une image de la répartition du poids moléculaire. A ce jour de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude et la simulation des phénomènes de diffusion des électrons responsables de l'élargissement des zones insolées de la résine. Des simulations

basées sur la méthode Monte-Carlo permettent de décrire la répartition de l'énergie dissipée dans la résine. Toutefois, ces simulations, bien qu'elles permettent d'anticiper la localisation des modifications chimiques engendrées dans la résine, ne tiennent pas compte de l'influence des multiples paramètres technologiques tels que la révélation ou le lift-off. Aussi, nous nous attacherons à une description qualitative des phénomènes et nous privilégierons l'étude expérimentale de l'influence de chaque paramètre de fabrication sur la réalisation des dispositifs.

Nous avons mentionné en introduction que la taille de la sonde utilisable sur notre équipement est comprise entre 1 et 3nm. Une vision simpliste consisterait à considérer que lors de l'insolation, la résine est uniquement modifiée dans un volume orienté perpendiculairement à la surface et défini par la section du faisceau. Cette représentation est fautive et ne tient pas compte des effets liés à la diffusion des électrons et à la forme de la sonde. En effet, la zone de résine insolée n'est pas strictement localisée au volume de résine traversé par le faisceau d'électron. La largeur de la zone insolée dépend d'une part de la forme du faisceau d'électron et d'autre part des phénomènes de diffusion des électrons (diffusion du faisceau primaire, électrons rétrodiffusés, génération d'électrons secondaires)

Aussi, en un point donné d'insolation, la répartition de l'énergie dissipée dans le plan de l'échantillon ne peut être décrite par une fonction créneau. Une bonne approximation consiste à représenter cette répartition par une fonction résultante de deux autres fonctions de type Gaussienne l'une très localisée et de forte amplitude, décrivant la répartition des électrons secondaires générés par l'interaction de la sonde avec la résine et l'autre, plus étendue décrivant les phénomènes de diffusion des électrons rétrodiffusés [104, 105].

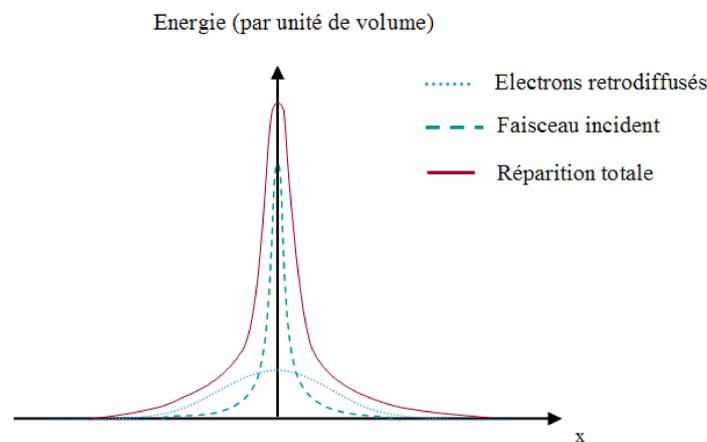


FIG. 2.18 – Courbe illustrant la répartition spatiale de l'énergie dissipée dans la résine à proximité du point d'impact du faisceau d'électrons.

La première conséquence d'une telle répartition de l'énergie est de générer dans la résine des gradients de poids moléculaires. Au niveau du point d'impact du faisceau, la courbe de répartition de l'énergie présente un maximum correspondant à un minima du poids moléculaire de la résine. Lorsque l'on s'éloigne du centre du point d'insolation, la répartition de l'énergie diminue continûment. Pour déterminer l'étendue de la zone qui sera révélée, cette courbe doit être comparée à la valeur de l'énergie correspondant au

seuil de révélation. Ce seuil correspond à la valeur limite du poids moléculaire permettant la révélation. Ainsi, comme l'illustre la figure 2.19 dans le cas de trois répartitions obtenues pour trois doses différentes, toutes les zones de la résine pour lesquelles l'apport d'énergie se situe en dessous de la valeur seuil ne disposeront pas d'un poids moléculaire assez faible pour être révélées. Inversement, au dessus de ce seuil, la révélation est possible.

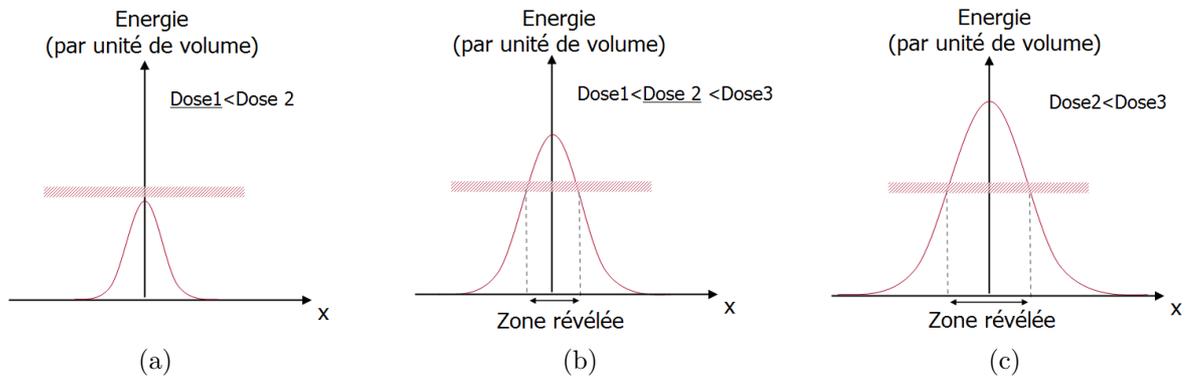


FIG. 2.19 – Illustration de la répartition de l'énergie dissipée dans la résine après insolation pour trois doses de valeurs croissantes. Les zones de la résine pour lesquelles l'énergie dépasse la valeur seuil seront révélées. Cas d'un motif sous dosé (a), correctement dosé (b), surdosé (c).

Il convient de distinguer les notions de dose et d'énergie dissipée dans la résine. La dose est une grandeur expérimentale, facilement mesurable, qui traduit le temps d'exposition nécessaire sous un courant de faisceau donné, pour révéler la zone de résine insolée. A chaque valeur de la dose correspond non pas une énergie mais une répartition de l'énergie dissipée dans la résine qui tient compte des effets de diffusion des électrons. A la différence de la dose, la répartition de l'énergie permet de donner une image des variations spatiales du poids moléculaire de la résine.

Dans le cas (a) la répartition de l'énergie ne permet pas de franchir le seuil de révélation. Dans le cas (b) obtenu pour une dose supérieure, la courbe de répartition présente, au niveau du point d'impact du faisceau, un maxima supérieur au seuil. La zone de résine correspondante présente donc un poids moléculaire suffisamment faible pour être dissoute par la solution de révélation. Enfin, dans le cas (c), l'augmentation de la dose provoque une translation de la courbe vers les hautes énergies qui s'accompagne d'une augmentation des dimensions de la zones insolée. Une augmentation de la dose s'accompagnera d'une augmentation des dimensions des structures après révélation. Toutefois, il convient de noter que le changement de comportement de la résine vis à vis de la solution de révélation n'est pas abrupt et reste étroitement lié au contraste de la résine. Ainsi, la description de la figure 2.19 est une simplification de la réalité pour laquelle nous avons supposé un développement en tout ou rien autour d'un poids moléculaire seuil.

Ainsi si nous considérons les influences cumulées de la révélation et de la répartition de la dose, nous voyons que la résolution du procédé ne peut être directement liée à la taille du faisceau d'électrons. Même si la taille du faisceau utilisable sur notre équipement est comprise entre 1 et 3nm, les dimensions minimales des motifs après

révélation sont voisines de 3 à 5nm [33]. Dans notre cas, la très faible taille de sonde et la forte énergie des électrons contribuent à minimiser ces phénomènes permettant par la même d'atteindre une résolution sub-10nm. Toutefois, comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, les contributions de ces phénomènes deviennent prépondérants lorsque la densité des motifs insolés augmentent.

Effets de proximité

L'insolation d'une ligne isolée conduit à une répartition spatiale de l'énergie dans la résine dont la principale contribution est due au faisceau primaire. La contribution des électrons rétrodiffusés reste inférieure à la sensibilité de la résine et influence faiblement la révélation. Si nous considérons maintenant l'insolation de structures denses telles que des réseaux de lignes en parallèle, nous ne pouvons plus considérer l'insolation et la révélation de chaque ligne de façon indépendante. En effet, dans le cas où l'espacement entre les différents motifs insolés est suffisamment faible, chaque structure insolée modifie la répartition spatiale de l'énergie des zones de la résine situées à proximité. Pour une méthode de révélation donnée, cet effet sera d'autant plus grand que la dose sera importante et que l'espacement entre les structures sera faible. Ces deux paramètres seront étudiés en détail dans le cas de nos structures dans le paragraphe suivant. L'influence de la méthode de révélation constituera également un paramètre important puisque de sa sensibilité et de son contraste dépendront la révélation de ces effets de proximité. Ce dernier paramètre sera étudié dans le dernier paragraphe de cette section.

Plaçons nous dans le cas de l'insolation d'un réseau de lignes parallèles tels que ceux présents dans un réseau d'électrodes interdigitées. La figure 2.20 nous donne un aperçu de la répartition de l'énergie dissipée suivant une direction perpendiculaire aux lignes dans le cas de trois réseaux de lignes insolés en utilisant la même dose mais codés à des pas différents. La répartition globale de l'énergie s'obtient en sommant les contributions de chaque ligne insolée.

Comparons la répartition globale de l'énergie par rapport aux contributions individuelles de chaque ligne insolée. Lorsque le recouvrement des courbes d'énergie est faible, la répartition respecte globalement les niveaux d'énergie obtenus individuellement pour chaque ligne insolée (cas a). Dans ce cas, l'image latente des lignes sera donc révélée de façon sélective des espaces inter-lignes et ce en utilisant les mêmes paramètres de doses que dans le cas d'une ligne individuelle. Si l'on diminue progressivement le pas du réseau, les effets de proximité contribuent à augmenter le niveau général d'énergie déposée, en particulier dans l'espace situé entre les lignes du réseau (cas (b)). Par ailleurs, nous voyons que la répartition autour du point d'insolation s'élargit. Les conséquences de ces effets sur la révélation des motifs sont doubles. D'une part ils conduisent à un élargissement des lignes révélées. D'autre part, les variations d'énergie entre les zones insolées et les espaces inter-lignes sont moins importantes. Ainsi, la diminution du gradient de poids moléculaire sur les bords des structures limitera la résolution de la fabrication.

Dans le dernier cas, si le pas devient trop faible, l'énergie déposée dépasse en tout point la valeur seuil et il ne sera alors plus possible de distinguer les structures insolées après révélation.

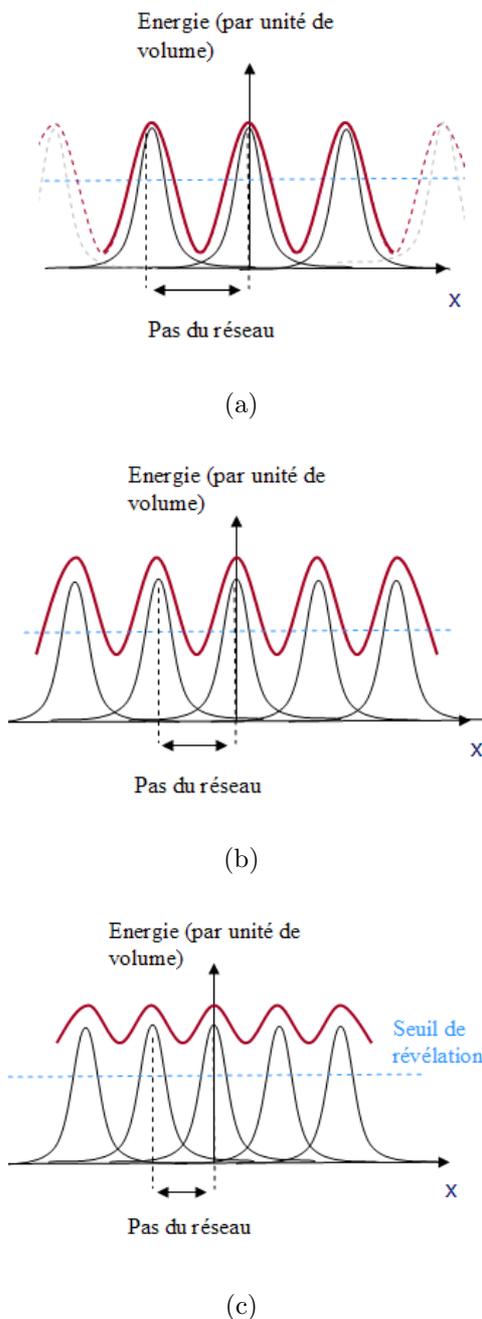


FIG. 2.20 – Illustration de la répartition de l'énergie dissipée dans la résine après insolation d'un réseaux d'électrodes pour trois valeurs croissantes de pas. Les effets liés à la proximité des motifs conduisent à une augmentation de la valeur de l'énergie déposée dans la résine principalement visible dans les espaces inter-électrodes.

2.4.3.2 Influence de la dose et des effets de proximité

Comme nous l'avons vu précédemment, les effets de proximité perturbent considérablement la répartition de l'énergie déposée dans la résine. Ces effets affectent d'une part la dimension des structures mais également la forme des flancs de résine. Il sera donc nécessaire d'adapter les dimensions et les doses d'insolation pour permettre l'obtention de

dispositifs dont les espaces inter-electrodes correspondent à nos exigences. Par ailleurs, la morphologie des structures générées dans la résine influence considérablement la réalisation du lift-off (Cf. paragraphe 2.16). Aussi nous nous attacherons à déterminer les conditions permettant de limiter l'influence des effets de proximité pour favoriser cette étape.

Influence sur les dimensions des électrodes

La mise au point des paramètres d'insolation d'un réseau d'électrodes, en vue de l'obtention d'un espace inter-électrode donné, peut être réalisée en suivant deux approches. La première consiste à utiliser une dose d'insolation déterminée pour des structures isolées et à minimiser les effets de proximité en jouant sur le pas du réseau insolé. Toutefois, les effets de proximité contribuent eux-mêmes à modifier les profils d'énergie dissipée et un réajustement de la dose est généralement indispensable. Nous avons donc préféré fixer des valeurs de pas à 80, 100, et 200nm pour les réseaux d'électrodes et 60nm pour les dispositifs à trois électrodes, en privilégiant l'optimisation de la dose en fonction des dimensions souhaitées.

L'étude que nous avons menée sur l'influence de la dose est illustrée au travers de l'exemple qui suit. La figure 2.21 regroupe trois images MEB de structures de test basées sur des réseaux d'électrodes interdigitées au pas de 100nm pour lesquelles les électrodes ont été insolées suivant trois doses différentes : 7nC/cm (a), 12nC/cm (b), et 16nC/cm (c).

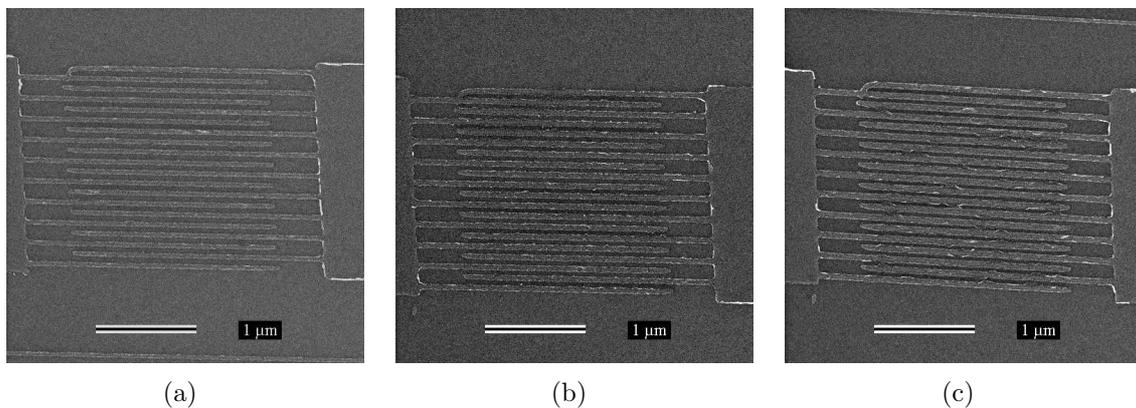


FIG. 2.21 – Exemples de réseaux d'électrodes interdigitées au pas de 100nm obtenus par insolation dans une couche de PMMA (996000) de 100nm d'épaisseur après développement dans une solution de MIBK/IPA (1 : 3), dépôt d'une couche de 20nm d'Or et lift-off. Les doses utilisées pour l'insolation des lignes sont de 6nC/cm (a), 12nC/cm (b) et 16nC/cm (c). Dans les trois cas la dose utilisée pour l'insolation des armatures des électrodes est de 2000 μ C/cm².

Ces trois images nous permettent d'illustrer les phénomènes que nous venons de présenter dans le paragraphe précédent. Nous voyons en effet que l'augmentation de dose se traduit par une augmentation de la largeur des électrodes et donc une diminution de l'espace inter-électrode. L'augmentation des effets de proximité qui en découle engendre une diminution des valeurs des gradients de poids moléculaire de la résine au niveau des bords des structures insolées. La principale répercussion de ces effets concerne la

morphologie des motifs révélés qui présentent des flancs arrondis moins propices au lift-off. Nous pouvons ainsi observer sur les images que l'augmentation de la dose d'insolation s'accompagne d'une amplification des irrégularités du film métallique présentes sur les bords des structures. Les effets cumulés de la diminution des espaces inter-électrodes et de ces défauts engendrent pour des doses élevées une connexion des électrodes en vis à vis et donc une mise en court-circuit du dispositif.

Les études menées dans le cas de chaque dispositif nous ont permis de tracer les courbes décrivant la variation de la largeur de l'espace inter-électrode en fonction de la dose d'insolation (Cf Figure 2.22). Ces dispositifs ont été obtenus par insolation dans une couche de PMMA (996000) de 140nm d'épaisseur de réseaux au pas de 100nm et de réseaux au pas de 80nm, après développement dans une solution de MIBK/IPA (1 :3), dépôt d'une couche de 20nm d'Or et lift-off.

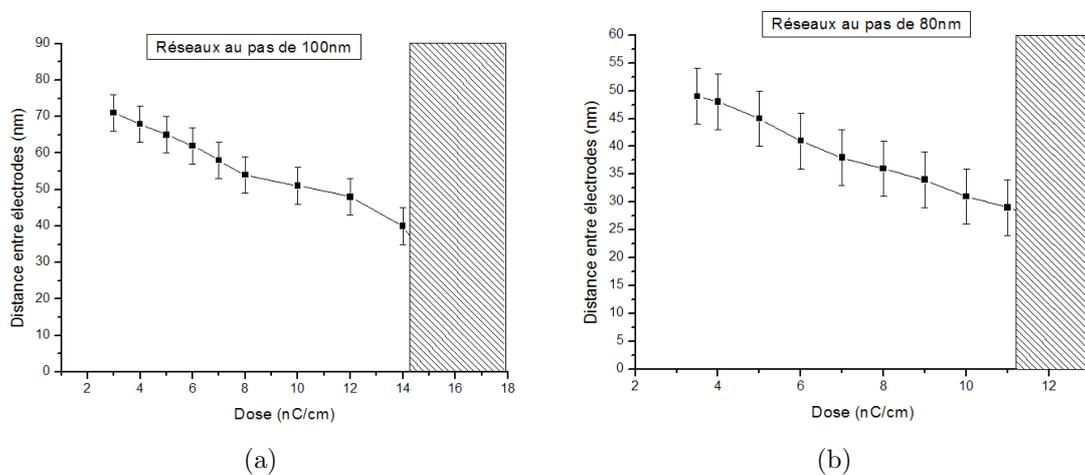


FIG. 2.22 – Courbes d'évolution de la valeur de l'espace inter-électrodes en fonction de la dose d'insolation pour des réseaux d'électrodes interdigitées aux pas de 100nm (a) et 80nm (b) obtenus par insolation dans une couche de PMMA (996000) de 140nm d'épaisseur après développement dans une solution de MIBK/IPA (1 : 3), dépôt d'une couche de 20nm d'Or et lift-off. Une dose d'insolation trop importante provoque l'apparition de court circuit entre les électrodes (zone grisée).

Dans le cas des réseaux d'électrodes au pas de 100nm, nous voyons que les plus petits espaces inter-électrodes accessibles sont de l'ordre de 40nm contre 30nm dans le cas du réseau au pas de 80nm. Au delà de ces valeurs, les nombreux résidus présents sur les bords des structures engendre des pontages entre électrodes et rendent les dispositifs inutilisables.

Des réseaux d'électrodes au pas de 200nm ont également été réalisés en utilisant une stratégie d'insolation particulière. En effet, si l'on considère un dispositif présentant un espace inter-électrodes de 100nm (la moitié du pas), la réalisation d'électrodes de 100nm de large reste très problématique si l'on considère une insolation en un seul passage. Les effets d'élargissement des lignes insolées nécessiteraient des doses colossales pour leur réalisation. Aussi les électrodes ont-elles été dessinées sous la forme de rectangle de 65nm et réalisées en balayant la surface définie par le dessin. C'est la raison pour laquelle la dose est exprimée maintenant en $\mu C/cm^2$. Les espaces inter-électrodes les plus faibles que nous avons pu atteindre sont de l'ordre de 65nm.

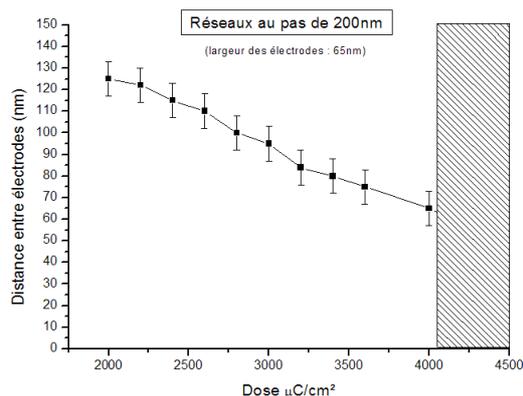


FIG. 2.23 – Courbe d'évolution de la valeur de l'espace inter-électrodes en fonction de la dose d'insolation pour un réseau d'électrodes interdigitées au pas de 200nm obtenus par insolation dans une couche de PMMA (996000) de 300nm d'épaisseur après développement dans une solution de MIBK/IPA (1 : 3), dépôt d'une couche de 20nm d'Or et lift-off.

Ces résultats confirment l'intérêt de définir les nanoélectrodes par un seul passage du faisceau d'électrons. Ce mode d'écriture minimise les effets de proximité et permet d'accéder à des distances inter-électrodes plus courtes.

La réalisation des réseaux d'électrodes au pas de 60nm reste, dans les limites du dessin proposé, très difficiles à accomplir de façon reproductible. (les effets de proximité rende leur réalisation délicate tant la fenêtre de doses utilisables est étroite. Aussi nous n'avons pas souhaité mentionner prendre en compte leur réalisation.

Enfin, dans le cas particulier des dispositifs à trois électrodes, les effets de proximité sont nettement réduits par rapport aux réseaux d'électrodes. C'est pourquoi nous n'avons pas pu mettre en évidence une modification significative de la distance interélectrode en fonction de la dose. La figure 2.24 rassemble trois images de dispositifs réalisées dans 100nm de PMMA(996000) après développement dans une solution de MIBK :IPA (1 :3) et dépôt d'une couche de 20nm d'Or et lift-off.

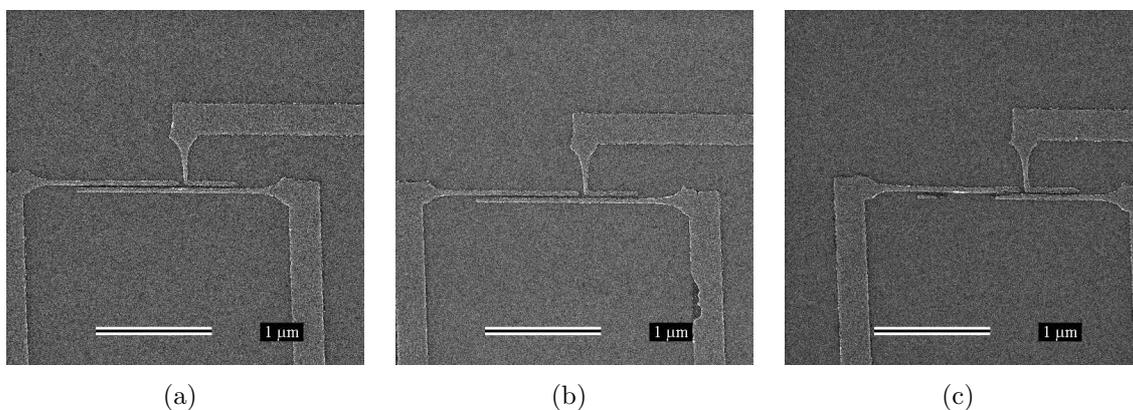


FIG. 2.24 – Exemples de réalisation de dispositifs à trois électrodes pour trois doses différentes $6\text{nC}/\text{cm}$ (a), $8\text{nC}/\text{cm}$ (b), $11\text{nC}/\text{cm}$ (c).

La dose ne semble pas modifier les dimensions du dispositif. Les largeurs des électrodes et de l'espace inter-électrodes semblent stables respectivement autour de 30 et 20nm. Toutefois nous voyons que pour des doses de 11nC/cm, nous retrouvons un phénomène identique à celui observé au paragraphe 2.4.2.1 qui témoigne d'un effondrement de la résine.

2.4.4 Choix de l'épaisseur et de la nature du métal déposé

Notre choix du métal pour la fabrication des électrodes s'est orienté vers l'Or. Il s'agit d'un matériau stable, bon conducteur autorisant des mesures en solution et non oxydable.

La limite inférieure de l'épaisseur du dépôt que nous avons choisi est de 10nm. En effet, en dessous de cette valeur, le dépôt d'Or obtenu dans le bâti de pulvérisation que nous avons utilisé (PECS - GATAN) génère des dépôts granulaires.

La limite supérieure de cette épaisseur dépend de plusieurs paramètres dont le choix est en grande partie influencé par le lift-off. Le premier de ces paramètres a été présenté dans le paragraphe 2.4.2.2. Nous avons vu qu'il était nécessaire d'adapter l'épaisseur de la résine de façon à obtenir des structures dont le facteur de forme pour favoriser le lift-off. Il est également possible de diminuer l'épaisseur de métal de façon à favoriser la rupture du film déposé lors du lift et ainsi que la présence de résidus sur les bords des électrodes. Toutefois, entre les deux épaisseurs de métal utilisées 10 et 20nm nous n'avons pu mettre en évidence d'influence majeure sur le lift-off dont la réalisation reste principalement conditionnée par l'épaisseur de résine. De façon à favoriser la conduction dans les électrodes nous avons utilisé une épaisseur de 20 nm pour la majorité de nos expériences.

Un dernier paramètre concerne les dimensions latérales des structures insolées. Comme nous l'avons vu précédemment, il convient d'adapter l'épaisseur de métal en fonction des structures dans lesquelles nous souhaitons effectuer le dépôt. En effet, si nous considérons le cas d'une structure insolée de faible dimension latérale, l'augmentation de l'épaisseur de dépôt métallique peut obturer l'ouverture initialement générée dans la résine. Il convient donc de choisir une épaisseur de métal toujours inférieure à la dimension des structures insolées.

2.4.5 Influence du procédé de développement

Dans la majorité de nos expériences, nous avons utilisé une solution de type MIBK/IPA aux proportions 1 :3 pour l'étape de révélation. Cette méthode de révélation est couramment utilisée pour la révélation de micro et de nano structures. Toutefois, dans le cas de structures denses, il a été démontré que l'utilisation d'une solution pure d'IPA en combinaison avec des ultrasons semble plus favorable à la révélation [33]. Cette méthode présente un seuil de révélation supérieur à la technique précédente mais offre surtout un meilleur contraste. Comme nous l'avons vu précédemment ce paramètre est particulièrement important dans le cadre de structures denses où les effets de proximité contribuent à diminuer les gradients de poids moléculaires entre les zones insolées et non insolées. Cette méthode de révélation modifie également les dimensions des structures. En effet, l'augmentation du seuil de révélation conduit, comme nous l'avons vu au paragraphe

2.4.3.1, à diminuer la largeur de la zone révélée et modifiera donc les dimensions latérales des électrodes.

Toutefois, nous n'avons pu mettre en évidence une influence notable de la méthode de révélation sur nos structures. La figure 2.25 nous permet de comparer deux dispositifs de types réseaux d'électrodes interdigitées au pas de 100nm obtenues suivant les mêmes paramètres d'insolation et de lift-off mais en utilisant les deux méthodes que nous venons de présenter.

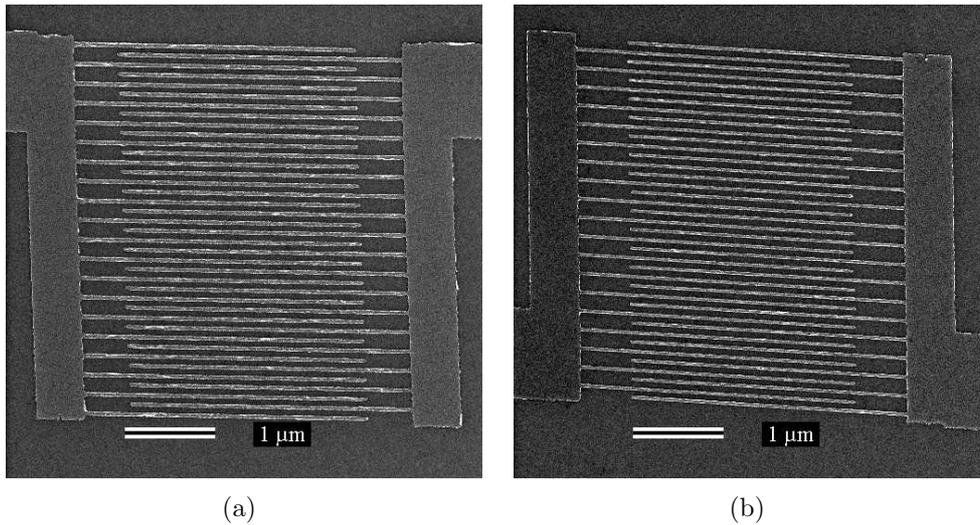


FIG. 2.25 – Images MEB de deux exemples de dispositifs de type réseaux d'électrodes interdigitées obtenus après insolation sous une dose de $7\text{nC}/\text{cm}$ dans une couche de PMMA(996000) de 140nm d'épaisseur, dépôt d'une couche d'Or de 20nm et lift-off. Dans le premier cas (a), le développement a été effectué dans une solution à 20°C de MIBK/IPA (1 : 3) pendant 42s et dans une solution d'IPA pur à 20°C sous d'ultrasons pendant 14s .

Remarque : Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, le temps de révélation, pour une méthode donnée dépend de la dose d'insolation. Dans notre cas, nous avons fixé les vitesses de révélation (à 20°C) à $200\text{ nm}/\text{min}$ pour la solution MIBK :IPA (1 :3) et $60\text{nm}/\text{min}$ pour la solution d'IPA sous ultrasons.

Dans cet exemple, nous voyons qu'il est difficile de mettre en avant la méthode de révélation basée sur l'IPA pur. La qualité du lift semble similaire sur les deux images. Seules les dimensions des espaces inter-électrodes ont été affectées par la révélation en passant de 55nm pour le dispositif présenté en (a) à 35nm pour le dispositif (b).

Dans l'ensemble de nos structures, les premiers tests que nous avons pu effectuer n'ont pas permis de mettre en évidence d'amélioration due à l'utilisation de la révélation par l'IPA sous ultrasons. Les résultats donnés par la première méthode de révélation sont déjà satisfaisants et il est donc difficile de noter toute amélioration. Toutefois il ne s'agit en aucun cas d'exclure cette méthode de révélation pour la fabrication d'électrodes en particulier pour des dispositifs présentant des espaces inter-électrodes plus faibles que ceux présentés. Premièrement les densités des structures auxquelles nous nous sommes intéressés ($\text{pas} \geq 80\text{nm}$) ne permettent pas de mettre en évidence l'amé-

lioration de contraste. D'autre part, nous n'avons pas effectué d'étude précise des paramètres d'insolation et de réalisation du lift-off pour cette méthode de révélation qui pourrait permettre d'augmenter la latitude du procédé.

2.4.6 Synthèse

La figure 2.26 propose une synthèse des paramètres optimaux et des caractéristiques dimensionnelles des dispositifs basés sur des réseaux d'électrodes présentés dans ce chapitre.

L'intérêt principal de ces structures réside dans les grandes surfaces ou les grandes longueurs d'interaction qu'elles proposent. Les longueurs équivalentes d'interaction que nous avons obtenues sont de l'ordre de 1mm pour les réseaux au pas de 200nm, $50\mu m$ pour les réseaux au pas de 100nm et $30\mu m$ pour les réseaux au pas de 80nm. Ces valeurs ne sont pas à prendre en compte en tant que limites maximales. Nous n'avons pas effectué d'étude précise quand à l'étendue des dispositifs et malgré les limitations imposées par les effets de proximité une augmentation du nombre d'électrodes pour chacune des structures pourrait être envisagée.

Rappelons que les doses mentionnées dans chaque cas de figure correspondent aux doses d'insolation des électrodes uniquement, insolées en mode ligne pour les réseaux au pas de 80 et 100nm et en mode balayage pour les réseaux au pas de 200nm. Les doses utilisées pour l'insolation des armatures de contact présentes de part et d'autre des réseaux a été fixée à $2000 \mu C/cm^2$ pour tous les échantillons.

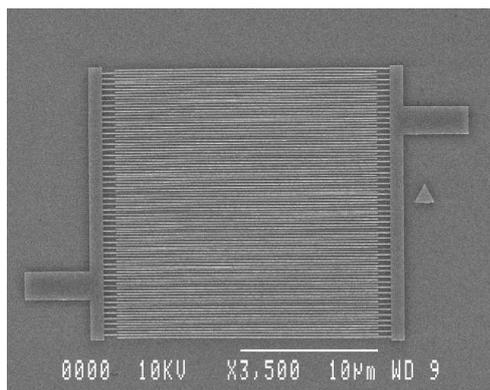
Jusqu'à présent nous n'avons pas pris en compte un paramètre capital lorsque l'on considère une méthode de structuration et surtout de nano-fabrication qui est la notion de reproductibilité et dans un cadre plus général de rendement.

Tout d'abord, les résultats qui ont été présentés précédemment doivent, pour être validés et exploitables, être suffisamment reproductibles. Pour évaluer cette reproductibilité, nous avons utilisé une méthode de comptage simple du nombre d'échantillons ayant fourni des dispositifs exploitables par rapport au nombre total d'échantillons produits dans ce but. Le terme échantillon représente ici chaque substrat de silicium de $4mm \times 4mm$ sur lequel nous avons réalisé le dispositif en question. La notion de rendement que nous avons utilisée tient donc compte de la stabilité dans le temps de l'ensemble des étapes de fabrication qui se sont échelonnées sur un an environ. Toutefois, ces résultats ne tiennent pas compte des erreurs de manipulation ou des dysfonctionnements des équipements. En utilisant les paramètres d'insolation mentionnés ci-dessus, ainsi que le protocole général présenté en début de chapitre pour la réalisation des dispositifs basés sur des réseaux d'électrodes, nous avons pu déterminer les rendements suivants (valeurs arrondies) :

- 90% pour les réseaux au pas de 200nm
- 83% pour les réseaux au pas de 100nm
- 66% pour les réseaux au pas de 80nm

En ce qui concerne la réalisation des dispositifs à trois électrodes les rendements observés sont plus difficiles à calculer vu le faible nombre total d'échantillons réalisés (<10).

Le dernier paramètre concerne les temps nécessaires d'une part aux insolutions et d'autre part consacrée au protocole complet de fabrication d'un dispositif. Les différentes



(a)

Période : 200nm

$65\text{nm} < \text{gap} < 125\text{nm}$

Dessin des électrodes : 65nm

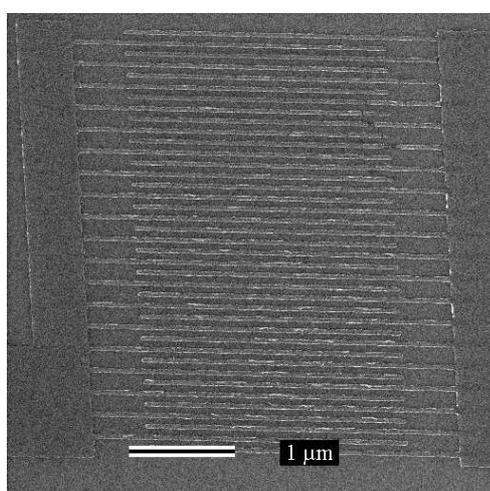
$1800\mu\text{C}/\text{cm}^2 > \text{dose} > 4000\mu\text{C}/\text{cm}^2$

$e_{\text{résine}} = 300\text{nm}$

$e_{\text{métal}} = 20\text{nm}$

Développement MIBK/IPA (1:3)

(200nm/min)



(b)

Période : 100nm

$40\text{nm} < \text{gap} < 71\text{nm}$

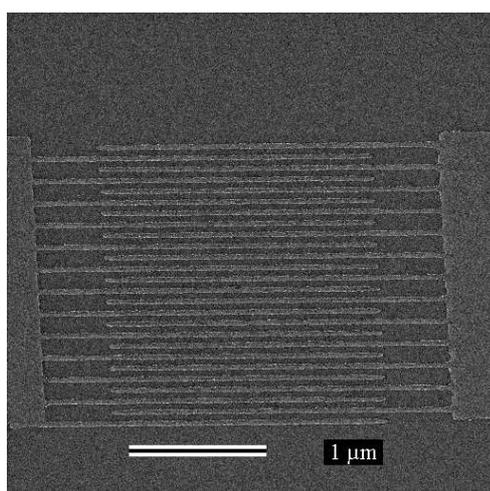
$4\text{nC}/\text{cm} > \text{dose} > 14\text{nC}/\text{cm}$

$e_{\text{résine}} = 140\text{nm}$

$e_{\text{métal}} = 20\text{nm}$

Développement MIBK/IPA (1:3)

(200nm/min)



(c)

Période : 80nm

$29\text{nm} < \text{gap} < 49\text{nm}$

$4\text{nC}/\text{cm} > \text{dose} > 11\text{nC}/\text{cm}$

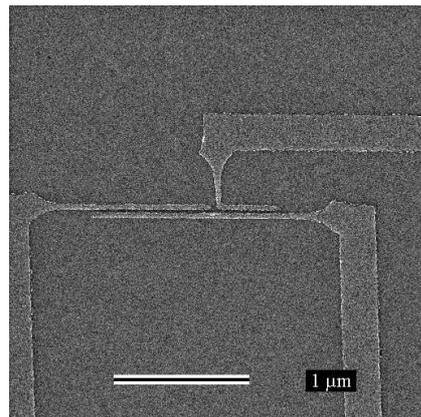
$e_{\text{résine}} = 100\text{nm}$

$e_{\text{métal}} = 20\text{nm}$

Développement MIBK/IPA (1:3)

(200nm/min)

FIG. 2.26 – Synthèse des paramètres de fabrication des réseaux d'électrodes interdigitées pour trois valeurs de pas de réseaux : 200nm, 100nm et 80nm.



Distance : 60nm (centre à centre)

gap \approx 20nm

4nC/cm > dose > 9nC/cm

$e_{\text{résine}} = 100\text{nm}$

$e_{\text{métal}} = 20\text{nm}$

Développement MIBK/IPA (1:3)

(200nm/min)

FIG. 2.27 – Paramètres de fabrication des dispositifs à trois électrodes insulées avec un espacement de 60nm.

étapes de fabrication permettent de traiter simultanément plusieurs échantillons et le protocole complet de fabrication peut être mené en une journée. Cependant, bien que les durées des insulations restent généralement inférieures à 10 minutes, le temps consacré aux réglages du microscope ainsi qu'aux étapes d'alignement ramène la durée moyenne d'une étape de lithographie à 1 heure pour la production d'un seul échantillon. La présence de l'utilisateur est indispensable durant cette période. Nous voyons que la production des échantillons est particulièrement contraignante et particulièrement lente sur cet appareil.

La figure 2.28 présente une vue agrandie de 2 échantillons typiques représentatifs des dispositifs que nous avons fabriqués.

Les nanoélectrodes de 40nm de large au pas de 80 nm constituant les réseaux interdigités présentent des morphologies parfaites. Les bords sont lisses, exempts de tout résidu métallique et la surface de la silice entre les électrodes est propre. Les trois nanoélectrodes sont séparées par des espaces de 15nm. Là encore, la qualité des structures métalliques est bonne.

2.5 Caractérisation électrique des dispositifs vierges

De façon générale, tous les dispositifs qui ont été utilisés pour des mesures électriques ont été testés, au préalable, au début de chaque protocole de façon à vérifier l'absence de tout court-circuit ou fuite de courant.

La figure 2.29 présente un exemple de caractéristique $I(V)$ obtenue sur un dispositif de type réseau d'électrodes interdigitées au pas de 100nm.

Nous voyons que les niveaux de courants, même pour des tensions de polarisation de 2V reste inférieurs à 20fA ce qui témoigne d'une part de la qualité des structures après lift-off et de la propreté de l'état de surface.

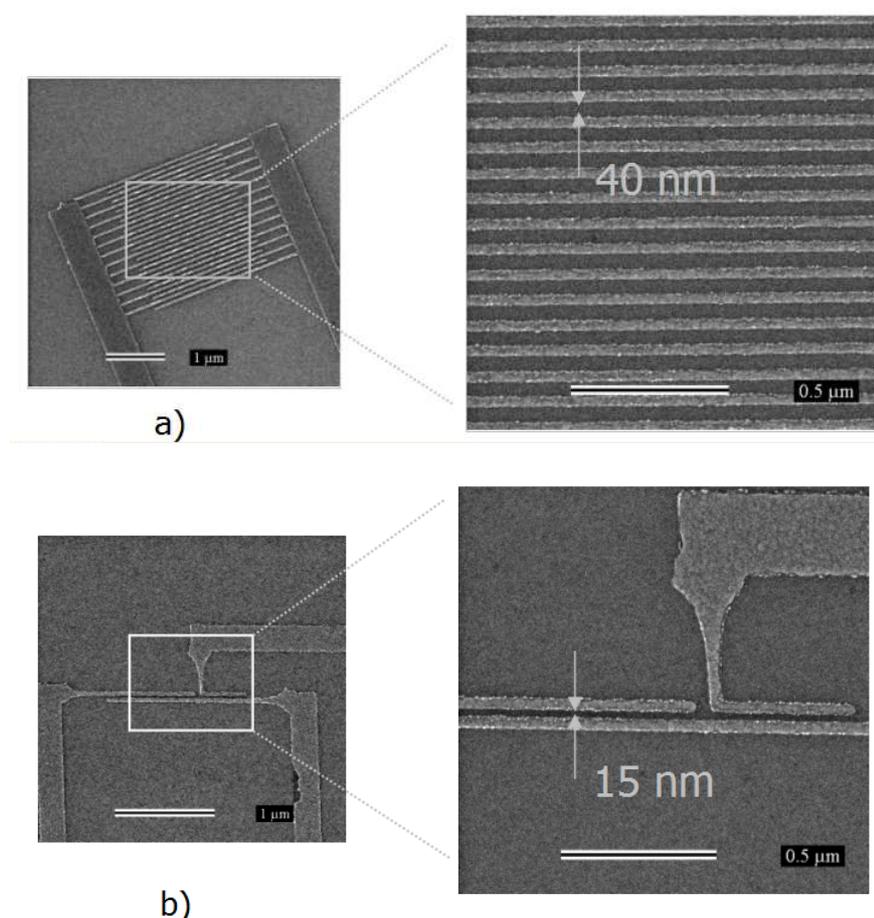


FIG. 2.28 – Images MEB de deux dispositifs représentatifs : (a) un réseau d'électrodes interdigitées au pas de 80nm et (b) un dispositif à trois électrodes séparées par des gaps de 15nm.

2.6 Conclusion

Dans les expériences présentées dans ce chapitre nous avons démontré la réalisation de dispositifs basés sur des nanoélectrodes combinant à la fois de faibles espaces inter-électrodes (jusqu'à 20nm) et des surfaces d'interaction élevées. Les nanojonctions fabriquées présentent des longueurs déployées pouvant atteindre plusieurs centaines de microns. Nous avons pu mettre au point un procédé de fabrication robuste et reproductible qui est indispensable pour leur utilisation et la mise au point d'un procédé de biodétection.

Toutefois, ce procédé de fabrication présente de nombreuses contraintes et limitations qui le rendent peu adapté à une production de masse.

Premièrement, le moyen de lithographie utilisé reste d'une part contraignant (problèmes de déformation des champs, mise au point manuelle, taille des échantillons limitée,...), coûteux et enfin limité en ce qui concerne son rendement. La technique de lithographie par faisceau d'électrons reste une technique de choix pour la réalisation de structures de test mais la recherche de solutions alternatives de lithographie est désor-

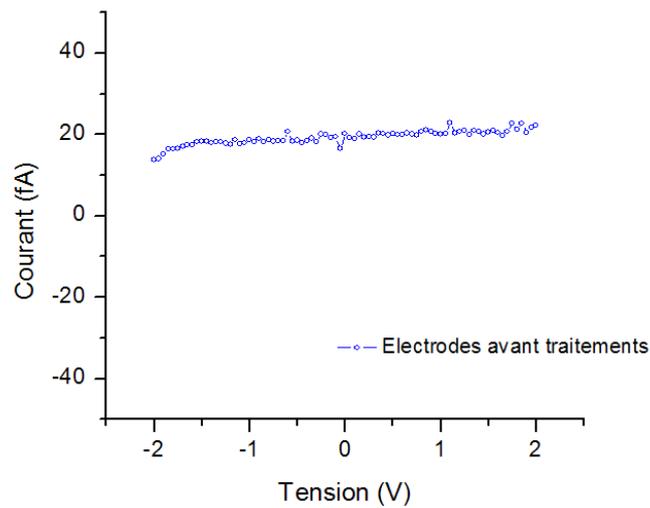


FIG. 2.29 – Exemple de caractéristique caractéristique $I(V)$ observée sur une dispositif vierge de type réseau d'électrodes inter-digitées (largeur = 35nm, pas = 100nm, épaisseur = 20nm)

mais un enjeu important.

La mise au point d'un procédé de Nano-impression qui permettrait de dupliquer à bas coût et rapidement ces nanoélectrodes constitue une perspective intéressante à ce travail. Ce procédé, une fois fiabilisé, permettrait de réaliser, en laboratoire, des études systématiques sur la réponse électrique de ces dispositifs et d'entrevoir un possible transfert de cette technologie vers le secteur applicatif. J'ai également travaillé au cours de ma thèse aux premiers essais dans cette direction. Le résumé de ces travaux sur la NanoImpression a été reporté en annexe D.3 afin de ne pas alourdir le manuscrit principal.

Chapitre 3

Détection électrique de nanoparticules métalliques

Sommaire

3.1	Introduction	91
3.2	Principe de l'expérience	91
3.2.1	Rappel du schéma général	91
3.2.2	Principe de l'expérience	93
3.2.2.1	Objectif	93
3.2.2.2	Dépôt de nanoparticules par interaction électrostatique	93
3.3	Immobilisation de nanoparticules par interaction électrostatique	94
3.3.1	Généralités	94
3.3.2	Nanoparticules d'Or en solution	94
3.3.3	Préparation de la surface	95
3.3.3.1	Traitement de la surface par greffage de silane amine	95
3.3.3.2	Sélectivité du greffage	98
3.3.3.3	Épaisseur et homogénéité du dépôt	98
3.3.4	Dépôt des nanoparticules d'Or	98
3.3.5	Résultats expérimentaux	99
3.3.5.1	Densité du dépôt	99
3.3.5.2	Sélectivité du dépôt	100
3.3.5.3	Homogénéité du dépôt	102
3.3.5.4	Influence de la polarisation	102
3.3.5.5	"Résistance" du dépôt	103
3.4	Étude du dépôt de nanoparticules sur des électrodes interdigitées	103
3.4.1	Description du dispositif de détection	103
3.4.2	Influence de la morphologie des électrodes sur le dépôt	105
3.4.2.1	Homogénéité du dépôt	105
3.4.2.2	Synthèse	109
3.5	Interprétation de la localisation du dépôt	110
3.5.1	Nature des interactions	111
3.5.2	Interactions électrostatiques et de Van der Waals	112
3.5.2.1	Introduction	112
3.5.2.2	Principe du modèle DLVO	113
3.5.3	Méthode de calcul	113
3.5.4	Interactions d'origine électrostatique	115
3.5.4.1	Description du système	115
3.5.4.2	Contribution des interactions électrostatiques	116
3.5.4.3	Variations du potentiel électrostatique	117
3.5.4.4	Variation de l'énergie d'interaction dû aux forces électrostatiques	118
3.5.5	Forces de Van der Waals	120
3.5.5.1	Contribution des forces de Van der Waals	120
3.5.5.2	Variation de l'énergie d'interaction au voisinage de la surface	121
3.5.6	Synthèse	121

3.6	Caractérisations électriques des dispositifs	122
3.6.1	Objectifs	122
3.6.2	Évolution de la conductance au cours du protocole de dépôt	123
3.6.3	Interprétation du transport électrique	125
3.6.3.1	Origine de la conduction	125
3.6.3.2	Linéarité	126
3.6.3.3	Nature du contact	128
3.6.3.4	Interprétation du transport électrique	129
3.6.4	Détection d'une particule unique en solution	131
3.6.4.1	Dispositif utilisé	131
3.6.4.2	Protocole expérimental	132
3.6.4.3	Résultats expérimentaux	133
3.6.4.4	Sensibilité du schéma de détection	136
3.6.4.5	Perspectives	137
3.7	Conclusion et perspectives	139

3.1 Introduction

Ce chapitre est dédié à la validation du schéma de détection proposé en introduction. Les expériences qui vont être discutées ont pour but essentiel de démontrer la compatibilité des dispositifs présentés au Chapitre 2 avec la détection électrique de nanoparticules métalliques. Elles constituent une première étape de test avant l'application du procédé pour la détection d'interaction entre biomolécules.

Pour ces premières expériences, nous allons utiliser un procédé simple et reproductible de dépôt de nanoparticules d'Or basé sur des interactions électrostatiques entre particules et substrat. Celui-ci va nous permettre de contrôler l'évolution des dispositifs au cours des différents traitements et d'identifier clairement l'origine des variations de conductivité éventuelles.

Les toutes premières questions concernent la conformation du dépôt sur les électrodes. Nous verrons dans ce chapitre que les nanoparticules en solution sont très sensibles à la nature et à la structuration de la surface et qu'il est possible d'utiliser directement les modifications de relief engendrées par les nanoélectrodes pour favoriser le pontages de ces dernières. Une interprétation de ces phénomènes sera proposée à partir du modèle DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek).

Une large partie de ce chapitre sera ensuite dédiée aux caractérisations électriques des dispositifs après dépôt des nanoparticules. Les questions concernent naturellement les modifications engendrées par les nanoparticules. Observe-t-on une variation de conductivité? Quelle est son amplitude? Peut-on donner une interprétation claire de l'origine du signal et du transport électrique?

Enfin, nous essaierons de dégager les caractéristiques essentielles des dispositifs pour des applications de détection. Nous argumenterons notre discussion autour de l'évolution de la réponse électrique des dispositifs au cours du dépôt de particules et nous essaierons de répondre aux questions suivantes : Quelle est la sensibilité ultime des dispositifs? Est-il possible d'obtenir une réponse quantitative c'est-à-dire corrélée à la densité de particules présentes sur la surface?

3.2 Principe de l'expérience

3.2.1 Rappel du schéma général

Rappelons brièvement le principe de détection que nous avons proposé au chapitre 1. Notre objectif est d'utiliser les dispositifs développés dans le chapitre précédent, en particulier les réseaux de nanoélectrodes interdigitées, pour la détection de nanoparticules métalliques. Les premières caractérisations des dispositifs "vierges" ont déjà été présentées et nous serviront de courbes de référence.

Notre approche repose sur le greffage d'une molécule "sonde" dans l'espace inter-électrodes de nos dispositifs (Cf. Figure 3.1). Une solution de nanoparticules métalliques fonctionnalisées avec des molécules cibles est alors mise en contact avec les électrodes. Si les sondes s'associent avec les cibles, la réaction de reconnaissance conduit au greffage des particules. Considérons le cas où cette réaction a lieu dans l'espace inter-électrodes : en adaptant les dimensions des électrodes vis à vis du diamètre des particules il devrait être possible d'obtenir un pontage des électrodes. Dans ce cas, nous devrions être en

mesure de détecter leur présence sur la surface en mesurant la variation de conductance induite par le pontage.

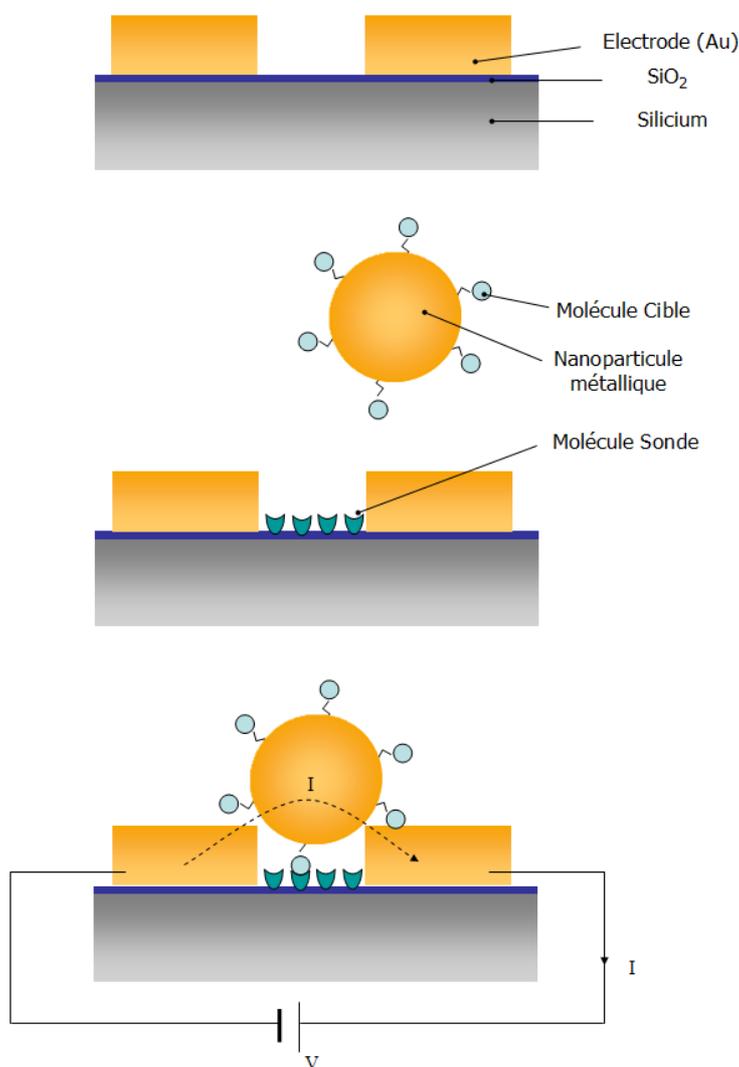


FIG. 3.1 – Description schématique de la stratégie de détection de nanoparticules métalliques déposées sur un réseau de nanoélectrodes interdigitées.

Rappelons un des points fondamentaux de notre approche concernant l'adaptation des dimensions des électrodes en fonction des dimensions des nanoparticules. En effet, nous avons choisi un espace inter-électrodes plus petit que le diamètre des particules. Cette condition contraint les particules à entrer en contact avec deux électrodes en vis à vis. Ainsi chaque particule est susceptible de conduire à une variation de conductivité de l'ensemble du dispositif. Sur le principe, la détection d'une particule individuelle paraît donc envisageable.

3.2.2 Principe de l'expérience

3.2.2.1 Objectif

Nous avons souhaité mettre en place un protocole de test simple, mettant en jeu une adsorption directe et robuste des nanoparticules sur la surface des dispositifs. Pour cela, nous allons utiliser une molécule organique présentant une terminaison amine en tant que sonde. En solution, cette molécule nous permet d'obtenir une charge positive sur l'ensemble du dispositif. Des nanoparticules d'Or fonctionnalisées présentant une charge de surface opposée pourront alors être greffées sur la surface par interaction électrostatique (Cf Figure 3.1).

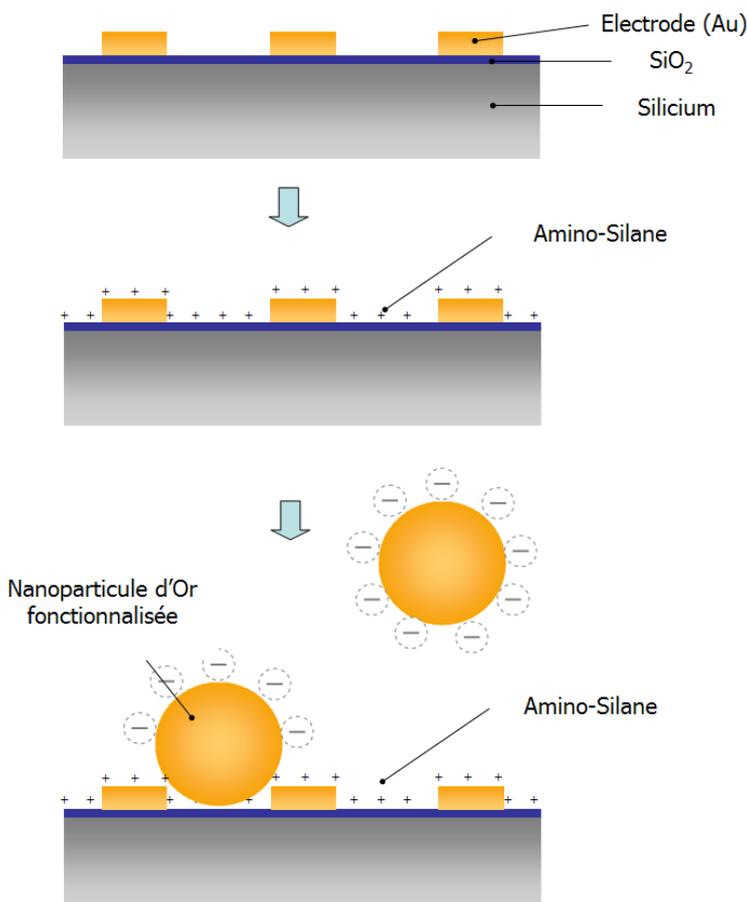


FIG. 3.2 – Description schématique de la stratégie de détection de nanoparticules métalliques déposées sur un réseaux de nanoélectrodes interdigitées.

3.2.2.2 Dépôt de nanoparticules par interaction électrostatique

Pour nos premières expériences de validation, nous avons souhaité utiliser un protocole de dépôt simple, reproductible et compatible avec les matériaux utilisés pour la réalisation des nanoélectrodes.

A ce jour, de nombreux protocoles d'immobilisation de nanoparticules sur une surface ont été mis au point. Ils permettent de nombreuses combinaisons de matériaux

entre nanoparticules et substrats (verre, carbone, métaux, ...)[71]. Les principes de l'immobilisation font généralement intervenir soit des interactions de type électrostatiques soit des interactions plus fortes, basées sur une reconnaissance moléculaire (ADN, biotine/avidine,...) ou sur l'établissement de liaisons covalentes entre le substrat et les particules.

Le dépôt de nanoparticules sur des surfaces de silice est désormais bien documenté. Il repose en règle générale sur la fonctionnalisation de la surface par des molécules de type alkoxy-silanes ou chlorosilanes. [71, 106, 107, 108] comportant un groupement terminal dédié à l'accroche de la nanoparticule. Par exemple, un groupement de type thiol permet de greffer façon covalente une particule d'Or. Nous avons opté pour un dépôt par interaction électrostatique. Une méthode largement utilisée repose sur l'utilisation d'un alkoxy-silane de type amine adsorbé sur le substrat pour greffer des particules chargées.

Nous reviendrons en détails sur les méthodes de greffage faisant intervenir des interactions entre biomolécules dans le chapitre suivant.

3.3 Immobilisation de nanoparticules par interaction électrostatique

3.3.1 Généralités

Dans les expériences que nous allons décrire, les nanoparticules métalliques seront déposées à partir de solutions colloïdales. Une définition des systèmes colloïdaux est donnée par J.M. Di Meglio [109] : *"On entend en général par colloïdes une dispersion de particules solides de taille sub-micronique dans un solvant... Par extrapolation, on peut considérer que les colloïdes sont des dispersions de taille sub-micronique sans que celles-ci soient forcément solides et résident dans un liquide."* Pour pouvoir obtenir et conserver une solution colloïdale, il faut éviter toute agrégation des particules sous l'effet des forces de Van der Waals qui, même si elles sont de courte portée pour des molécules isolées, deviennent prépondérantes dans l'interactions entre colloïdes. Plusieurs solutions permettent d'opposer ses forces d'attractions à des forces de dispersion : il peut s'agir de couches protectrices déposées sur la surface des colloïdes (tensioactifs, polymères adsorbés ou greffés,...) ou bien d'une protection par répulsion électrostatique entre colloïdes chargés. Dans tous les cas, une attention particulière sera attachée à ne pas provoquer de floculation ou de coagulation (Cf. Annexes A.2.1.2) de la solution. Ces effets peuvent être observés lors de modifications de pH, ou de concentration.

3.3.2 Nanoparticules d'Or en solution

Le dépôt a été obtenu à partir d'une solution colloïdale aqueuse de nanoparticules d'Or (concentration : 5.6×10^9 particules/mL) fonctionnalisées en surface par des groupements citrates composés de trois groupements de type acide carboxyliques COOH (EM.GC100 - British Biocell International). Ces particules sont généralement synthétisées par réduction en milieu aqueux de $H[AuCl_4]$ par du citrate de sodium. Le diamètre des particules est étroitement dépendant des concentrations des réactifs utilisés et peut

être contrôlé [110]. Les groupements citrate greffés à l'issue de la réaction présentent deux intérêts majeurs pour nos applications. En effet, pour des solutions de pH supérieur au pK_A du couple $RCCO^-/RCOOH$ qui est de l'ordre de $pK_A = 4 \sim 5$, les groupements se trouvent sous leur forme basique $RCOO^-$. Ils confèrent ainsi aux particules une charge de surface négative. D'une part, cette charge va permettre d'engendrer des forces répulsives entre particules qui vont stabiliser la solution colloïdale et éviter toute floculation ou coagulation. D'autre part, nous pouvons mettre à profit cette charge surfacique pour favoriser le dépôt et l'adhésion de ces particules sur la surface de nos dispositifs. En effet, en fonctionnalisant la surface de façon similaire, avec des groupements chargés positivement, nous pouvons utiliser les interactions électrostatiques existant entre la surface et les particules en solution [111, 112, 113].

Une représentation de ces groupements est donnée dans la figure 3.3.

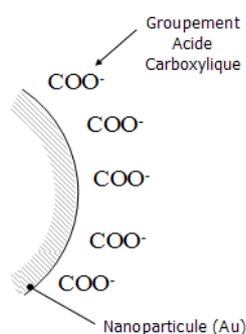


FIG. 3.3 – Représentation simplifiée des groupements acide-carboxylique portés par les groupements "citrate" greffés sur la surface des nanoparticules d'Or

Nous n'avons pas obtenu d'informations précises sur la solution colloïdale que nous avons employée, en particulier en ce qui concerne la densité et la nature des groupements citrate greffés à la surface des particules ainsi que la nature exacte du solvant utilisé (Il s'agit a priori d'une solution aqueuse dont nous avons pu estimer le pH à 7).

3.3.3 Préparation de la surface

3.3.3.1 Traitement de la surface par greffage de silane amine

Pour permettre l'immobilisation des nanoparticules chargées sur une surface de silice, nous avons procédé à une fonctionnalisation de la surface avec une molécule de type silane amine : le 3-aminopropyltriméthoxysilane ou APTMS (ABCR). Cette molécule est représentée sur le schéma 3.4. En solution, pour des pH inférieurs au pK_a du couple RNH_3/RNH_3^+ ($pK_a \simeq 10-11$), la fonction amine se trouve sous sa forme RNH_3^+ et confère à la surface une charge positive. Sans cette fonctionnalisation, le dépôt de nanoparticules chargées sur une surface de silicium oxydé serait impossible du fait du $pK_A \simeq 3$ des groupements silanols de la surface qui lui confère une charge négative pour des solutions de $pH > 3$.

Cette molécule diffère des alkylsilanes conventionnels par la présence de la fonction amine. En effet, la réaction de greffage du silane sur une surface oxydée se fait ici en deux étapes [114]. Dans une première étape, la molécule est adsorbée sur la surface

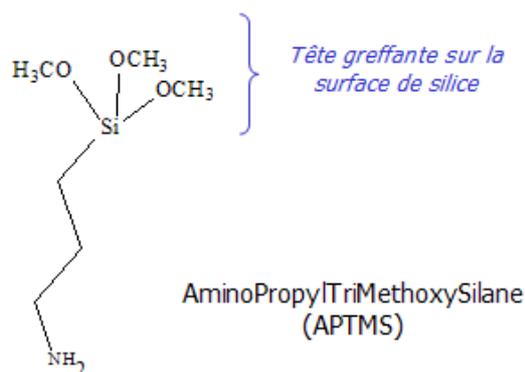


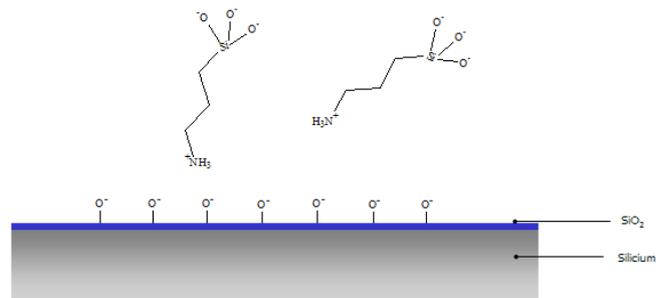
FIG. 3.4 – Représentation semi-développée de la molécule d'APTMS ($M = 179\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

par l'intermédiaire de la fonction amine qui forme des liaisons hydrogène ou des liaisons ioniques avec les groupements Si-OH. Les molécules adsorbées interagissent ensuite pour former des liaisons covalentes de type siloxane à partir de la tête greffante. Cette réaction n'est cependant pas complète et doit être poursuivie dans un deuxième temps par un recuit qui permet d'achever la formation de ces liaisons.

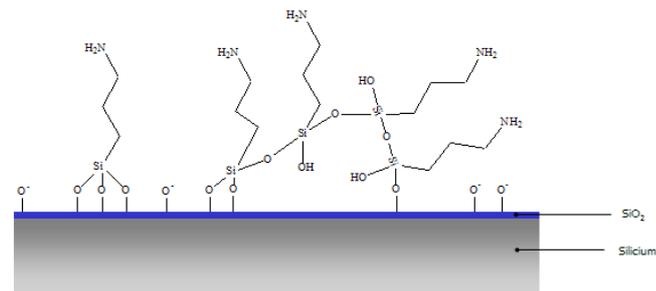
Le schéma réactionnel de la création de liaisons siloxanes est basée sur la condensation des groupements éthoxy des silanes sur les groupements silanols avec élimination d'un alcool. Cette réaction est autocatalysée par les groupements amines et peut avoir lieu en phase vapeur ou dans un solvant inorganique tel que le toluène. Il est également possible de procéder au greffage dans un mélange de solvants Ethanol/Eau. Dans ce cas particulier, l'eau va alors jouer un rôle catalytique prépondérant en permettant l'hydrolyse de la tête greffante pour donner des groupes Si-(OH)₃ très réactifs vis-à-vis des groupements silanols de la surface.

Ces différentes réactions conduisent au greffage des silanes sur la surface. Toutefois, une réaction similaire peut avoir lieu entre les molécules elles mêmes et conduire à leur polymérisation. Dans le cas de la présence d'eau en particulier, l'hydrolyse des groupes alkoxy conduit à une polymérisation dite horizontale entre molécules adsorbées sur la surface et à une polymérisation verticale entre molécules de la solution et molécules de la surface [115]. Comme l'illustre la figure 3.5, le dépôt d'APTMS n'est pas organisé et son épaisseur dépend principalement du temps de réaction et des conditions de réaction [115, 116]. Le traitement que nous avons utilisé ne conduit donc pas à l'obtention d'une monocouche autoassemblée (SAM) sur la surface.

De nombreux protocoles de greffage de cette molécule sur substrat de silice sont disponibles [117]. Ne disposant pas encore d'appareillage spécifique pour procéder à un dépôt en phase vapeur, qui semble donner les films d'APTMS les plus minces et les plus reproductibles, nous avons utilisé un protocole simple et rapide de silanisation dans un mélange ethanol/eau (Cf. paragraphe 3.3.3.1). Après l'étape de silanisation, une caractérisation de la mouillabilité de la surface par la méthode de la goutte d'eau montre clairement une variation de la nature de la surface qui peut être mise en évidence, par exemple, par une mesure d'angle de goutte. Dans le cas d'une goutte d'eau, nous observons une variation de l'angle d'une valeur proche de 0 (mouillabilité très importante)



(a)



(b)

FIG. 3.5 – Schéma de la réaction de greffage de l'APTMS sur une surface de silice. (a) Dans la première phase, la molécule est adsorbée sur la surface par interaction ionique. (b) Après recuit, la réaction conduit à la polymérisation des molécules sur la surface.

à une valeur comprise entre 40 et 50 degrés.

- Préparation du substrat :
 - Lavages Acétone, Éthanol, Eau DI
 - Séchage sous azote
 - Nettoyage solution RT₂ pendant 2min et rinçage à l'eau DI
 - Oxydation PLASMA O₂ (1min)
- Préparation de la solution de silane (C = 3.5mM) :
 - Mélange Ethanol/Eau (95%/5% en volume)
 - Introduction de 500μL d'APTMS
 - Attente de 5 min (hydrolyse de la molécule d'APTMS)
- Immersion de l'échantillon (5min)
- Rinçage Ethanol assisté par Ultra-sons (2min)
- Séchage et recuit à 115°C pendant 15min
- Stockage sous azote

Note : Toutes les solutions sont re préparées avant chaque expérience

3.3.3.2 Sélectivité du greffage

Dans le cas d'une surface traitée, une remarque importante doit être ajoutée quant à la sélectivité du greffage entre l'Or et la silice. En effet, des expériences menées sur des métaux [115] on pu démontrer que le greffage d'APTMS était possible sur des métaux oxydés mais également sur des métaux nobles tels que l'Or. Comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, les densités de greffage sur une surface métallique en Or et une surface de type SiO₂ sont comparables. Ce point sera discuté plus en détail dans le paragraphe 3.3.5.2. Par conséquent, sur une surface de SiO₂ comportant un réseau de nanoélectrodes en Or, il est probable que le traitement conduise au dépôt d'une couche de silane recouvrant à la fois les électrodes et le substrat.

3.3.3.3 Épaisseur et homogénéité du dépôt

L'épaisseur de la couche polymérisée de silane sur la surface reste difficile à évaluer et semble très sensible aux conditions expérimentales. Le facteur principal est le temps de traitement. L'épaisseur de la couche croît avec le temps d'immersion de l'échantillon pour atteindre des épaisseurs supérieures à 30nm pour des temps de 24H. Les conditions de greffage et de recuit et plus particulièrement le milieu dans lequel sont menées les différentes étapes joue également un rôle important.

Même si nous ne pouvons pas l'évaluer avec précision nous pouvons donner un ordre de grandeur de l'épaisseur de la couche en nous référant aux travaux de E.T. Vandenberg et al [115]. Même si les conditions expérimentales ne sont pas strictement identiques, il semble que nos paramètres nous conduisent à une épaisseur du film de silane amine de l'ordre de quelques nanomètres.

Nous n'avons que peu d'éléments en ce qui concerne la rugosité du dépôt. Les observations MEB témoignent d'un très bon état de surface sur l'ensemble de l'échantillon. Des expériences plus fines ont permis de démontrer que le film d'APTMS présente une épaisseur très homogène et une faible rugosité [118].

3.3.4 Dépôt des nanoparticules d'Or

Le protocole de dépôt de particules est le suivant :

- Préparation de la solution de colloïdes :
 - Concentration (x10) de la solution initiale de nanoparticules (5.6×10^9 particules/mL) par centrifugation (4500 rpm, 12 min)
- Incubation de la solution sur le substrat de 4x4mm² (durée : 0 à 2heures).
- Lavages et observations
 - Rinçage Ethanol (5 min) assisté par ultrasons
 - Séchage sous flux d'azote
 - Observations (MEB, AFM, Microscopie optique ...)
 - Stockage sous flux d'azote
- Séchage et stockage sous azote

La principale contrainte expérimentale concernant le dépôt vient de l'évaporation de la solution colloïdale qui engendre une coagulation des nanoparticules. Le protocole le plus simple consiste à immerger l'échantillon dans un volume important de solution

ou à déposer une goutte de solution sur l'échantillon dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau. La majorité des expériences ont d'ailleurs été menées suivant ce protocole en déposant $10\mu\text{L}$ de solution sur les échantillons dans une enceinte fermée et saturée en vapeur d'eau. Rappelons que la taille des échantillons utilisés est de $4 \times 4\text{mm}^2$.

Même si nous disposons de volumes de solution colloïdale importants dans le cas des particules chargées, il serait intéressant de pouvoir travailler avec des volumes plus faibles. En effet, un des objectifs de notre approche est de limiter les quantités de composés nécessaires à la détection. Nous avons donc développé une approche basée sur l'utilisation d'une cellule micro-fluidique en PDMS dont la fabrication est reportée en Annexe 4.7 et dont l'utilisation sera détaillée ultérieurement.

3.3.5 Résultats expérimentaux

3.3.5.1 Densité du dépôt

De façon à valider les différents protocoles de dépôt et leur compatibilité avec nos dispositifs, les premiers tests ont été effectués sur des échantillons de silicium oxydés (Cf. chapitre II) ne comportant que les structures micrométriques de contact. Nous avons appliqué les protocoles précédents en utilisant des colloïdes de 100nm et 40nm. Ces expériences ont été menées en utilisant une micro-cuve en PDMS pour confiner le volume interagissant avec la surface et éviter toute évaporation.

Les résultats des observations MEB du dépôt après deux heures d'incubation sont donnés dans les figures 21 et 3.7.

A partir de ces deux images, nous pouvons évaluer la densité de particules par unité de surface.

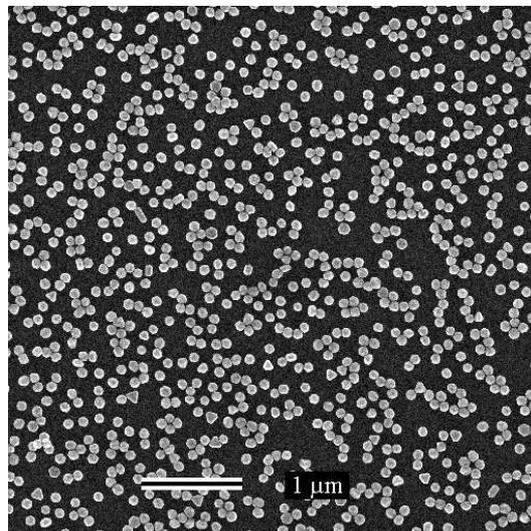


FIG. 3.6 – Image MEB d'une surface de silice fonctionnalisée par de l'APTMS après 2 heures d'incubation d'une solution de nanoparticules d'Or stabilisées par des groupements citrate. Le diamètre moyen des particules est de 100nm. La densité obtenue est d'environ 4.10^9 particules/cm²

Pour les nanoparticules de 100nm de diamètre, La densité obtenue après 2 heures d'incubation a été évaluée à 4.10^9 particules/cm² soit un taux de couverture de 30%

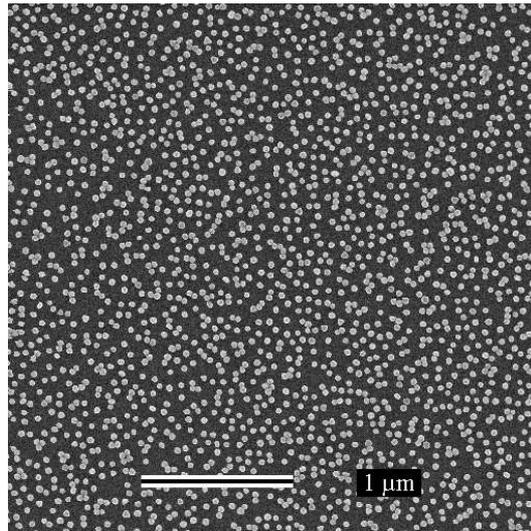


FIG. 3.7 – Image MEB d'une surface de silice fonctionnalisée par de l'APTMS après 2 heures d'incubation d'une solution de nanoparticules d'Or stabilisées par des groupements citrate. Le diamètre moyen des particules est de 40nm. La densité obtenue est d'environ $15 \cdot 10^9$ particules / cm^2

environ. En ce qui concerne les colloïdes de 40nm, la densité est plus importante, atteignant $15 \cdot 10^9$ particules/ cm^2 soit un taux de couverture d'environ 22%. Ces résultats sont en très bon accord avec les travaux déjà publiés en ce qui concerne les densités maximales de colloïdes qu'il est possible d'atteindre sur une surface oxydée fonctionnalisée par silane amine [112]. Ces résultats confirment bien la validité des protocoles utilisés pour le dépôt de particule d'Or.

Des expériences pour des temps d'incubation plus longs ne nous ont pas permis d'augmenter la densité de nanoparticules de façon notable. En effet, comme l'illustre le schéma 3.8, la densité maximale n'est pas limitée par le seul encombrement des nanoparticules mais également par les répulsions électrostatiques qui existent entre particules.

Toutefois, même si le dépôt est limité à une monocouche, nous pouvons remarquer que les nanoparticules ne sont pas toujours régulièrement espacées. Comme le confirment les résultats du comptage des particules donnés dans les figures 21 et 3.7, certaines particules s'associent pour former des petits groupes de quelques éléments.

3.3.5.2 Sélectivité du dépôt

Les expériences décrites dans le paragraphe précédent ont été reproduites sur un substrat non silanisé et ont pu démontrer la sélectivité du protocole par l'absence de particules après incubation et rinçage.

Dans le cas d'une surface traitée, le dépôt de nanoparticules donne des densités quasi similaires sur une surface métallique en Or et une surface de type SiO_2 (Cf figure 3.9). Comme nous l'avions suggéré précédemment, ce résultat semble bien confirmer la présence de silane amine sur la surface des électrodes.

Ce phénomène semble pouvoir être éliminé en effectuant un traitement de la surface d'Or avec avec une molécule de type alcane-thiol telle que le ODT (OctaDécane-

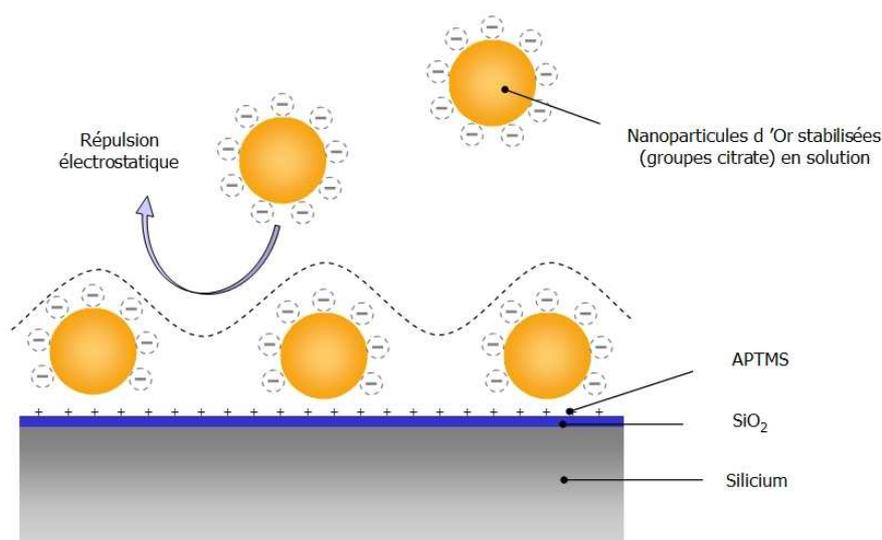


FIG. 3.8 – Illustration de l'influence des effets de répulsions électrostatiques entre nanoparticules d'Or fonctionnalisées par des groupements citrate. Les particules présentent une charge de surface uniforme négative.

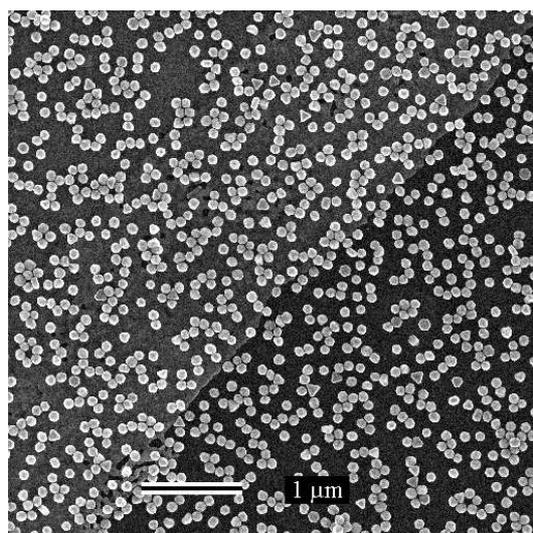


FIG. 3.9 – Évaluation de la sélectivité du dépôt de colloïdes entre une surface d'Or et une surface de silice. La partie la plus claire correspond à la surface d'Or.

Thiol). Cette molécule s'organise sur la surface métallique sous forme de monocouche auto-assemblée qui protège l'or d'un éventuel dépôt de silane. Nous avons appliqué un protocole simple de fonctionnalisation par l'OTS (Immersion dans une solution d'OTS à 10mM dans l'éthanol pendant 2min et rinçage à l'éthanol) sur un échantillon avant de procéder au traitement par amino silane et au dépôt des particules. L'image 3.10 confirme bien ce phénomène en démontrant un dépôt de nanoparticules quasi inexistant sur les zones métallisées traitées par l'OTS.

Nous n'avons pas utilisé cette propriété dans les expériences suivantes, mais cela reste une potentialité intéressante si l'on souhaite confiner les nanoparticules uniquement entre

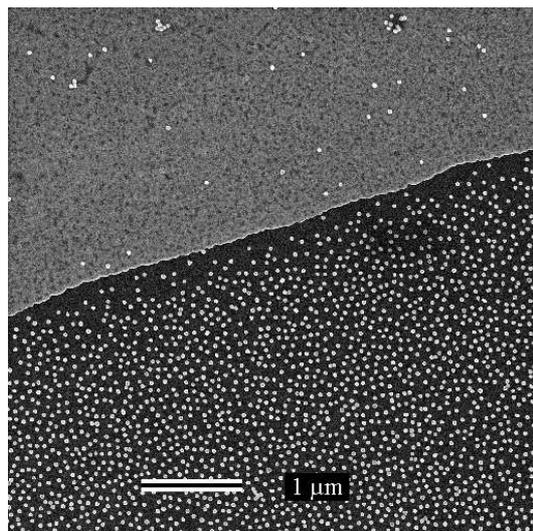


FIG. 3.10 – *Évaluation de la sélectivité du dépôt de nanoparticules entre une surface d'Or passivée par une monocouche auto-assemblée d'ODT et une surface de silice. La partie la plus claire correspond à la surface d'Or.*

les électrodes.

3.3.5.3 Homogénéité du dépôt

Deux remarques sont à retenir en ce qui concerne l'homogénéité du dépôt de nanoparticules. D'une part, nous pouvons voir sur l'ensemble des champs d'observations que les nanoparticules forment un tapis dense, régulier dont la morphologie est conservée quelque soit la nature du substrat fonctionnalisé par l'APTMS (Silice ou Or). D'autre part, nous avons pu observer que la densité des nanoparticules était très homogène sur l'ensemble de la surface de dépôt (environ 1mm^2) ce qui confirme également l'homogénéité du dépôt d'APTMS.

3.3.5.4 Influence de la polarisation

L'ensemble des expériences précédentes ont été menées sur des échantillons non connectés à une source extérieure. Toutefois, il nous est possible d'appliquer une tension de polarisation entre les électrodes durant l'incubation. Cette tension devrait perturber le dépôt des nanoparticules en modifiant le potentiel électrostatique de l'électrode. En particulier, si nous appliquons une polarisation de signe opposé à la charge des groupes amines, une force de répulsion est exercée sur les particules. Si cette force devient supérieure à la force d'attraction initiale, nous devrions être en mesure d'empêcher l'immobilisation des nanoparticules chargées. La figure 3.11 nous montre un exemple de dépôt obtenu sur un dispositif à trois électrodes. Une différence de potentiel de 1V a été appliquée entre deux des électrodes supérieures. L'électrode de droite a été polarisée négativement par rapport à l'électrode de gauche. L'influence de la polarisation sur le dépôt est clairement visible. Nous observons une nette diminution de la densité sur l'électrode de droite.

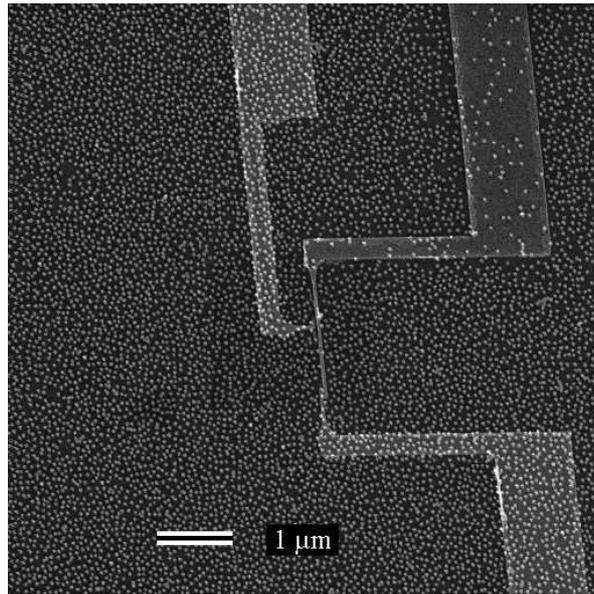


FIG. 3.11 – Image MEB d'un dispositif à trois électrodes illustrant l'influence d'une tension de polarisation sur le dépôt de nanoparticules fonctionnalisées par des groupements citrate sur une surface d'APTMS. Une tension de 1V a été appliquée entre les deux électrodes supérieures durant l'incubation des nanoparticules. La densité de particules sur l'électrode de droite, portée à un potentiel négatif, décroît très fortement du fait des répulsions électrostatiques.

3.3.5.5 "Résistance" du dépôt

Après incubation dans la solution colloïdale, les échantillons traités ont été rincés à l'éthanol. Afin de vérifier leur ancrage sur la surface, nous avons procédé après une première observation des échantillons à un rinçage supplémentaire de l'échantillon dans un bain d'éthanol assisté par ultrasons (puissance/fréquence). Après 10 minutes de traitement, un nouveau comptage des nanoparticules ne nous a pas permis de noter de baisse dans la densité de surface ce qui confirme bien la robustesse du traitement et la forte adhésion des nanoparticules sur la surface.

3.4 Étude du dépôt de nanoparticules sur des électrodes interdigitées

3.4.1 Description du dispositif de détection

La première adaptation pour la mise au point de la détection de nanoparticules métalliques consiste à trouver un bon accord entre les dimensions du dispositif et le diamètre des particules. Des considérations géométriques simples doivent nous permettre de déterminer les dimensions du dispositif de détection. Celles-ci sont liées de façon directe aux dimensions et à la morphologie des nanoparticules. Notre objectif est de greffer une nanoparticule sur la surface fonctionnalisée de l'espace inter-électrodes du dispositif. Deux conditions doivent être satisfaites pour y parvenir. D'une part, la par-

ticule doit être greffée sur le substrat et d'autre part elle doit entrer en contact avec les deux électrodes pour permettre le passage du courant.

Pour un diamètre de particule fixé, nous pouvons ajuster les dimensions de l'espace inter-électrodes ainsi que l'épaisseur du dépôt métallique pour satisfaire à ces deux conditions. Le schéma 3.12 illustre ces considérations géométriques.

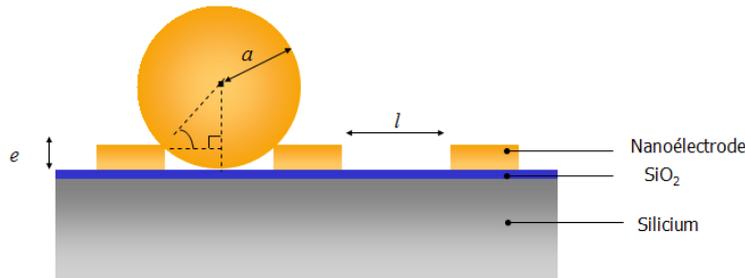


FIG. 3.12 – *Adaptation des dimensions des dispositifs satisfaisant aux conditions de "pontage" des électrodes par les nanoparticules d'Or. l représente l'espace inter-électrode, e l'épaisseur des électrodes et a le rayon des nanoparticules*

Dans le cas idéal de nanoparticules parfaitement sphériques de rayon a et d'électrodes définies par une fonction créneau, nous pouvons exprimer l'épaisseur de métal e nécessaire pour permettre de satisfaire les deux conditions précédentes :

$$e = a \left(1 - \sqrt{1 - \left(\frac{l}{2a} \right)^2} \right) \quad (3.1)$$

où l représente l'espace inter-électrodes, e l'épaisseur des électrodes et a le rayon des nanoparticules.

Si l'on considère des nanoparticules de 100nm de diamètre et un réseau présentant un espace inter-électrodes de 70nm, l'épaisseur de métal e qui satisfait l'équation est $e \simeq 15nm$. Compte tenu de la dispersion en taille des particules qui dans notre cas est inférieure à 20%, l'épaisseur e doit être comprise entre $e \simeq 11nm$ et $e \simeq 20nm$.

Ce résultat doit bien évidemment être nuancé. D'une part, le profil des électrodes présenté précédemment ne correspond pas au profil réel qui présente des flancs légèrement arrondis. D'autre part, comme l'illustre l'image 3.13, les nanoparticules ne présentent pas un contour parfaitement sphérique. La méthode de fabrication des nanoparticules provoque l'apparition de facettes qui modifient localement le rayon de courbure de la particule sans toutefois affecter le diamètre moyen des particules (Cf. figure 3.14).

L'équation 3.1 nous donne un ordre de grandeur de e en fonction du diamètre des particules a mais ne peut tenir compte de leur morphologie. Par contre, le profil irrégulier des particules va nous permettre de relâcher les contraintes sur les dimensions de l'espace inter-électrodes. Comme nous le verrons plus tard, les particules pourront adapter leur orientation pour se conformer à la topologie des électrodes.

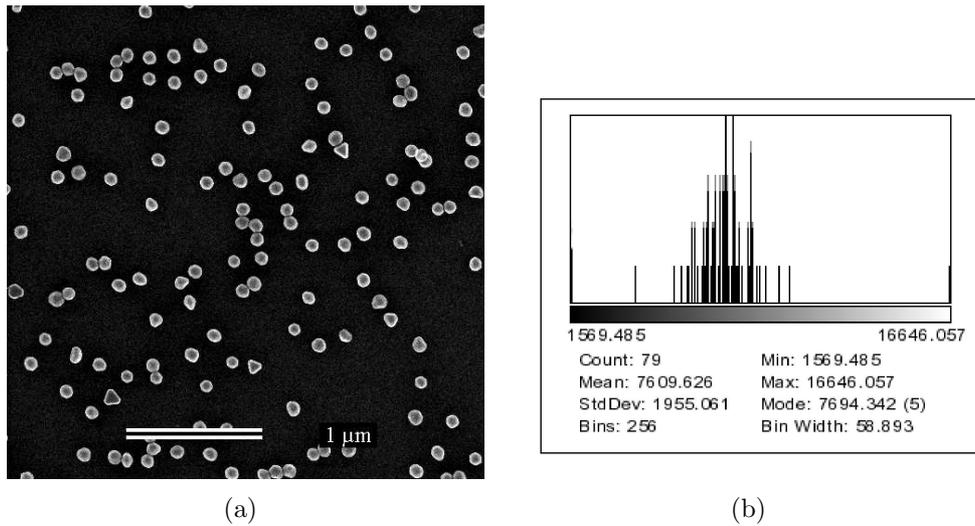


FIG. 3.13 – Image MEB d'un dépôt de nanoparticules (Grandissement $30k\times$). Le diamètre moyen a été évalué à 98nm avec une dispersion moyenne de $\pm 15\text{nm}$.

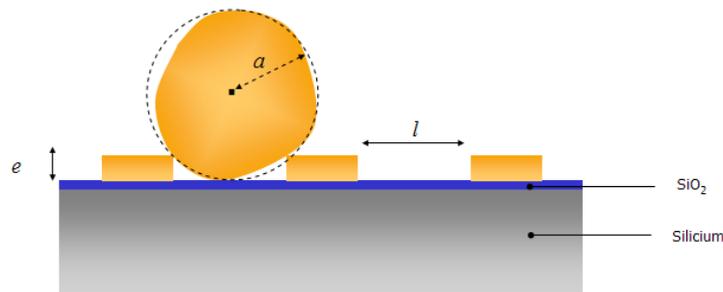


FIG. 3.14 – Illustration de l'évolution des conditions de pontage en tenant compte des irrégularités présentées par le profil des nanoparticules d'Or.

3.4.2 Influence de la morphologie des électrodes sur le dépôt

3.4.2.1 Homogénéité du dépôt

Une observation MEB des premiers résultats de greffage de colloïdes sur un réseau d'électrodes est donnée dans la figure 3.15. Dans cet exemple, le temps d'incubation des colloïdes a été volontairement limité à 30 minutes de façon à limiter la densité de particules. Le premier objectif est d'évaluer la répartition du dépôt pour donner une meilleure interprétation des phénomènes de transport électrique.

Dans cette expérience, l'espace inter-électrodes a été évalué à 65nm pour une largeur d'électrode correspondante de 35nm . L'épaisseur de métal déposé est de 20nm . Le diamètre moyen des nanoparticules est toujours de 100nm . Ces paramètres vérifient les critères de dimensions que nous venons de discuter.

La première observation concerne l'homogénéité du dépôt. Si nous comparons la densité de dépôt sur le réseau d'électrodes et sur la surface de silice à proximité du réseau, nous observons un taux de couverture très similaire, de l'ordre de $5.6 \cdot 10^8$ particules / cm^2 .

Toutefois, même si les densités sont similaires entre les deux zones, certaines anoma-

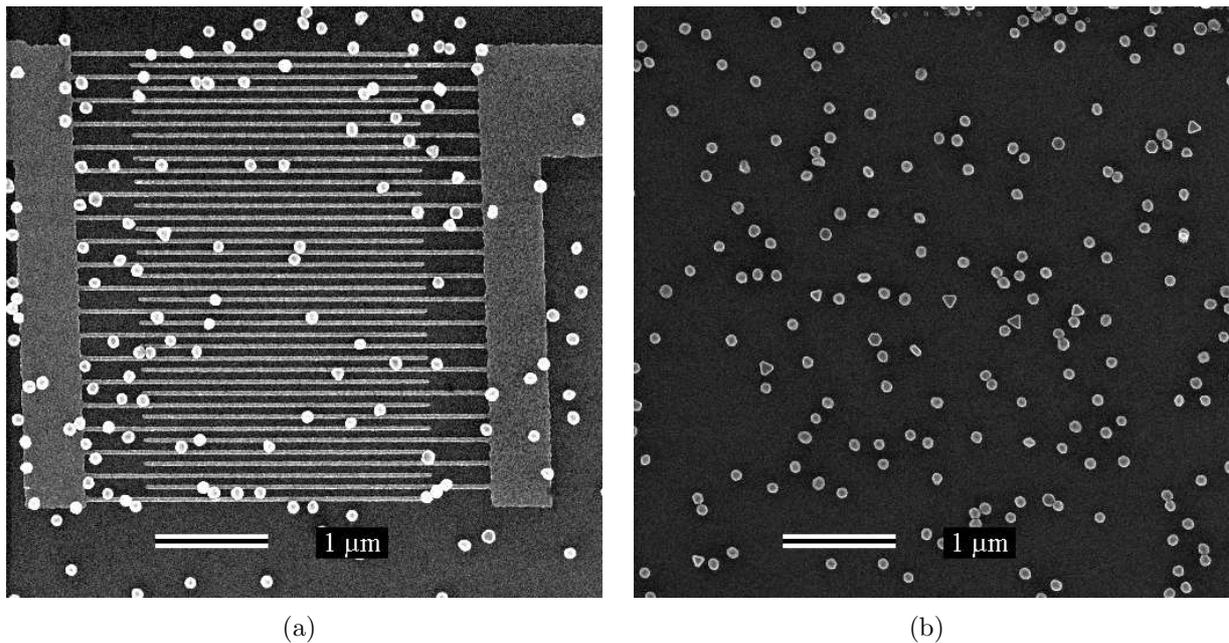


FIG. 3.15 – Comparaison des densités de de particules : (a) sur un réseau d'électrodes interdigitées (Largeur = 35nm, espace inter-électrodes = 65nm, épaisseur = 20nm) (b) sur une zone non structurée proche du réseau.

lies sont observables sur le réseau d'électrodes (image (b)). Il apparaît que la présence des structures modifie l'homogénéité du dépôt. En effet, les particules semblent se déposer en suivant le contour des structures soit en se plaçant sur la silice en s'appuyant contre les électrodes soit en en se plaçant sur les bords des structures métalliques.

Cet effet est particulièrement visible sur la zone couverte par le réseau d'électrodes. Les particules se déposent plus favorablement entre les électrodes pour entrer en contact avec chacune d'elles. Dans le cas particulier de cette zone, l'espace entre deux électrodes est comparable au diamètre des nanoparticules et l'hypothèse selon laquelle les particules se placent sur les bords des structures est toujours vérifiée. Cet effet inattendu de "guidage" de l'adsorption des colloïdes par les nanoélectrodes est très important pour notre application car il semble favoriser le "pontage" électrique des électrodes.

Afin de disposer d'un indicateur numérique objectif permettant de quantifier la tendance des nanoparticules à s'aligner entre les nanoélectrodes, nous avons cherché, en utilisant un traitement d'image, à dégager un protocole de comptage systématique. Nous avons mis au point une procédure systématique de comptage et d'évaluation de la répartition des particules situées sur les électrodes et entre les électrodes. En utilisant un logiciel de traitement d'image (tel que ImageJ¹), il nous est possible de déterminer la position du barycentre de chacune des particules sur le réseau d'électrodes. En comparant ces coordonnées avec la position des électrodes, nous avons déterminé le nombre de particules qui satisfont le pontage des électrodes ainsi que la proportion de particules situées hors de cet espace.

Considérons dans un premier temps l'image de la figure 3.15(a). Un dénombrement manuel nous permet de compter 35 particules dans l'espace inter-électrodes et 11 parti-

¹Disponible à l'adresse <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

cules déposées sur les électrodes soit une proportion de 76% de particules qui satisfont aux conditions de pontage. En utilisant la procédure logicielle mise au point, nous trouvons une proportion de particules de l'ordre de 78%, résultat qui est en très bon accord avec le premier dénombrement.

Nous pouvons effectuer le même traitement dans le cas de la figure 3.15(b). Si nous comparons les coordonnées des particules avec les coordonnées d'un réseau d'électrodes fictif de 100nm de pas et de 65 nm d'espace inter-électrodes, le résultat qui nous est donné est de l'ordre de 67% ce qui correspond parfaitement au taux de couverture de l'espace inter-électrodes. Nous avons donc une répartition homogène du dépôt de particule. (Si nous considérons un réseau pour lequel les électrodes sont séparées de 50 nm, nous obtenons une valeur de 52%, résultat qui suit fidèlement la proportion de la surface couverte par les électrodes.)

Ce phénomène est également confirmé par la figure 3.16 au travers de laquelle nous pouvons observer le résultat de dépôts successifs de colloïdes de 40nm et de 100nm sur le même dispositif. Dans un premier temps, nous avons immergé le dispositif dans une solution de particules de 40nm pendant 15 minutes puis dans une solution de particules de 100nm pendant 30minutes.

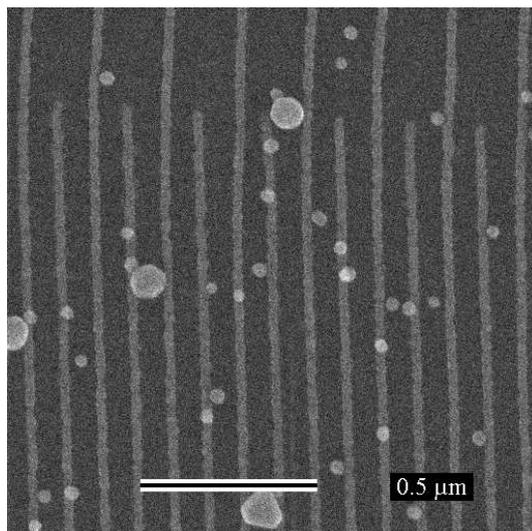


FIG. 3.16 – Images MEB obtenue après dépôts successifs de nanoparticules de 40nm (15min d'incubation) et 100nm (30minutes d'incubation) sur un réseau d'électrodes (largeur=30nm, pas=100nm, épaisseur=20nm).

Ici aussi, nous pouvons observer que les colloïdes de 100nm se placent dans l'espace inter-électrodes. Par contre, les particules de 40nm n'ont plus la possibilité de se placer simultanément au contact des deux électrodes. Certaines de ces particules se déposent en bord de structure, soit sur la silice soit directement sur les électrodes. En effet, leur diamètre est comparable, dans ce cas, avec les largeurs des électrodes.

Les premières observation du dépôt semblent très encourageantes vis-à-vis de notre objectif. Il semble en effet que la morphologie et les dimensions des structures conduisent les particules à se placer naturellement dans l'espace inter-électrodes et donc à permettre

le pontage de ces dernières. Toutefois, nous avons souhaité confirmer ces premiers résultats par des observations plus poussées en microscopie électronique et par AFM.

Observation du dépôt par Microscopie électronique

Un premier élément de réponse nous est donné sur la figure 3.17. Il s'agit d'une image MEB à fort grandissement du dispositif qui nous renseigne sur la conformation des particules entre les électrodes.

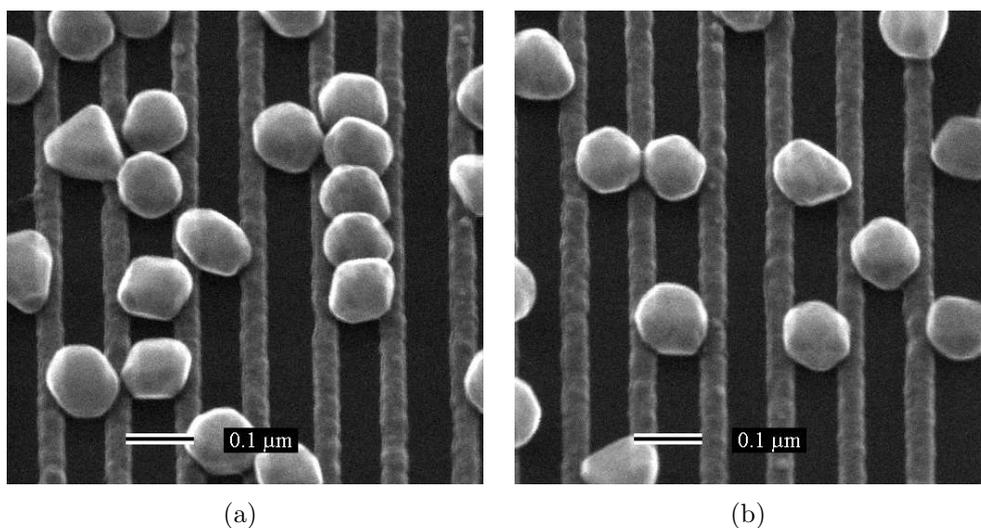


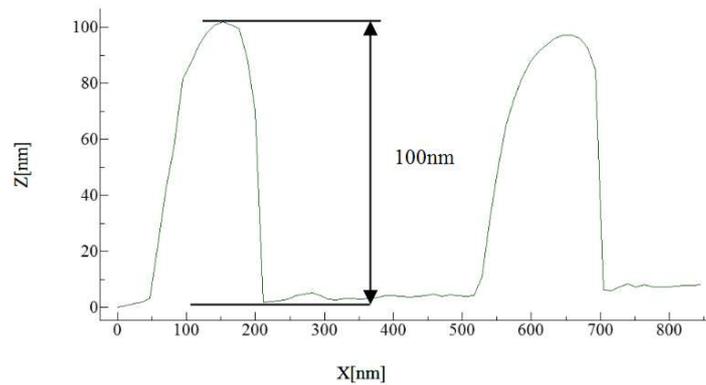
FIG. 3.17 – Image MEB à fort grandissement de nanoparticules d'Or de 100nm de diamètre adsorbés sur un réseau d'électrodes interdigitées (Caractéristiques des nano-électrodes : largeur = 40nm, épaisseur = 20nm, pas = 100nm)

Comme nous l'avons évoqué précédemment les particules ne sont pas parfaitement sphériques et montrent des profils anguleux. L'observation du dépôt semble bien confirmer le pontage des électrodes par les particules ainsi que leur contact avec la surface. Même si les particules présentent des profils peu réguliers, il semble qu'elles adaptent leurs orientation pour se conformer aux profils des électrodes.

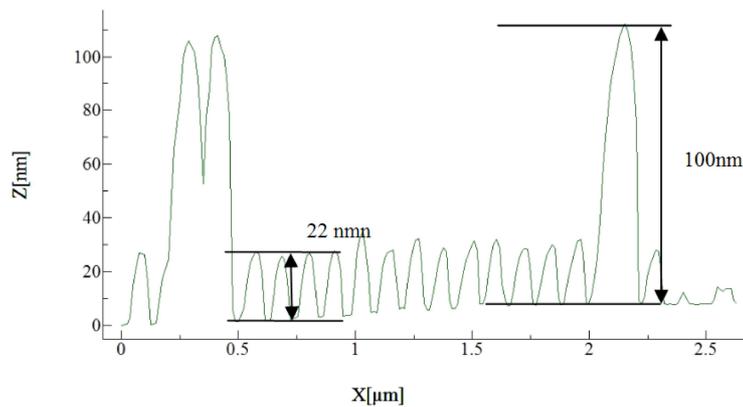
Observation du dépôt par AFM

Même si la condition de pontage des électrodes semble réalisée, il reste difficile de conclure sur le contact entre la nanoparticule et le substrat. Celui-ci reste difficilement observable en microscopie électronique même sous des angles d'incidence élevés. Un moyen détourné réside dans l'analyse des variations de hauteur du dépôt par Microscopie à Force Atomique. En effet, si les particules présentes dans l'espace inter-électrodes ne sont pas en contact avec le substrat et sont en appui sur les électrodes, la hauteur apparente des particules doit être supérieure à leur diamètre. La figure 3.18 rassemble deux profils de hauteurs sur des particules déposées dans l'espace inter-électrodes et sur une zone vierge du substrat.

L'analyse des deux profils AFM nous permet d'évaluer la différence de hauteur moyenne entre un colloïde déposé sur le substrat hors des électrodes et un colloïde placé dans l'espace inter-électrodes. Dans les zones non structurées du substrat, la hauteur moyenne des nanoparticules par rapport au substrat est de $100 \pm 10nm$. Ce résultat



(a)



(b)

FIG. 3.18 – Exemples de tracés de profils transversaux de nanoparticules déposées dans une région non structurée (a) et dans l'espace inter-électrodes du dispositif (b).

est inférieur au diamètre apparent des particules mais se justifie par le fait que ces dernières ne présentent pas un profil parfaitement sphérique ce qui contribue logiquement à diminuer les dimensions observées en AFM.

Comparons maintenant ces premiers résultats aux tracés obtenus sur les nano-électrodes (Cf Figure 3.18(b)). L'épaisseur du dépôt métallique est de 22nm environ et nous retrouvons comme précédemment une hauteur moyenne pour les nanoparticules comprise entre 90 et 100nm. Ce résultat semble bien confirmer le contact et donc l'immobilisation des nanoparticules sur le substrat.

3.4.2.2 Synthèse

Nous pouvons faire une synthèse des observations précédentes :

- Les nanoélectrodes ne paraissent pas affectées par les différentes étapes de dépôt et de lavage du protocole même dans le cas de lavage avec ultra-sons.
- L'état de surface apparent paraît très bon et homogène sur l'ensemble des dispo-

sitifs.

- Le dépôt ne présente pas de sélectivité par rapport aux matériaux utilisés (sauf en cas de traitements de surface spécifiques (ex : alcanethiols sur les électrodes d'Or).
- Le dépôt est sensible aux structures présentes sur la surface. Les nanoparticules se déposent préférentiellement en bord de structure.
- Sur les réseaux d'électrodes, les nanoparticules semblent adapter leur conformation pour satisfaire aux conditions de pontage.
- Le dépôt de particules dans l'espace inter-électrodes est favorisé lorsque la largeur des électrodes est inférieure à l'espace séparant les électrodes.

D'un point de vue expérimental, ces résultats sont très satisfaisants. Le fait d'adapter les dimensions des dispositifs aux dimensions des nanoparticules utilisées favorise le dépôt des particules dans l'espace inter-électrodes des dispositifs. Comme nous le verrons au paragraphe 3.6, ce phénomène constitue un élément clef du fonctionnement des dispositifs. Une restriction supplémentaire est à ajouter aux conditions énoncées. Il semble que le dépôt dans l'espace inter-électrodes soit favorisé lorsque la largeur des électrodes est inférieure à la largeur de l'espace inter-électrodes et par conséquent au diamètre des particules. Il conviendra donc de minimiser la largeur des électrodes durant la fabrication des électrodes.

Toutefois, même si ces premiers résultats sont satisfaisants, le schéma de détection proposé ne reste pas limité au seul exemple de cette réalisation. Il sera sûrement amené à évoluer tant au point de vue des dimensions des structures que des protocoles de dépôts utilisés. Pour l'instant, il nous est impossible d'anticiper le comportement des particules au voisinage de la surface et de conclure sur la polyvalence du procédé de détection.

Nous avons donc souhaité trouver un modèle permettant de décrire l'influence de la topologie de la surface sur le dépôt de particules en solution afin de savoir si cet effet peut se généraliser à de nombreuses situations expérimentales différentes ou s'il ne reste observable et exploitable que pour des conditions expérimentales très spécifiques.

3.5 Interprétation de la localisation du dépôt

Comme nous l'avons vu, l'homogénéité du dépôt de nanoparticules semble étroitement dépendante de la topologie de la surface. En particulier, nous avons constaté que le dépôt se faisait préférentiellement dans l'espace inter-électrodes des réseaux. Ce phénomène ne peut être expliqué que par l'existence de forces de courte portée qui, au voisinage de la surface du dispositif, sont capables d'orienter préférentiellement les nanoparticules entre les électrodes et de favoriser ce site de dépôt par rapport aux électrodes elles mêmes. Par ailleurs, ces forces doivent avoir une intensité suffisante pour compenser les effets de l'agitation thermique qui tend à disperser les particules. Parmi les interprétations envisageables, les premières hypothèses venant à l'esprit concernent les forces de pesanteur. Toutefois, nous verrons que ces seules forces ne peuvent expliquer la localisation du dépôt et que l'interprétation des phénomènes observés nécessite de prendre en compte des forces de plus courte portée telles que les forces de Van der Waals.

3.5.1 Nature des interactions

La question du contrôle de l'organisation du dépôt de nanoparticules a suscité un vif intérêt durant ces dernières années. La fabrication de réseaux cristallins bi et tri dimensionnels à partir de solutions colloïdales offre des ouvertures technologiques intéressantes en particulier pour des applications dans le domaine de la photonique (fabrication de cristaux photoniques) [119, 120], pour des applications de détection optique [121, 122] ou encore pour la nanostructuration [123].

Les techniques de fabrication de ces réseaux cristallins sont basées sur la sédimentation, sur le dépôt par interaction électrostatique ou encore par évaporation de la solution colloïdale. Ces méthodes permettent d'obtenir des réseaux cristallins en deux et trois dimensions sur de larges surfaces supérieures à $1000\mu m^2$. Le problème commun à toutes ces expériences réside dans le contrôle de la structure cristalline formée par l'assemblage. De nouvelles solutions technologiques ont été récemment proposées pour orienter et contrôler les structures générées. Il s'agit en particulier de procéder au dépôt des particules sur une surface structurée en fonction des dimensions des particules utilisées [124, 125, 126]. Cette structuration de surface permet d'orienter le dépôt des particules sur la surface. Dans le cas des cristaux tri-dimensionnel, la première couche de particule ainsi déposée oriente à son tour le dépôt des particules des couches supérieures qui se conforment à la topologie créée par les particules des couches inférieures. La figure 3.19 représente deux exemples de réalisation utilisant ce principe [125, 124].

Bien que de natures différentes (Silice, latex) et de diamètres supérieurs aux particules utilisées dans nos expériences ($> 350nm$), ces résultats montrent que la structuration de la surface permet de guider de façon très reproductible l'organisation du dépôt de particules.

Le premier argument avancé pour expliquer la localisation des particules est lié aux forces de pesanteur. Prenons l'exemple des travaux réalisés par P. Wiltzius et al [125]. Dans cette expérience, des particules de silice de $525nm$ ont été déposées dans des cavités de $500nm$ de profondeur et de $1\mu m$ de diamètre. La variation d'énergie potentielle associée peut être facilement calculée en tenant compte de la poussée d'Archimède. Les résultats donnent une valeur de ΔE_p de l'ordre de $0.6kT_0$. Nous voyons clairement que l'influence du poids n'est pas négligeable par rapport à l'agitation thermique et peut expliquer d'une part la sédimentation des particules dans des temps assez courts mais aussi la localisation du dépôt. Ce résultat est d'ailleurs en très bon accord avec le phénomène de sédimentation utilisé dans ces expériences pour favoriser la croissance des cristaux.

Nous pouvons effectuer le même calcul dans le cas de nos expériences. Nous utilisons des particules d'Or (densité 19.3) et de rayon moyen $r \simeq 50nm$. Si nous considérons la perte d'énergie associée au dépôt d'une particule dans une cavité $h = 20nm$ de hauteur (l'épaisseur des électrodes), la perte d'énergie potentielle associée ΔE_p est, en négligeant la poussée d'Archimède :

$$\Delta E_p = mgh \simeq 5.10^{-7}k_B T_0 \quad (\text{à } T_o=298K)$$

Dans notre cas, la stabilisation engendrée reste très faible comparée à $k_B T$ l'énergie associée à la diffusion des particules. Ainsi, la seule contribution du poids de la particule ne semble pas suffisante pour favoriser le dépôt des particules dans l'espace inter-électrodes. Par ailleurs, cette interprétation reste dans tous les cas insuffisante pour

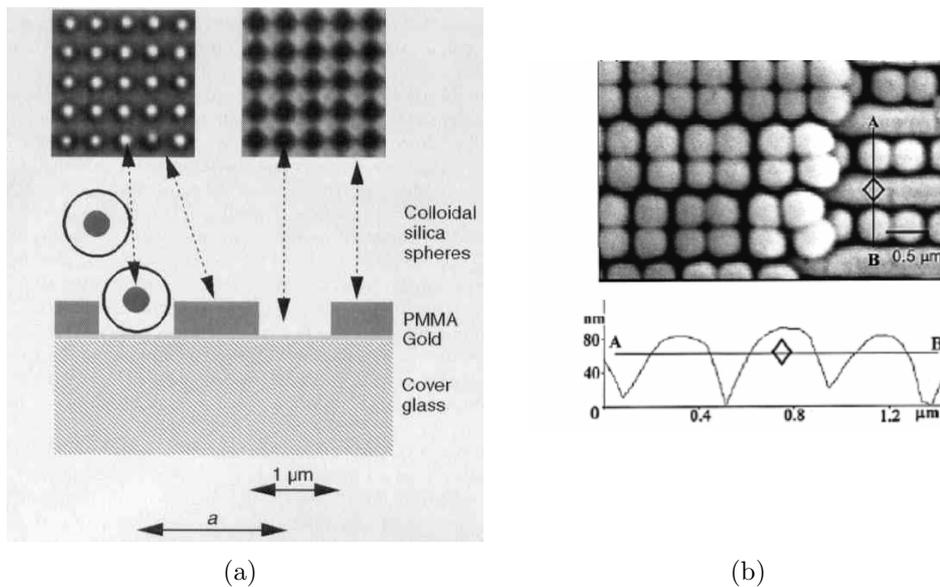


FIG. 3.19 – Deux exemples de réalisation de dépôts localisés de nanoparticules pour la fabrication de structures cristallines bi et tri-dimensionnelles. (a) Dépôt de particules de silice de 525nm de diamètre sur une surface de résine structurée par des cavités circulaires de 500nm d'épaisseur et de 1 μ m de diamètre. Les particules se positionnent dans les cavités fabriquées dans la silice. Ce dépôt sert de couche d'amorce pour la fabrication d'une structure cristalline de type (100) [125]. (b) Dépôts de particules de Polystyrène de 350nm de diamètre sur un réseau de lignes au pas de 780nm structurées dans un polymère. Sur la droite de l'image nous apercevons les lignes du réseau et l'organisation de la première couche déposée. Sur la gauche de l'image nous pouvons observer l'organisation de la deuxième couche de particules. [124]

expliquer le dépôt sur les bords des structures ou encore sur les électrodes dans le cas des particules de 40nm de diamètre.

Un autre argument vient confirmer ce résultat. En effet, les temps de sédimentation que nous avons observé pour les solutions de nanoparticules d'Or en solution (100nm et 40nm) sont généralement supérieur à une semaine. En comparaison aux durées des expériences les plus longues que nous avons pu mener (quelques heures), nous pouvons admettre que ce phénomène n'aura que peu d'influence dans notre cas.

Aussi, sans remettre en cause la description proposée dans les travaux cités précédemment, nous voyons clairement que la seule prise en compte des forces gravitationnelles reste insuffisante dans notre cas.

3.5.2 Interactions électrostatiques et de Van der Waals

3.5.2.1 Introduction

Un modèle général, appelé modèle DLVO, permet d'interpréter le comportement de nanoparticules en solution au voisinage d'une surface. Ce modèle prend en compte l'influence des forces électrostatiques ainsi que celle des forces de Van der Waals et

semble particulièrement bien adapté à notre système.

3.5.2.2 Principe du modèle DLVO

Remarque : Notre objectif est de donner une description des interactions à courte distance entre les nanoparticules en solution et la surface des échantillons. Ces interactions vont guider l'adsorption des nanoparticules en des sites privilégiés. Nous ne décrirons pas l'étape ultérieure durant laquelle les nanoparticules s'immobilisent sur la surface par greffage covalent ou reconnaissance moléculaire ou encore interaction électrostatique. Cette dernière étape, qui contrôle l'adhésion des nanoparticules sur la surface, dépend intimement des couches de fonctionnalisation qui sont déposées sur la surface ou autour des nanoparticules (alcanethiols, aminosilanes, anticorps,...).

Une présentation détaillée du modèle DLVO est donnée en Annexe A.2.1.2. Ce modèle est né à partir des contributions de Derjaguin et Landau en 1941 [127] qui ont été complétées par Verwey et Overbeek en 1948 [128]. Il permet en particulier d'interpréter le comportement des solutions colloïdales. A la base, le modèle prend en compte deux origines d'interactions entre particules : des interactions de type Van der Waals et des interactions électrostatiques. Les forces de Van der Waals entre deux particules de même nature sont toujours attractives et si elles intervenaient seules conduiraient à la coagulation des particules. La stabilité des solutions colloïdales est due dans de nombreux cas à l'existence de forces répulsives d'origine électrostatique qui repoussent les particules entre elles.

Ce modèle général n'est pas limité au seul cas de l'interaction entre colloïdes. Il peut naturellement être généralisé aux interactions de courte portée entre deux surfaces en solution. Dans le cadre de nos expériences où les interactions électrostatiques jouent un rôle prépondérant, ce modèle paraît pleinement adapté.

Comme nous le verrons dans les paragraphes qui vont suivre l'obtention d'informations quantitatives précises sur l'intensité des forces d'interactions qui agissent sur la particules reste très difficile. Nous nous limiterons donc à une description qualitative des phénomènes d'interactions qui prennent place entre les particules et la surface des dispositifs.

3.5.3 Méthode de calcul

Note : L'ensemble des simulations qui sont présentées dans ce paragraphe ont été obtenues sous Matlab 6.5.

Approximations utilisées

Une méthode de calcul communément admise pour évaluer les interactions liées aux forces de Van der Waals et forces électrostatiques entre deux objets est de se placer dans le cas de l'approximation dite de Derjaguin [129, 130]. Cette approximation consiste à utiliser les énergies surfaciques d'interactions obtenues dans le cas de l'interaction entre deux plans infinis pour décrire l'interaction entre les deux objets considérés. L'approximation reste malheureusement très limitée et n'est applicable que dans le cas d'objets

présentant de très faibles rayons de courbures et se rapprochant donc le plus possible de la situation correspondant à deux plans infinis.

Une méthode de calcul est basée sur l'utilisation des énergies surfaciques d'interactions entre deux plans infinis :

Soit $E(h)$ l'énergie d'interaction par unité de surface obtenue dans le cas de deux plans infinis séparés par une distance h . Nous pouvons alors exprimer l'énergie d'interaction U entre la surface et une particule en utilisant l'approximation de Derjaguin :

$$U(D) \approx \iint E(h) dA \quad (3.2)$$

où D représente la distance séparant les deux points les plus proches de la surface et de la particule et dA la projection d'un élément de surface de la particule sur le substrat situé à une distance h de ce même substrat.

Adaptation de méthode d'intégration au cas d'un réseau d'électrodes

Pour la description de ces interactions, nous avons choisi de nous limiter à un système à deux dimensions en nous plaçant dans un plan perpendiculaire à la surface des dispositifs et au réseau d'électrodes. Le schéma de la figure 3.20 résume l'approche utilisée.

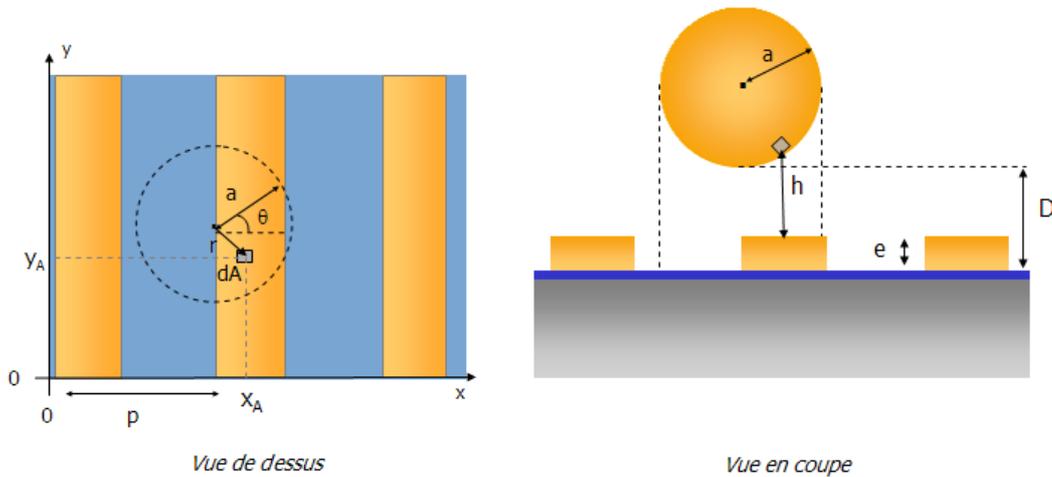


FIG. 3.20 – Illustration de la procédure d'intégration par éléments de surface. l représente l'espace inter-électrodes, p le pas du réseau constitué par les électrodes, e l'épaisseur des électrodes et a le rayon des nanoparticules, D la distance séparant la particule de la surface et h la distance entre la surface et un élément de surface de la nanoparticule.

La procédure d'intégration consiste à projeter chaque élément de surface de la sphère sur la surface du substrat et à considérer une valeur d'énergie d'interaction $E(h)$ pour chacun de ces éléments. Suivant les coordonnées de la projection de l'élément de surface sur le dispositif, la distance $h(x_A, y_A)$ est modulée ou pas par la hauteur e des électrodes.

$$\begin{aligned} h(x_A, y_A) &= e \text{ pour } (n \times p) < x_A < ((n + 1) \times p - l) \\ h(x_A, y_A) &= 0 \text{ pour } (n \times p) < x_A < (n \times p - l) \text{ avec } n \text{ entier} \end{aligned}$$

avec x_A et y_A les coordonnées du centre de la particule dans un plan de projection parallèle au substrat, l l'espace entre deux électrodes voisines, p le pas des électrodes.

L'intégration sur l'ensemble de la projection de la sphère sur la surface peut s'exprimer sous la forme :

$$U(D) \approx \int_0^{2\pi} \int_0^a E(h) r dr d\theta \quad (3.3)$$

ou $r dr d\theta$ représente l'élément de surface dans le plan de la projection (x, O, y) et a le rayon des nanoparticules.

3.5.4 Interactions d'origine électrostatique

3.5.4.1 Description du système

Pour la description des interactions électrostatiques, nous allons nous baser sur le système schématisé dans la figure 3.21.

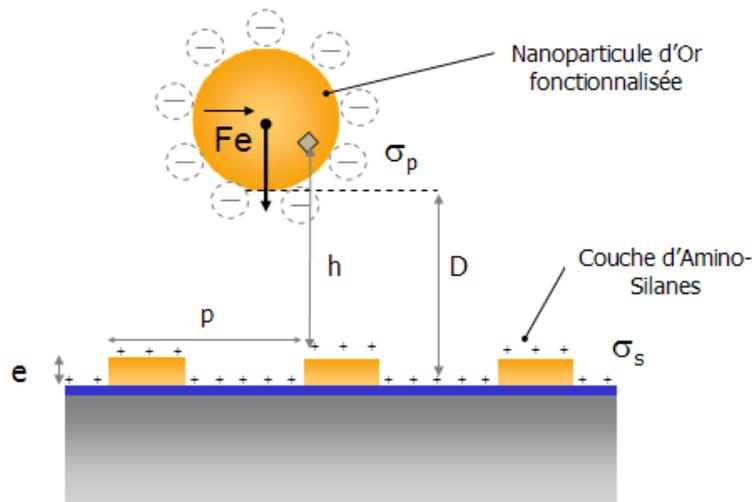


FIG. 3.21 – Description schématique du système considéré pour l'étude des interactions électrostatiques dans le modèle de la double couche électrostatique

Considérons tout d'abord une nanoparticule d'Or sphérique uniformément chargée de rayon a . Soit σ_p la charge surfacique de cette particule. Nous allons nous attacher à décrire l'interaction électrostatique entre cette particule en solution et la surface structurée des électrodes que nous allons définir comme étant uniformément chargée. Cette hypothèse a été justifiée expérimentalement (Cf 4.5.1). En effet, nous avons vu que la surface des électrodes permettait l'immobilisation des particules sans modification de densité par rapport à la surface de silice. Soit σ_s la charge surfacique homogène caractérisant surface.

En ce qui concerne les dimensions des électrodes, définissons e , la hauteur des électrodes, l l'espace inter-électrodes et p le pas du réseau constitué par les électrodes.

3.5.4.2 Contribution des interactions électrostatiques

Considérons le modèle de la double couche électrique développée en annexe A.2.1.2. Une grandeur caractéristique des interactions électrostatiques est la longueur de Debye $1/\kappa$. κ peut s'exprimer, pour des faibles potentiels de surface ($< 25mV$) par :

$$\kappa = \left(\frac{\sum_i \rho_{\infty i} e^2 z_i^2}{\varepsilon \varepsilon_0 k_B T} \right)^{1/2} \quad (3.4)$$

où e représente la charge d'un électron et $\rho_{\infty i}$ la concentration d'ions présents dans la solution ayant pour valence z_i .

Comme nous le détaillons en annexe, la valeur de la longueur de Debye $1/\kappa$ est caractéristique de la décroissance exponentielle en $e^{-\kappa x}$ du potentiel électrostatique dans l'électrolyte. Cette décroissance est caractérisée par l'équation dite de Debye-Huckel :

$$\Psi_x = \Psi_O e^{-\kappa x} \quad (3.5)$$

dans laquelle Ψ_x représente la valeur du potentiel à une distance x de l'élément de surface considéré et Ψ_O la valeur du potentiel défini à l'interface entre la couche de Stern et le solvant (voir Annexe A.2.1.2). Cette grandeur ne dépend que des propriétés du solvant dans lequel est plongé le système et nullement des propriétés des surfaces en interaction.

Pour exprimer la force F_e d'interaction entre un élément de surface de la particule et un élément de surface du substrat, nous pouvons nous baser sur l'expression de la force d'interaction par unité de surface entre deux plans infinis et uniformément chargés [129, 131]. Dans le cas des approximations exprimées en annexe (faible potentiel de surface $\psi_o \leq 0.25mV$, électrolyte de type 1 : 1), cette relation nous donne :

$$F_e = 64k_B T \rho_{\infty} \gamma_p \gamma_s e^{-\kappa h} \quad (3.6)$$

avec

- k_B : Constante de Boltzmann
- T : Température du milieu
- ρ_{∞} : Concentration de l'électrolyte hors de l'influence du système. Cette relation est valable dans un électrolyte de type 1 : 1 (ex : NaCl).
- κ : Inverse de la longueur de Debye
- $\gamma_p = \tanh\left(\frac{ze\psi_{po}}{4k_B T}\right)$ et $\gamma_s = \tanh\left(\frac{ze\psi_{so}}{4k_B T}\right)$ avec ψ_{po} et ψ_{so} les potentiels de Stern des particules et de la surface, z la valence des ions.

Nous pouvons ainsi donner l'expression de l'énergie d'interaction électrostatique $E_{el}(h)$ par unité de surface correspondant à l'expression de la force donnée ci-dessus :

$$E_{el}(h) = \frac{(64k_B T \rho_{\infty} \gamma_p \gamma_s)}{\kappa} e^{-\kappa h} \quad (3.7)$$

Définition de la valeur numérique des paramètres

Un problème se pose si nous souhaitons déterminer avec précision l'amplitude des forces d'interactions. En effet, l'utilisation des équations précédentes nécessite une connaissance précise d'une part de la composition de la solution colloïdale et d'autre part des densités de dépôt (groupements citrate sur les particules et amino-silanes sur la surface

du dispositif). Malheureusement, nous n'avons obtenu que très peu d'informations sur la composition exacte de la solution colloïdale qui a été commandée auprès de British Biocell International. Comme nous l'avons vu, il nous sera également difficile de déterminer la densité de greffage des molécules d'amino-silane dans la mesure où nous n'avons pas une monocouche autoassemblée mais un film polymérisé dont il est difficile d'évaluer la morphologie. Aussi, nous allons nous limiter à une interprétation qualitative des phénomènes en essayant de démontrer l'existence de sites préférentiels d'immobilisation.

Si les nanoparticules se déposent préférentiellement dans l'espace inter-électrodes, c'est qu'il existe des forces d'attraction dont la portée permet de modifier l'approche des nanoparticules à proximité de la surface. Entre autre, ces forces permettent de différencier l'espace inter-électrodes des électrodes elles mêmes. La portée de ces forces est donc, en première approximation, du même ordre de grandeur que le pas du réseau d'électrodes. Ce raisonnement nous permet de préciser de manière un peu plus qualitative ce que nous entendons par proximité de surface.

La longueur de Debye est une grandeur caractéristique de la portée des forces d'interactions électrostatiques et nous permet donc de définir la distance à partir de laquelle deux surfaces vont interagir suivant le modèle proposé. Suivant le système, les longueurs de Debye peuvent varier de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres [129]. Dans notre cas, nous choisirons une longueur de Debye ($1/\kappa$) égale au pas du réseau d'électrodes (100nm). En effet, si nous considérons que les forces électrostatiques sont responsables de la localisation des particules, celles-ci doivent favoriser le dépôt dans l'espace inter-électrodes et non pas sur les électrodes.

Rappelons que ces choix arbitraires sont cohérents avec nos expériences mais ne sont justifiés par aucune mesure précise ou connaissance des paramètres ($\rho_\infty, \gamma_p, \gamma_s$). Le choix de ces valeurs nous permettra simplement de mener le calcul jusqu'au bout et d'analyser qualitativement les tendances.

3.5.4.3 Variations du potentiel électrostatique

Dans un premier temps, nous avons simulé la répartition du potentiel électrostatique à proximité de la surface jusqu'à des distances de l'ordre de la longueur de Debye. Nous avons considéré l'équation 3.5 que nous avons appliquée à chaque élément de surface du dispositif pour calculer le potentiel résultant en chaque point de l'espace.

Nous avons émis quelques restrictions concernant la répartition du potentiel. En effet, nous avons considéré que la contribution des zones de la surface non visibles (i.e. masquée par les électrodes) depuis le point de l'espace considéré était négligeable. Cette hypothèse est à l'origine des discontinuités que nous pouvons observer au voisinage des électrodes sur la figure 3.22. Cette figure présente la répartition du potentiel résultant au voisinage de deux électrodes de 35nm de large, espacées de 65nm et présentant une épaisseur de 20nm.

A priori, la répartition du potentiel ne suggère pas de zones d'attraction favorisées par la topologie des structures. La contribution supplémentaire des flancs des électrodes vis-à-vis de l'espace inter-électrodes ne semble pas modifier de façon sensible la répartition du potentiel. Aussi, ces premiers résultats ne suggèrent pas un dépôt des particules entre les électrodes. Au contraire, il semble qu'à une distance donnée du plan du substrat, le potentiel soit plus intense à la vertical des électrodes.

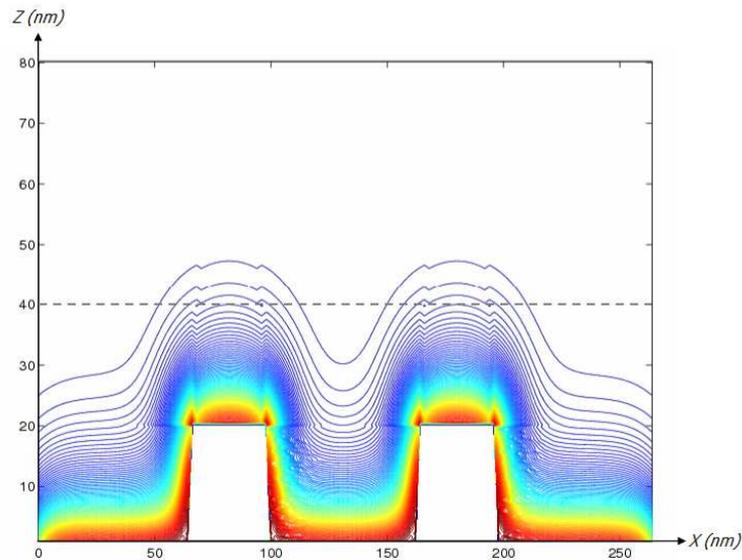


FIG. 3.22 – Tracé des lignes équipotentiellles (unités arbitraires) décrivant les variations du potentiel attractif exercé par la surface à proximité d'un réseau d'électrodes interdiguées de 65nm de large, au pas de 100nm et de 20nm d'épaisseur.

3.5.4.4 Variation de l'énergie d'interaction dû aux forces électrostatiques

Considérons maintenant une particule métallique chargée en interaction avec a surface de l'électrode. Soit D l'espace séparant la particule de la surface du dispositif.

En utilisant les approximations énoncées au paragraphe 3.5.3 et l'expression de $E_{el}(h)$ (3.7), nous pouvons évaluer les variations relatives de l'énergie d'interaction U entre la particule le long d'un axe perpendiculaire au réseau d'électrodes. La figure 3.23 nous donne un aperçu des résultats obtenus dans le cas d'un réseau d'électrodes de 65nm de large, au pas de 100nm et de 20nm d'épaisseur pour une valeur de $D = 25nm$.

Nous voyons, que malgré la dimension des particules, la répartition du potentiel d'interaction électrostatique sur la surface suit de façon très fidèle le contour des électrodes et présente un minimum de potentiel sur la surface des électrodes. Les variations relatives de U au voisinage de la surface ont été évaluées autour de 10%.

Ce premier résultat numérique indiquerait donc une localisation du dépôt de particule sur les électrodes. Ce phénomène a effectivement été observé mais pour une faible proportion de particules. Si nous nous intéressons au cas de particules de 20nm de rayon sur le même dispositif, pour une même séparation $D=25nm$, nous obtenons une variation relative de l'énergie d'interaction représentée sur la figure 3.24

Dans ce cas, la variation relative du potentiel est de l'ordre de 20% et semble démontrer une plus grande sélectivité entre les électrodes et les zones de silice. Dans le cas présent, le diamètre des particules est du même ordre de grandeur que la largeur des électrodes, situation qui accroît logiquement l'interaction entre la particule et les électrodes. Ces simulations semblent donc confirmer une localisation du dépôt sur les électrodes.

L'ensemble de ces résultats numériques ne permet pas d'interpréter la localisation de la majorité des particules dans l'espace inter-électrode. Toutefois, si nous nous intéressons au cas d'une particule située dans l'espace inter-électrodes nous voyons que

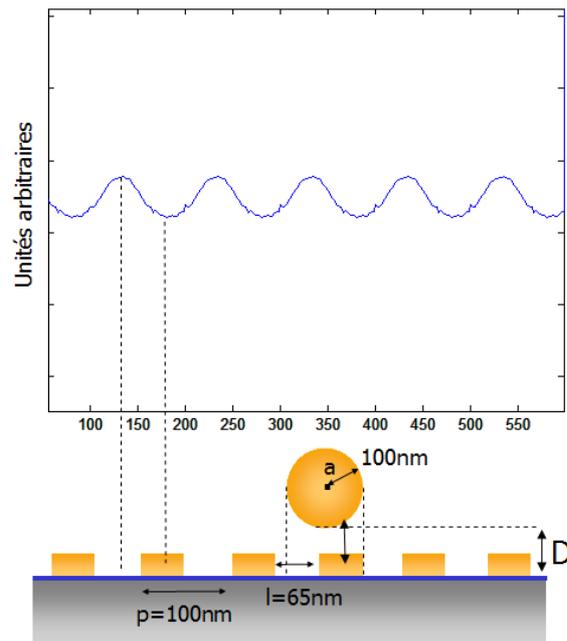


FIG. 3.23 – Variations relatives de l'énergie d'interaction électrostatique entre une particule chargée de 100nm de diamètre sur une réseau d'électrodes de 65nm de large au pas de 100nm et de 20 nm d'épaisseur. Le profil a été obtenu suivant un axe perpendiculaire aux électrodes pour une séparation entre la particule et le substrat de 25nm.

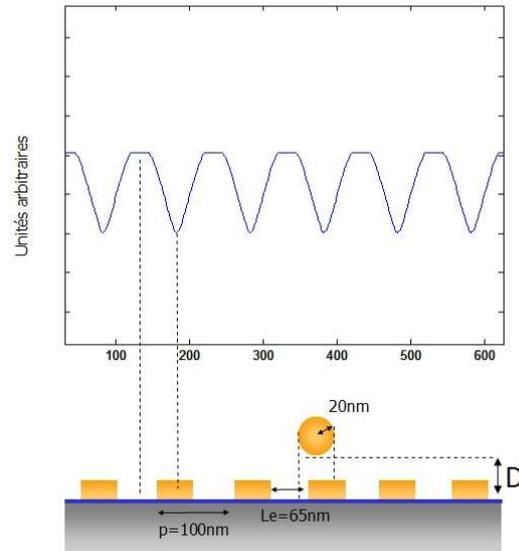


FIG. 3.24 – Variations relatives de l'énergie d'interaction entre une particule chargée de 40nm de diamètre sur une réseau d'électrodes de 65nm de large au pas de 100nm et de 20 nm d'épaisseur. Le profil a été obtenu suivant un axe perpendiculaire aux électrodes pour une séparation entre la particule et le substrat de 25nm.

pour des distance D de 5nm par rapport à la surface de silice, la valeur relative du potentiel d'interaction est supérieure de 15% à la valeur correspondante à une particule

située à 5nm de la surface sur une électrode. Ce résultat s'explique par l'interaction de la particule non seulement avec la surface de silice mais également avec les électrodes qui constituent dans ce cas un puits dans lequel la particule vient se loger.

Le modèle que nous avons utilisé reste fortement limité par les approximations que nous avons considérées (forme des flancs, particule sphérique,...). Cependant, il semble que les tendances qu'il décrit soient cohérentes et nous orientent vers une interaction maximale au niveau des électrodes. Nous avons pu tester plusieurs valeurs de longueur de debye (entre 10 et 200nm), plusieurs dimensions d'électrodes (largeurs comprises entre 10 et 50nm) et, dans chaque cas, les électrodes apparaissent comme des sites d'attraction préférentiels.

3.5.5 Forces de Van der Waals

3.5.5.1 Contribution des forces de Van der Waals

Bien que de très courtes portées, les forces de Van der Waals jouent un rôle central dans les phénomènes d'interactions à l'échelle moléculaire. Ces forces sont omniprésentes et dans le cas d'objets macroscopiques en interaction, peuvent être considérées comme des forces à longue distance [129].

Une description détaillée des interactions de Van der Waals est donnée en Annexe A.2.1.2. Rappelons simplement l'expression de la force d'interaction entre deux molécules :

$$w(d) = \frac{-C}{d^6} (J) \quad (3.8)$$

où d représente la distance entre les éléments considérés. Cette expression se généralise dans le cas de deux solides en interaction. Dans ce cas, la constante C est liée à une constante appelée constante de Hamaker A par la relation [129] :

$$A = \pi^2 C \rho_1 \rho_2 (J) \quad (3.9)$$

où ρ_1 et ρ_2 sont les densités respectives des deux (matériaux) solides en interaction.

Rappelons les hypothèses émises par Hamaker pour permettre l'intégration de la relation précédente : considérons deux milieux continus, homogènes et considérons que l'interaction de Van der Waals est additive [129].

La portée des forces de Van der Waals reste difficile à évaluer sans connaissance précise des constantes de Hamaker mises en jeu. Toutefois nous pouvons estimer les ordres de grandeur en considérant une valeur de constante de Hamaker correspondant au système Or-eau-Or. Considérons l'équation 3.10 permettant de déterminer l'énergie d'interaction entre une particule sphérique et une surface infinie.

$$E_{vdw} = -A \cdot \frac{a}{6D} \quad (3.10)$$

ou a est le rayon de la particule.

Nous prenons une valeur de A parmi les plus élevées, $A \simeq 10^{-20}$ J [129, 132] qui correspond à la constante de Hamaker pour le système Or-Eau-Or.

Nous trouvons, dans le cas d'une particule de 50nm de rayon située à 20nm de la surface $E = 4.16 \times 10^{-21} J \simeq kT$. Nous voyons que cette valeur chute à 0.1kT à 200nm de la surface. Ce résultat nous donne une première indication très importante pour l'interprétation des simulations proposées. D'une part, nous voyons que pour des distances supérieures à quelques dizaines de nanomètres, l'énergie liée à l'agitation thermique devient largement supérieure à l'énergie d'interaction due aux forces de Van der Waals. Nous limiterons donc notre étude à une zone proche de la surface (<100nm). D'autre part, nous devons rester prudent quant à l'influence de ces forces sur la localisation du dépôt de particules. En effet, nous avons choisi une constante de Hamaker volontairement élevée qui ne correspond probablement pas à notre système (couche de silane sur la surface) mais qui traduit l'influence maximale que peuvent présenter les forces mises en jeu.

3.5.5.2 Variation de l'énergie d'interaction au voisinage de la surface

Comme dans le cas des interactions électrostatiques, il nous est possible d'exprimer l'énergie surfacique d'interaction E_{vdw} entre deux plans infinis séparés par une distance h :

$$E_{vdw}(h) = -\frac{A}{12\pi h^2} \quad (3.11)$$

En utilisant une approche strictement similaire à celle que nous venons de présenter dans le cas des interactions électrostatiques, et en particulier en remplaçant l'expression de $E_{el}(h)$ par l'expression de $E_{vdw}(h)$, il nous est possible de représenter les variations de l'énergie d'interaction liée aux forces de Van der Waals. La figure 3.25 nous donne un aperçu des résultats obtenus dans le cas d'un réseau d'électrodes de 65nm de large, au pas de 100nm et de 20nm d'épaisseur pour une valeur de $D=25$ nm.

De la même façon le modèle que nous avons utilisé nous indique un minimum de la valeur de l'énergie d'interaction liée aux forces de Van der Waals sur chaque électrode. La méthode de calcul indique des résultats cohérents, influencés en grande partie par les effets liés à la topologie de la surface, mais une fois encore le modèle ne nous permet pas de décrire la tendance que nous avons observée expérimentalement.

3.5.6 Synthèse

Les simulations que nous avons mené autour du modèle DLVO restent limitées pour l'interprétation des phénomènes de localisation des particules qui se déposent majoritairement dans les espaces inter-électrodes. Nous avons pu observer sur les images des dispositifs que quelques particules étaient déposées sur les électrodes comme tendraient à le démontrer les résultats des simulations.

La seule prise en compte des interactions électrostatiques et de Van der Waals correspondant à l'approche la plus simple du modèle DLVO semble insuffisante pour expliquer l'influence de la topologie de la surface sur le dépôt. Il est important de noter que les simulations que nous avons pu réaliser sont basées sur un système à l'état statique. Il est probable que la prise en compte des phénomènes liés à la dynamique de la particule en solution permettrait de mieux décrire l'influence de la topologie de la surface sur

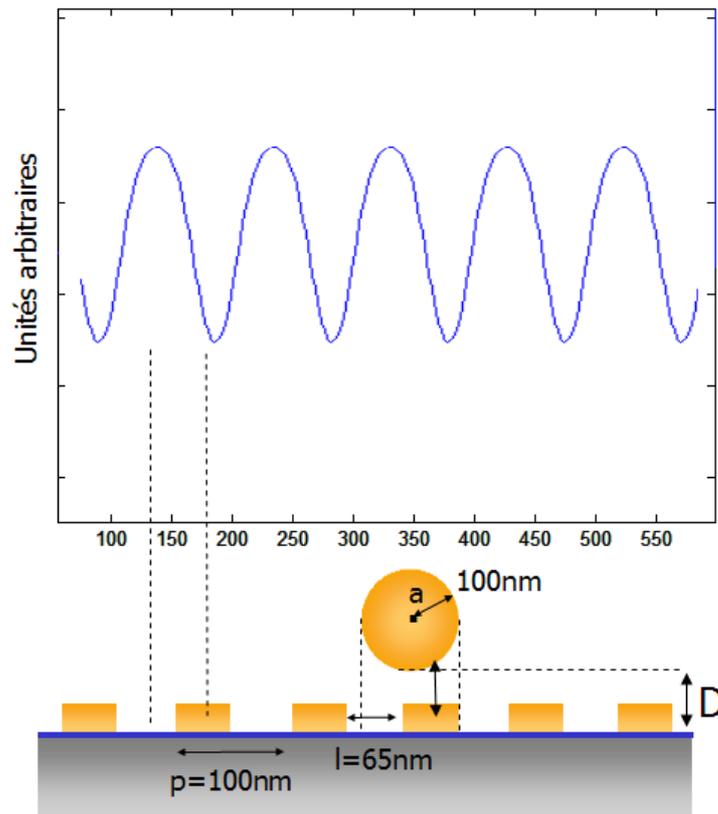


FIG. 3.25 – Variations relatives de l'énergie d'interaction liée aux forces de Van der Waals entre une particule de 100nm de diamètre sur une réseau d'électrodes de 65nm de large au pas de 100nm et de 20 nm d'épaisseur. Le profil a été obtenu suivant un axe perpendiculaire aux électrodes pour une séparation entre la particule et le substrat de 25nm.

les mouvements d'une particule située à proximité. En particulier, des effets de confinement induits par la topologie de la surface ont pu être mis en évidence récemment et ont été utilisés pour des applications dédiées à la construction de structures cristallines par empilement de particules [133, 134].

Des simulations plus complètes prenant en compte la diffusion des nanoparticules dans la solution au voisinage de la surface seraient nécessaires pour aller plus loin dans notre d'interprétation.

3.6 Caractérisations électriques des dispositifs

3.6.1 Objectifs

Le premier aspect de notre schéma de détection, à savoir la conformation du dépôt sur les nano-électrodes, vient d'être discuté dans les paragraphes précédents. Ces premiers résultats nous ont permis de valider l'étape de dépôt des nanoparticules sur nos dispositifs et surtout de démontrer que le pontage de deux électrodes par une nanoparticule semble favorisé par les structures elles mêmes.

Le deuxième aspect concerne bien évidemment les modifications de la réponse électrique après l'immobilisation des particules sur la surface. Il nous faut maintenant démontrer que le dépôt de nanoparticules se traduit effectivement par un changement de la conductivité. Notre premier objectif sera donc consacré à l'étude de l'évolution de la conductivité des dispositifs au cours des étapes de traitement et de dépôt. Pour cela, nous reproduirons le protocole décrit précédemment en tenant bien compte de l'influence de chaque étape sur l'état de surface et sur la conductance. Il s'agit de cerner l'origine exacte des modifications éventuelles de conductivité. En effet, les différentes étapes de traitement peuvent introduire des dépôts résiduels susceptibles de modifier la réponse électrique des dispositifs et fausser la détection.

Une fois l'origine de la conductivité identifiée, nous nous intéresserons à la compréhension des phénomènes de conduction entre les nanoparticules et les électrodes. Une partie de ce paragraphe sera donc consacrée à l'interprétation du transport électrique entre nanoparticules et électrodes.

Il s'agira ensuite d'évaluer le système de détection par rapport à sa sensibilité, sa sélectivité et sa dépendance vis-à-vis de la densité de particules sur la surface. Cet aspect est fondamental si l'on souhaite utiliser le schéma de détection pour des mesures quantitatives.

Une dernière partie sera consacrée aux premiers résultats concernant l'utilisation des dispositifs pour la détection de l'immobilisation de particules durant l'étape d'incubation. Cette possibilité ouvre des perspectives intéressantes en particulier pour des applications de détection biologique en solution.

3.6.2 Évolution de la conductance au cours du protocole de dépôt

Note : Le système de caractérisation électrique utilisé tout au long des expériences est décrit en annexe 4.7.

Pour cette étude, nous allons reprendre l'exemple de l'échantillon présenté dans la section 3.4.2. Nous nous sommes intéressés à l'évolution de la réponse électrique des réseaux d'électrodes interdigitées au cours des étapes de traitement menant à l'immobilisation de nanoparticules fonctionnalisées par des groupements citrate. Rappelons les dimensions du dispositif : il s'agit d'un réseau de 39 nanoelectrodes interdigitées séparées de 65nm et présentant une largeur de 35 nm. La surface totale couverte par les électrodes est de l'ordre de $10\mu m^2$. L'épaisseur du dépôt métallique constituant les électrodes est de 20nm. Enfin, le diamètre des nanoparticules reste identique : 100nm.

La figure 3.26 nous donne l'évolution de la caractéristique courant-tension du dispositif au cours des différentes étapes du protocole, à savoir la silanisation et le dépôt des particules.

Dispositif vierge

Comme nous l'avons vu au chapitre 2, les dispositifs vierges présentent une très faible conductance. Avant le début des étapes de fonctionnalisation, nous observons un niveau de courant difficilement mesurable et inférieur à 50fA à 1V. Cette valeur correspond à une résistance supérieure à $20T\Omega$.

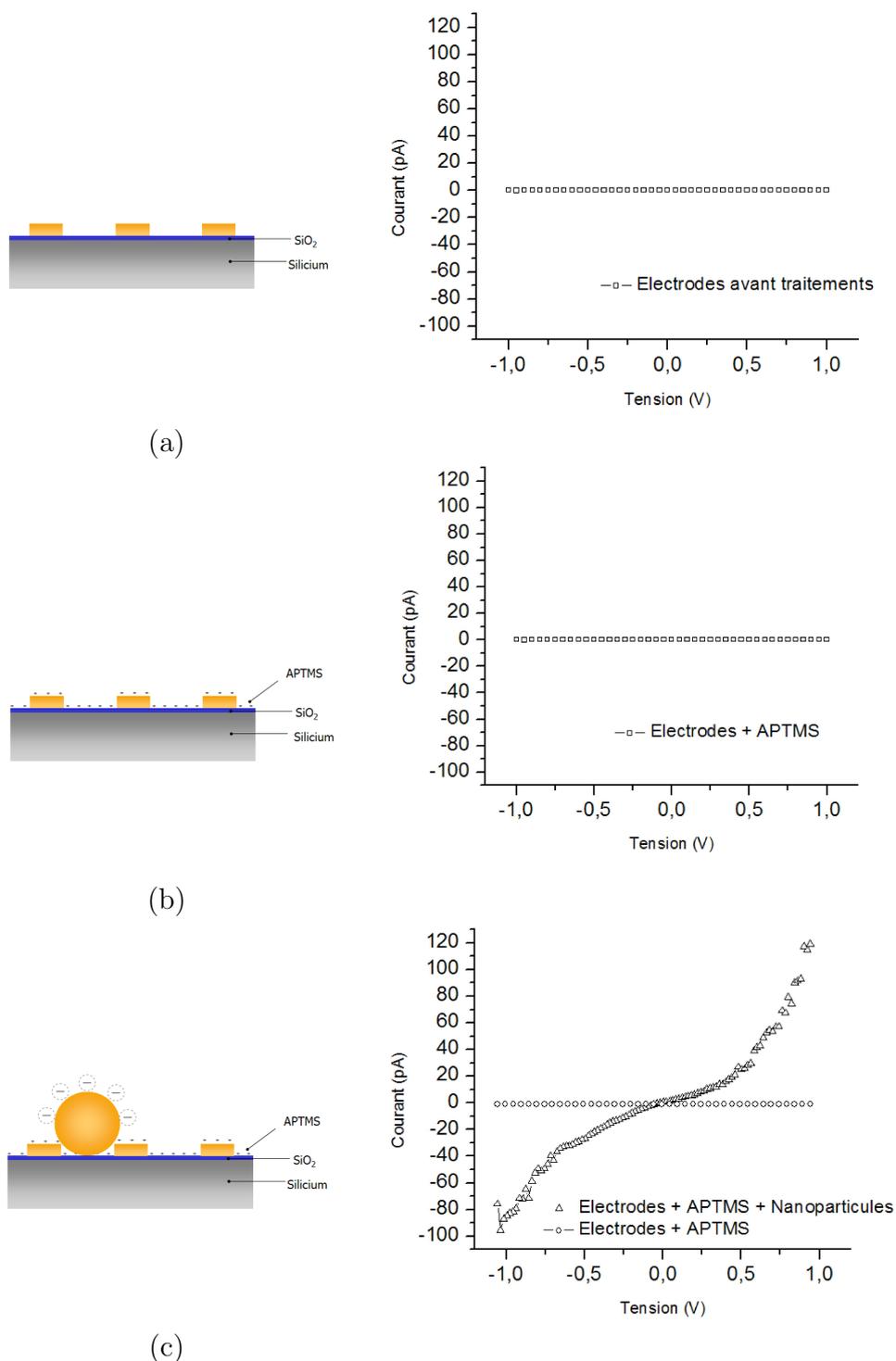


FIG. 3.26 – Évolution des caractéristiques courant(pA) - tension(V) d'un dispositif basé sur un réseau d'électrodes interdigitées au cours des étapes menant au dépôt de nanoparticules d'Or Dispositif avant traitement (a), après silanisation lavage et séchage (b), après dépôt des particules (c), lavages et séchage. Les 39 électrodes présentent une épaisseur de 20nm sont espacées de 65nm. Le diamètre moyen des particules est de 100nm.

Dispositif après silanisation

Après la première étape de silanisation, de lavage et de séchage (Cf 3.3.3.1), nous n'observons pas de modification apparente de la conductance du dispositif. La courbe $I(V)$ nous indique toujours une valeur du courant inférieure à 50fA sous 1V. Ce faible niveau de courant est un facteur important dans notre protocole car il est une confirmation supplémentaire de la qualité de l'état de la surface. Il s'agit d'un résultat clef qui nous permettra de donner une interprétation claire de l'origine des modifications éventuelles de la conductance .

Dispositif après incubation de la solution colloïdale

Après incubation de la solution colloïdale, nous observons cette fois une diminution très importante de la résistance. La valeur du courant atteint maintenant 120pA sous 1V de polarisation ce qui correspond à une variation de plus de quatre ordres de grandeur par rapport à la situation initiale. La résistance dynamique Rd équivalente sous 1V de polarisation chute à :

$$Rd = \left(\frac{\delta V}{\delta I}\right)_{|V|=1V} \approx 2.5G\Omega$$

Ce premier résultat nous montre clairement qu'une variation de conductance est associée à l'étape d'incubation de la solution colloïdale.

3.6.3 Interprétation du transport électrique

Les réflexions présentées dans ce paragraphe reposent sur un petit nombre de résultats expérimentaux et ne doivent être considérées que comme des tendances qu'il conviendra d'affiner au travers de nouvelles expériences. Une étude plus systématique est en cours au sein du groupe afin de mieux appréhender la relation entre le niveau de conductivité du dispositif et le nombre de nanoparticules immobilisées sur la zone active.

3.6.3.1 Origine de la conduction

D'après les résultats obtenus concernant le dépôt des particules sur les dispositifs et les variations des caractéristiques électriques associées, nous pouvons affirmer avec certitude que l'origine du courant et de ses variations est liée uniquement aux particules métalliques déposées. La détection du dépôt par mesures électriques est donc possible. La nature de la réponse électrique reste cependant à éclaircir. Si nous souhaitons caractériser ce "détecteur" en particulier pour évaluer sa sensibilité et sa linéarité, une interprétation des phénomènes de conduction est nécessaire.

A la différence des travaux présentés en introduction [91, 88, 90, 70], notre schéma permet à chaque nanoparticule greffée de conduire à une variation de la conductivité globale du dispositif. Toutefois, même si le dépôt semble conduire de façon quasi-systématique à l'immobilisation des nanoparticules dans l'espace inter-électrodes, nous ne savons pas si la réponse induite par chaque particule est identique et reproductible. Ce paramètre sera capital d'une part pour évaluer la sensibilité du dispositif et d'autre part pour pouvoir corrélérer la densité de particules à la réponse électrique obtenue.

3.6.3.2 Linéarité

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser à l'évolution de la réponse des dispositifs en fonction de la densité du dépôt. Bien que nous n'ayons mené que peu d'expériences complémentaires sur l'immobilisation de particules par interactions électrostatiques, ces premiers résultats pourront nous renseigner sur l'évolution de la réponse électrique en fonction du nombre de particules greffées. Nous pouvons comparer les deux exemples de résultats de la figure 3.27 qui regroupe des observations MEB et les caractéristiques électriques de deux échantillons présentant des densités de particules différentes.

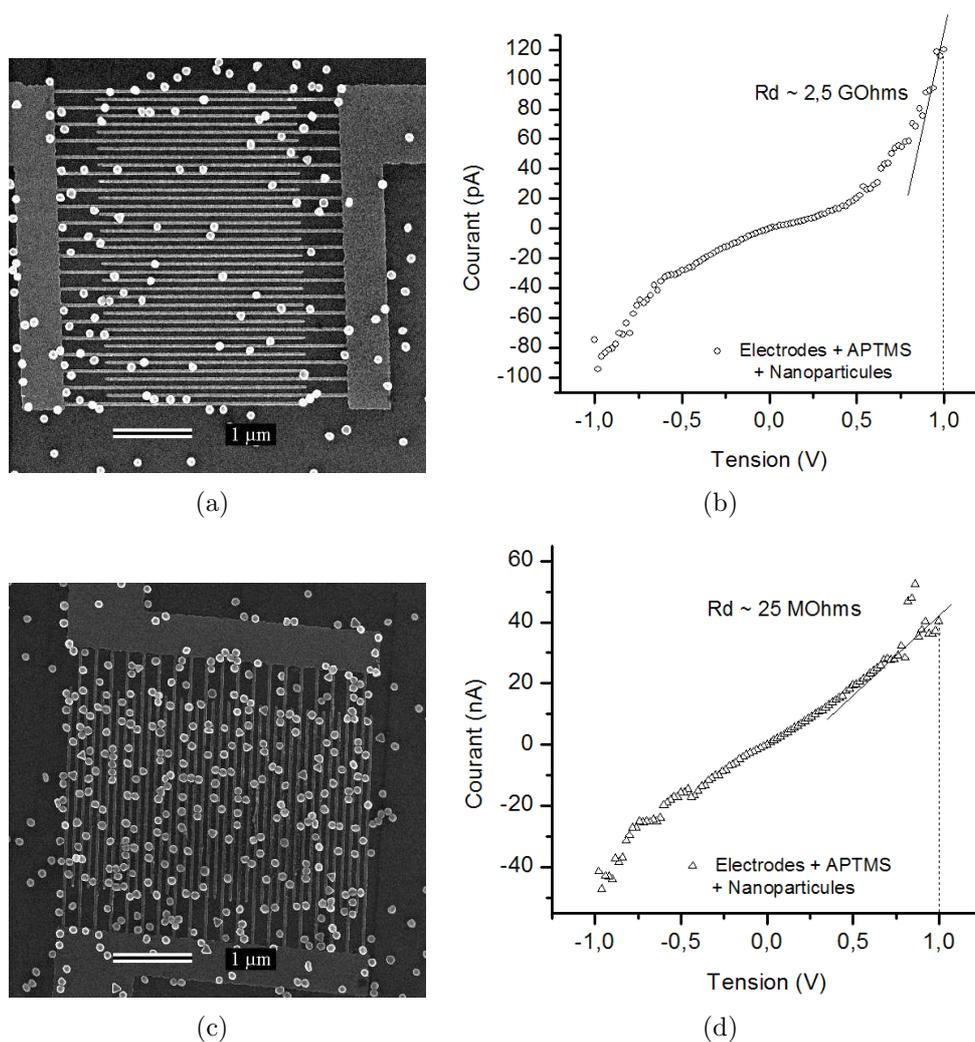


FIG. 3.27 – Deux exemples de dispositifs présentant des densités de dépôt différentes et les caractéristiques courant/tension associées.

Intéressons-nous dans un premier temps à l'exemple de la figure 3.27(a). Dans cet exemple, la densité de particules a été volontairement limitée. En conséquence, la plupart des particules greffées dans l'espace inter-électrodes sont isolées. Nous pouvons estimer une valeur moyenne de résistance attribuable à chaque résistance en nous plaçant dans l'approximation d'un comportement de type ohmique. Pour cela, considérons

que chacune des particules crée un chemin de conduction indépendant et contribue à la réponse globale du dispositif. Le réseau de particules constitue l'équivalent d'un réseau de résistance en parallèle. A partir d'image MEB, nous pouvons évaluer le nombre de nanoparticules situées dans l'espace inter-électrodes. Nous avons estimé ce nombre à $N = 35$ particules. Connaissant la conductance du dispositif à 1V, nous pouvons calculer R_i qui représente la résistance moyenne du chemin de conduction généré par une nanoparticule :

$$R_i = (N \times \frac{\delta V}{\delta I})_{|V|=1V} \approx 2.5 \times 10^9 \times 35 \approx 90GOhms$$

Considérons maintenant le cas de la figure 3.27(c). A première vue, le niveau de courant qui atteint cette fois 40 nA à 1V dénote bien de l'augmentation de la densité de particules. Nous avons dans ce cas :

$$R_d = (\frac{\delta V}{\delta I})_{|V|=1V} \approx 25M\Omega$$

A partir de cette première valeur, nous pouvons, comme dans le cas précédent, estimer une valeur moyenne de résistance attribuable à chaque résistance. Nous avons pu évaluer le nombre de nanoparticules participant satisfaisant aux conditions de pontage à 210. Nous trouvons alors :

$$R_i = (N \times \frac{\delta V}{\delta I})_{|V|=1V} \approx 25 \times 10^6 \times 210 \approx 5.25GOhms$$

Nous voyons que la valeur attribuable à chaque particule est sensiblement inférieure à la valeur trouvée dans le premier cas. Une explication peut être avancée au regard de l'observation MEB du dispositif après dépôt. Le comptage des particules participant à la conduction du courant paraît cette fois plus difficile que dans le premier cas. En effet, malgré les effets de répulsion que nous avons décrits dans la première partie, les particules ne se déposent pas toujours de façon isolée et certaines d'entre elles se juxtaposent sur le dispositif pour former des réseaux de quelques éléments. La figure 3.28 nous donne quelques exemples d'assemblages que nous avons pu rencontrer.

Nous voyons que certaines des particules présentes sur le dispositif s'organisent entre les deux électrodes de façon ordonnée en formant des assemblages de formes linéaires (en suivant strictement l'espace inter-électrodes) ou plus compactes en associant des particules situées de part et d'autre d'une même électrode. Il devient ainsi beaucoup plus difficile d'identifier les chemins de conduction existants entre les particules et les électrodes. Cette observation nous permet de donner une interprétation partielle à la valeur plus faible de R_i , chaque particule pouvant être associée dans ce cas à plusieurs chemins de conduction.

Par ailleurs, nous avons déjà souligné qu'il semble peu probable que les chemins de conduction associés à chaque particule soient identiques. En effet, même si nous associons à chacune des particules un chemin de conduction, nous ne connaissons pas la nature du contact pour chacune d'entre elles et il semble peu probable, vu les diverses conformations adoptées par les particules, que leur réponses soient identiques.

Tous ces éléments, nous amènent à penser qu'il sera difficile d'obtenir une réponse linéaire en fonction du nombre de nanoparticules présents sur le dispositif. Par contre,

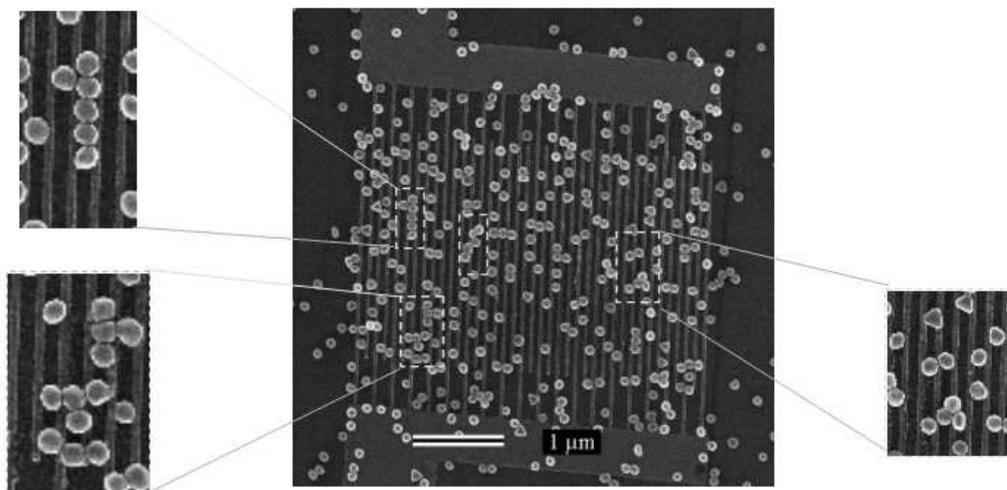


FIG. 3.28 – Image MEB donnant quelques exemples d’assemblages de nanoparticules (diamètre moyen 100nm) sur un réseau de nanoélectrodes (largeur : 35nm, pas : 100nm, épaisseur : 20nm).

toutes nos expériences montrent que le niveau de conductance croît bien en proportion du nombre de nanoparticules immobilisées.

3.6.3.3 Nature du contact

Le greffage des particules semblent bien conduire à un pontage des électrodes et entraîner une modification de la résistance de la jonction. Toutefois, la nature du contact entre les particules et les électrodes reste à éclaircir. La caractéristique $I(V)$ du dispositif après dépôt ne montre pas une dépendance linéaire du courant en fonction de la tension de polarisation. La nature du contact n’est donc pas de type Ohmique et laisse supposer que les différents traitements de surface servent de barrière au passage du courant.

En effet, le dépôt des particules sur la surface a nécessité une fonctionnalisation du substrat. Comme nous l’avons vu précédemment, celui-ci conduit vraisemblablement à un dépôt de molécules de type silane amine sur la surface des électrodes. Par ailleurs, nous savons que la surface des colloïdes est fonctionnalisée par des composés présentant un groupement terminal de type citrate. Même si nous ne connaissons pas la nature exacte et la composition des molécules couvrant les particules et le substrat elles vont constituer une barrière pour le passage du courant. Le transport des électrons entre les électrodes et les nanoparticules s’effectue donc par effet tunnel au travers des différentes couches moléculaires déposées sur les électrodes et autour des nanoparticules.

Cette hypothèse est confirmée par les nombreux travaux publiés concernant l’utilisation de nanoparticules métalliques pour l’étude du transport électronique au travers de molécules [135, 136]. Les approches utilisées pour ces études sont similaires à notre schéma de détection. La molécule d’intérêt est tout d’abord greffée sur la surface de deux électrodes en vis-à-vis. Une particule métallique est ensuite orientée et immobilisée (par piégeage électrostatique) pour ponter les deux électrodes et fermer le circuit. Ce

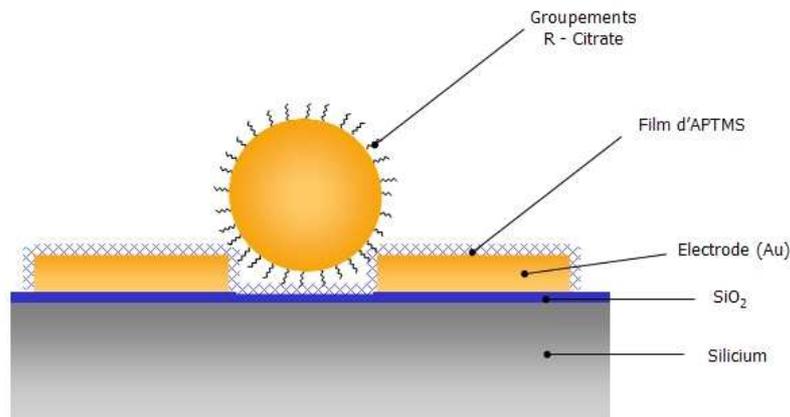


FIG. 3.29 – Schéma "idéalisé" illustrant la présence de deux jonctions tunnels formées par les couches moléculaires de citrate et d'amino-silane situées à l'interface entre une particule et une électrode.

dispositif permet donc la formation de deux jonctions tunnels constituées par les films moléculaires situés entre les électrodes et la nanoparticule (Cf. figure 3.29). Dans le cas où la particule est déposée directement sans traitement préalable des électrodes, les caractéristiques $I(V)$ démontrées pour les dispositifs montrent une évolution quasi linéaire du courant en fonction de la tension de polarisation, prouvant la formation d'un contact Ohmique entre la particule et les électrodes. Lorsque les électrodes sont fonctionnalisées par les molécules étudiées, la réponse du dispositif présente un profil non linéaire induit par les deux jonctions tunnels constituées par le film moléculaire. Nous retrouvons ici la possibilité d'utiliser ce type de dispositif pour l'étude du transport électrique au sein de molécules. Une approche très similaire [36] a été présentée en introduction dans le cas des études liées à l'électronique moléculaire et a servi de point de départ pour la mise au point de notre schéma de détection. Nous voyons ici que l'architecture des électrodes que nous avons fabriquées reste compatible avec l'adressage de nano-objets tout comme les systèmes basés sur deux électrodes de faibles largeur en vis-à-vis.

3.6.3.4 Interprétation du transport électrique

Dans ce paragraphe, nous avons souhaité donner un début d'interprétation au phénomène de transport électrique entre les électrodes et les nanoparticules. Notre objectif n'est en aucun cas de mener une étude détaillée de ces phénomènes mais de proposer des pistes de réflexion à partir des résultats que nous avons pu obtenir à ce jour.

Considérons le schéma proposé dans la figure 3.29 mettant en jeu deux jonctions tunnels en série. Il nous est possible d'exprimer la densité de courant $J(V, T)$ qui traverse une nanoparticule à partir du modèle de Stratton [137] (décrit en Annexe B.3). Si nous considérons une jonction tunnel caractérisée par une barrière rectangulaire de hauteur ϕ_o et de largeur s , formée par deux interfaces métal-isolant, le modèle de Stratton nous permet d'exprimer J dans deux régimes distincts :

A faible polarisation ($V < \phi_o$), la densité de courant est de la forme :

$$J(V) = \alpha \sinh\left(\frac{\alpha^* s V}{4\phi_o^{1/2}}\right) \quad (3.12)$$

ou α^* représente la masse effective de l'électron dans la jonction.

A forte polarisation, l'expression de la densité de courant traversant la jonction en fonction de la tension de polarisation V devient :

$$J(V) = \alpha V^2 \exp\left(\frac{-2\alpha^* s \phi_o^{3/2}}{3V}\right) \quad (3.13)$$

Dans ce cas, on note que $\ln(J/V^2)$ varie linéairement avec $1/V$. Nous nous trouvons ici dans le régime dit de Fowler-Nordheim [138].

Si nous reprenons la courbe $I(V)$ obtenue au paragraphe 3.27(b), nous pouvons tracer l'évolution de $\ln(I/V^2)$ en fonction de $1/V$ (Cf Figure 3.30). Cette courbe peut être corrélée à la variation de $\ln(J/V^2)$ par simple translation le long de l'axe des ordonnées.

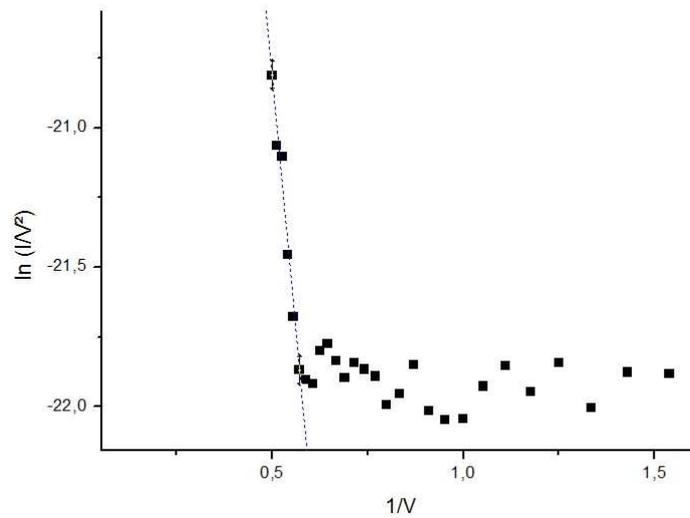


FIG. 3.30 – Tracé des variations de $\ln(I/V^2)$ en fonction de $1/V$ obtenu pour le dispositif présenté à la figure 3.27(a)

Remarque : Les objectifs de nos premières mesures concernaient essentiellement l'observation du comportement de la conductance lors du greffage des nanoparticules et une attention particulière a été consacrée à préserver les dispositifs en limitant les valeurs maximales des tensions de polarisation utilisées. Ceci explique le faible nombre de points d'acquisition et le manque d'information sur le transport électrique pour des valeurs plus élevées de la tension.

Pour les plus fortes valeurs de V et donc pour les plus faibles valeurs de $1/V$ nous retrouvons un comportement linéaire de type Fowler-Nordheim. La pente P de la droite correspondante s'exprime par la relation :

$$P = -2/3\alpha^* s \phi_o^{3/2} \quad (3.14)$$

La valeur de P nous permet de déterminer une valeur de $s \cdot \phi_o^{3/2} \approx 3.46$. A cette valeur correspondent plusieurs couples de valeurs de travail de sortie et de la largeur de la jonction. Il semble que le comportement coïncide avec un comportement de type Fowler-Nordheim. Toutefois, il reste difficile, à partir de ce résultat de donner indépendamment une valeur du travail de sortie ϕ_o et de la jonction tunnel s . Nous ne disposons que de peu d'informations en ce qui concerne l'épaisseur et la structure des films moléculaires formés par l'APTMS sur le substrat et par les groupements citrate sur la surface des nanoparticules.

La seule conclusion que nous puissions formuler à l'issue du faible nombre de mesures réalisées est que le comportement électrique des dispositifs après adsorption des nanoparticules peut être raisonnablement ajusté par le modèle de Fowler-Nordheim. Ce résultat semble confirmer la présence de jonctions tunnels entre les particules et les électrodes. Comme vraisemblablement toutes les jonctions tunnels créées sont fluctuantes (dispersion sur s et ϕ_o), il est là aussi peu probable d'espérer un comportement linéaire de la conductance en fonction du nombre de nanoparticules.

3.6.4 Détection d'une particule unique en solution

Un aspect intéressant des systèmes de détection est leur capacité à travailler en milieu liquide durant la réaction étudiée ou le greffage des espèces recherchées. La mise au point d'un tel système ouvre des perspectives intéressantes par exemple dans le domaine de l'étude de cinétiques de réaction.

Pour tester la réponse des dispositifs en solution, nous avons reproduit le même schéma de détection et le même protocole que celui décrit précédemment. La seule contrainte est liée au confinement de la solution durant les mesures. D'une part, il nous faut délimiter le volume réactionnel pour éviter tout contact avec les pointes de test (éviter une dégradation du contact par intercalation de l'eau entre les zones de contact et les pointes). D'autre part, les dimensions du dispositif et la proximité des plots de connexion nous forcent à travailler avec de très faibles volumes de solution. En conséquence, nous devons trouver un système de confinement compatible avec les dimensions du dispositif. La deuxième contrainte est liée au taux d'évaporation de la solution. Si nous considérons des temps d'incubation d'environ deux heures et des volumes faibles de solutions de l'ordre de quelques microlitres, l'influence de l'évaporation des solutions aura un repercussion dramatique sur la concentration des espèces présentes, dans notre cas des nanoparticules. La modification de la force ionique de la solution peut alors se traduire par une coagulation des particules pouvant mener jusqu'au dépôt de la totalité des nanoparticules en cas de séchage. Ces effets sont d'ailleurs utilisés pour la fabrication de réseaux de nanoparticules réseaux en 2 et 3 dimensions [139, 140].

3.6.4.1 Dispositif utilisé

Les mesures en solution sont rendues possibles par l'utilisation d'une micro-cuve en PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) permettant de confiner un faible volume de solution sur la zone sensible des dispositifs. Les procédures de fabrication et d'adaptation des micro-cuves sont décrites en détails en Annexe 4.7. Le PDMS est un matériau qui a été largement étudié pour ses propriétés élastomères et son utilisation pour des applications

de microfluidique est très largement documentée [141, 142]. Les bonnes propriétés de moulage [143] et de conformation [106] de ce matériau sont particulièrement intéressantes dans notre cas puisqu'elles nous permettront d'utiliser les dispositifs de détection sans aucune modification et de fixer la micro-cuve par simple report [144]. Nous avons préféré utiliser les propriétés d'adsorption et de conformation du PDMS qui conduisent un assemblage étanche et réversible. Un greffage irréversible nécessite un traitement de surface plasma O_2 qui aurait été incompatible avec la silanisation du substrat.

L'étape la plus délicate est liée au remplissage de la cuve. Deux solutions ont été envisagées : la première est basée sur l'utilisation de deux capillaires métalliques traversant les parois de la cuve et reliés à l'extérieur à une micropipette via des capillaires souples. L'autre solution, plus simple est basée sur le remplissage manuel d'une micro-cuve ouverte qui est ensuite obturée par une lame de verre. Les étapes de mesure, quant à elles, se feront en utilisant le même équipement (testeur sous pointe).

Un schéma décrivant le dispositif utilisé pour nos expériences est donné dans la figure 3.31.

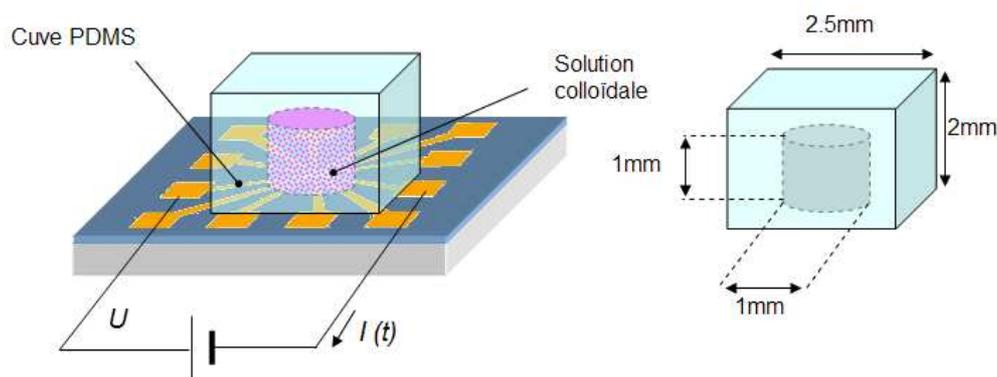


FIG. 3.31 – Schéma général "idéalisé" du principe des mesures en solution dans une micro-cuve en PDMS déposée sur la surface des dispositifs.

Les dimensions exactes de la cuve sont reportées dans la figure 3.31 (b). Elles nous permettent de définir un volume clos d'environ 800nL au dessus des électrodes.

3.6.4.2 Protocole expérimental

Le protocole de dépôt est identique à celui utilisé tout au long du chapitre. La seule différence concerne l'étape de mesure qui se fait durant l'incubation de la solution colloïdale. Le protocole général est le suivant :

- Traitement de surface de l'échantillon Silanisation (Cf Annexe 4.7)
- Alignement et report de la cuve
- Remplissage de la cuve
- Caractérisation électriques
 - Installation du dispositif dans le testeur et dépôt des pointes $t \simeq 2min$
 - Polarisation du dispositif et suivi de l'évolution du courant de conduction
- Observations
 - Démontage rapide de la cuve $t \simeq 1 min$
 - Rinçage Éthanol (5 min) assisté par ultrasons
 - Séchage sous flux d'azote
 - Observations

3.6.4.3 Résultats expérimentaux

Comportement du dispositif dans l'eau désionisée

Nous n'avons à ce stade aucune expérience de ce type de mesure. Nous devons nous attendre à observer des effets éventuellement liés à une dérive du dispositif ou encore à des phénomènes électrochimiques (oxydo-réductions, ...) liés aux différentes espèces présentes en solution .

Avant de commencer les mesures dans une solution colloïdale, nous avons donc souhaité connaître le comportement du dispositif dans une solution d'eau désionisée pour lesquelles ces phénomènes devraient être minimisés. La figure 3.32 nous donne un exemple d'évolution du courant traversant le dispositif après introduction dans la micro-cuve d'eau désionisée.

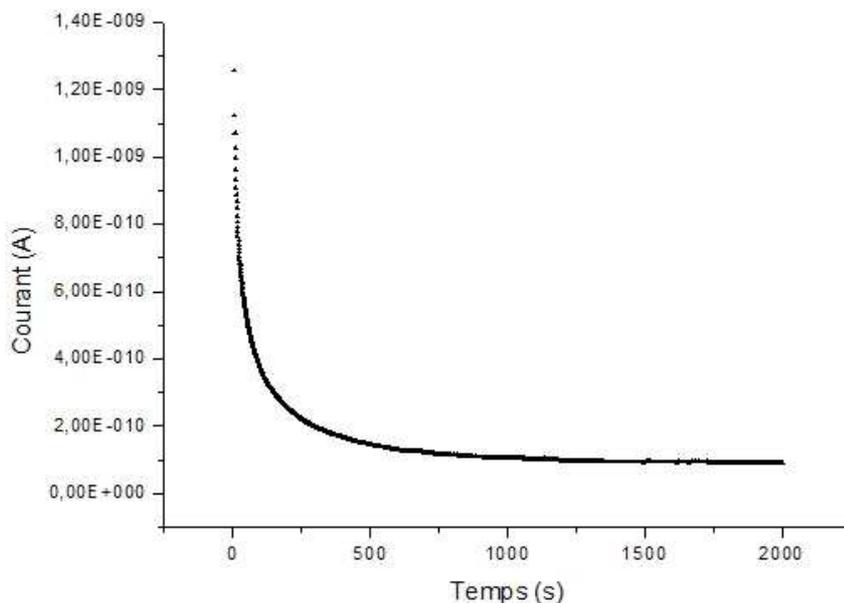


FIG. 3.32 – Caractéristiques $I(t)$ du dispositif en contact avec de l'eau désionisée sous une tension de polarisation de 1V. Le dispositif utilisé est un réseau d'électrodes interdigitées de 100nm, espacées 65nm et de 20nm d'épaisseur.

Intuitivement, nous aurions pu penser que la haute résistivité de la solution d'eau désionisée utilisée (10^8 Ohm.cm) nous aurait conduit à un courant de sortie de faible valeur et stable. Nous observons un comportement bien différent qui correspond à une décroissance du courant importante en début de polarisation qui tend à se stabiliser vers une valeur limite.

L'origine de cette décroissance est difficile à identifier. Si nous nous basons sur la faible conductivité de l'eau désionisée et donc la faible concentration en espèces ioniques, les seules interprétations convenables sont liées à un éventuel phénomène d'électrolyse de l'eau ou bien à une réduction du dioxygène dissout dans l'eau.

Même s'il nous est difficile d'identifier les acteurs d'une telle réaction d'oxydoréduction, le profil de la courbe de décroissance du courant au cours du temps correspond bien au modèle de décroissance décrit par les équations dites de Cottrell. Ces équations permettent d'interpréter très simplement les phénomènes observés dans les expériences de chronoampérométrie. En particulier, lorsqu'une réaction d'oxydoréduction a lieu sur la surface d'une électrode, un phénomène de consommation des espèces à proximité des électrodes a lieu. Au fur et à mesure de la consommation des espèces, la diffusion des particules devient de plus en plus faible. Les phénomènes de diffusion des espèces en solution deviennent alors le facteur limitant de la réaction induisant une décroissance du courant traversant l'électrode suivant une loi en $1/t^2$ [145].

La figure 3.33 nous montre un exemple de régression qu'il est possible d'effectuer sur la courbe précédente :

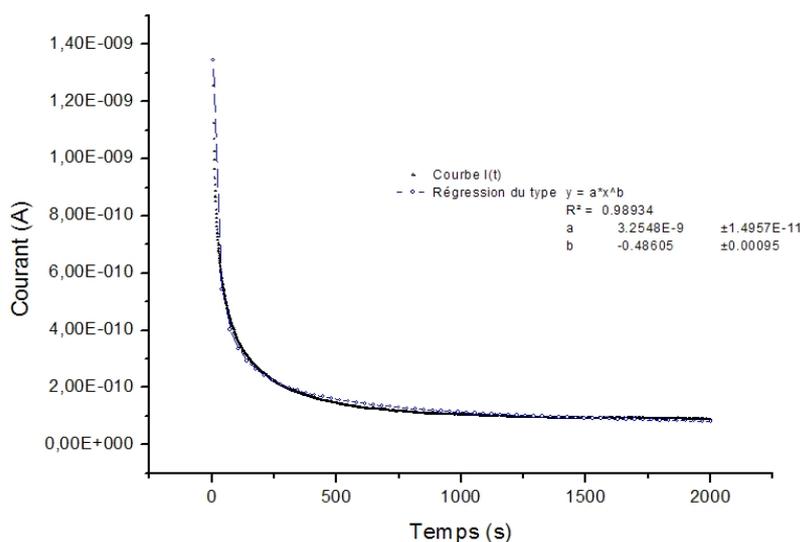


FIG. 3.33 – Comparaison de la courbe expérimentale $I(t)$ obtenue pour un réseau d'électrodes plongées dans de l'eau désionisée et polarisées sous 1V et une régression obtenue en utilisant le modèle de Cottrell pour lequel $I(t) \propto 1/t^2$.

Nous voyons que la corrélation entre les deux courbes semble s'accorder assez bien avec une évolution du courant en $1/t^2$. Toutefois même s'il reste difficile de conclure sur l'origine exacte des phénomènes responsables de ce comportement, il apparaît clairement que les constantes de temps caractérisant la décroissance du courant sont beaucoup plus longues que les constantes de temps rencontrées habituellement pour des réactions

d'oxydo-réduction seules. Aussi, l'interprétation de la décroissance du courant reste très difficile par la seule utilisation des équations liées à la chronoampérométrie. Des phénomènes plus complexes de polarisation du milieu autour des électrodes dus à leurs dimensions nanométriques pourraient être à l'origine de ce phénomène.

Nous supposons par la suite que cette décroissance n'est liée qu'au milieu dans lequel l'expérience a lieu et viendra se superposer aux modifications éventuelles du courant engendrées par les particules.

Comportement des dispositifs au cours de l'incubation d'une solution de nanoparticules

Ayant une petite expérience sur l'évolution prévisible du courant en solution, nous nous sommes intéressés à l'évolution du courant lors du dépôt des nanoparticules. Nous avons reproduit le protocole décrit en section 3.6.4.2. Une micro-cuve en PDMS est tout d'abord placée sur le dispositif puis remplie avec $1\mu L$ de solution colloïdale. Une tension de polarisation est alors appliquée sur les électrodes. La figure 3.34, nous montre un exemple d'évolution typique du courant durant l'incubation. Nous observons tout d'abord un décroissance régulière du courant dans le temps. Nous observons également des sauts de courant, reproductibles au cours du temps, d'une amplitude variant entre 10 et 40pA.

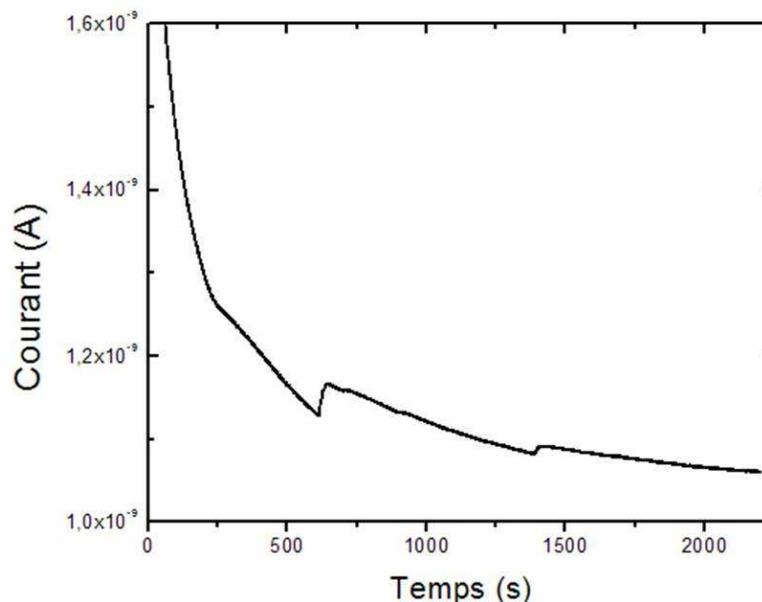


FIG. 3.34 – Caractéristiques $I(t)$ du dispositif en lors de l'incubation de la solution de nanoparticules de 100nm de diamètre sous une tension de polarisation de 1V. Le dispositif est un réseau d'électrodes interdigitées de 100nm de pas et d'espace inter-électrodes de 65nm et a été fonctionnalisé par de l'APTMS avant l'assemblage d'un micro-cuve en PDMS.

La présence des sauts observés peut être attribuée à la création de nouveaux chemins de conduction sur la surface active du dispositif. Il est particulièrement tentant d'associer à chacun des sauts observés le greffage d'une seule particule sur le substrat. Nous avons

vu précédemment au paragraphe 3.6.3.2 que nous pouvions donner une estimation de la valeur de la résistance attribuable à une particule à environ $90G\Omega$ sous une tension de polarisation de 1V. Un calcul simple nous permet d'estimer la contribution d'une nanoparticule sur le courant global à 11pA. Nous voyons que cette valeur est en très bon accord avec l'amplitude des sauts observés dans la figure 3.34 ce qui semblerait confirmer l'idée précédente.

Les mesures et les observations effectuées après l'incubation de la solution colloïdale et séchage de l'échantillon ont confirmé le greffage des nanoparticules sur la surface active du dispositif. Toutefois, comme nous pouvons le voir sur la figure 3.35, il reste difficile de corréler le nombre de sauts observés avec le nombre de nanoparticules sur l'échantillon. Tout d'abord, le protocole expérimental ne nous permet pas d'appliquer une tension de polarisation entre les électrodes immédiatement après l'injection. Ainsi, durant temps de 2 ou 3 minutes nécessaire au remplissage et à la connexion des dispositifs, le suivi de l'évolution de la conductance des dispositifs est impossible.

Malgré un problème de coagulation dû à un séchage de la surface de l'échantillon lors du démontage de la cuve, l'image MEB du dispositif donnée dans la figure 3.35, semble nous confirmer le pontage des nanoparticules. Ce résultat nous conforte donc sur l'origine des sauts observés précédemment. Par ailleurs, il semble que nous retrouvions un effet de répulsion sur les armatures de gauche du dispositif qui correspond effectivement à l'électrode polarisée négativement durant expérience.

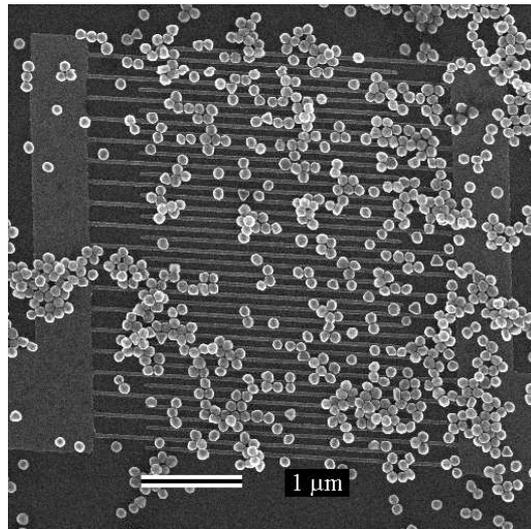


FIG. 3.35 – Image MEB après deux d'incubations dans une solution colloïdale, rinçage et séchage.

3.6.4.4 Sensibilité du schéma de détection

Une origine possible des événements observés peut être liée à la création soudaine de chemins de conduction sur le dispositif. Il est alors très tentant de considérer que chaque événement observé sur la courbe $I(t)$ puisse correspondre à l'immobilisation d'une nanoparticule entre les électrodes. En effet, nous avons vu que l'amplitude moyenne des sauts observés est comprise entre 10 et 50pA pour une tension de polarisation de 1V.

Si nous reprenons le résultat du calcul de la section 3.6.3.2 nous pouvons utiliser la résistance moyenne d'un chemin de conduction associée à une particule pour évaluer la variation de courant qu'il engendre. Si nous nous risquons à un tel calcul, nous obtenons :

$$\Delta(I) = \frac{U}{R_i} = \frac{1}{90 \times 10^9} \simeq 11 \times 10^{-12} A$$

Ce résultat n'est qu'indicatif et ne doit surtout pas être généralisé mais il nous conforte vis à vis de l'hypothèse émise. En effet, nous retrouvons un résultat du même ordre de grandeur que les variations observées et nous pouvons donc conclure que les sauts observés correspondent à l'immobilisation d'une ou de plusieurs nanoparticules. Ce résultat est particulièrement intéressant car il tend à démontrer la très grande sensibilité du dispositif : la détection d'une seule nanoparticule semble possible.

3.6.4.5 Perspectives

L'origine des sauts observés durant le dépôt semble donc identifiée. Toutefois, nous n'avons pu mener que peu d'expériences consacrées à la détection de particules en solution. Des tests complémentaires permettant de relier clairement le nombre de sauts aux nombre de nanoparticules immobilisées seraient nécessaires. Cette opération reste difficile à réaliser d'un point de vue expérimental du fait du délai nécessaire au montage et démontage du système avant rinçage au cours desquels la densité de particules continue à évoluer. Toutefois, même si une observation rigoureuse n'est pas envisageable, ces temps de manipulations restent faibles en comparaison des temps d'incubation (2heures) et de la cinétique de la réaction. L'observation du dispositif devrait refléter assez fidèlement l'état de l'échantillon à la fin de l'acquisition.

A partir des résultats précédents, nous avons pu faire un comptage du nombre d'événements en fonction du temps d'avancement de l'incubation. Les résultats sont reportés dans le graphe de la figure 3.36.

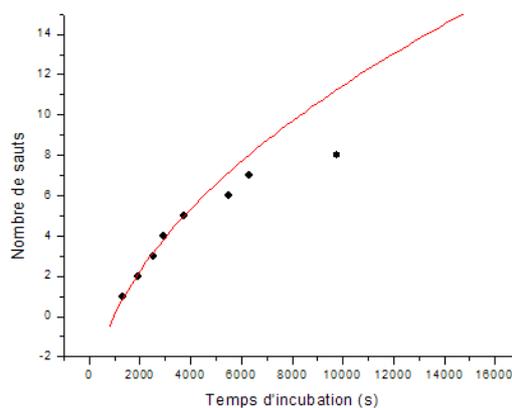


FIG. 3.36 – Évolution de la densité de particules déposées obtenue pour notre dispositif.

Il semble possible de relier la fréquence des événements à la variation temporelle de la densité de nanoparticules greffées. Ces résultats peuvent être comparés aux études de cinétiques retrouvés dans la littérature. En effet, des études ont été menées sur le greffage

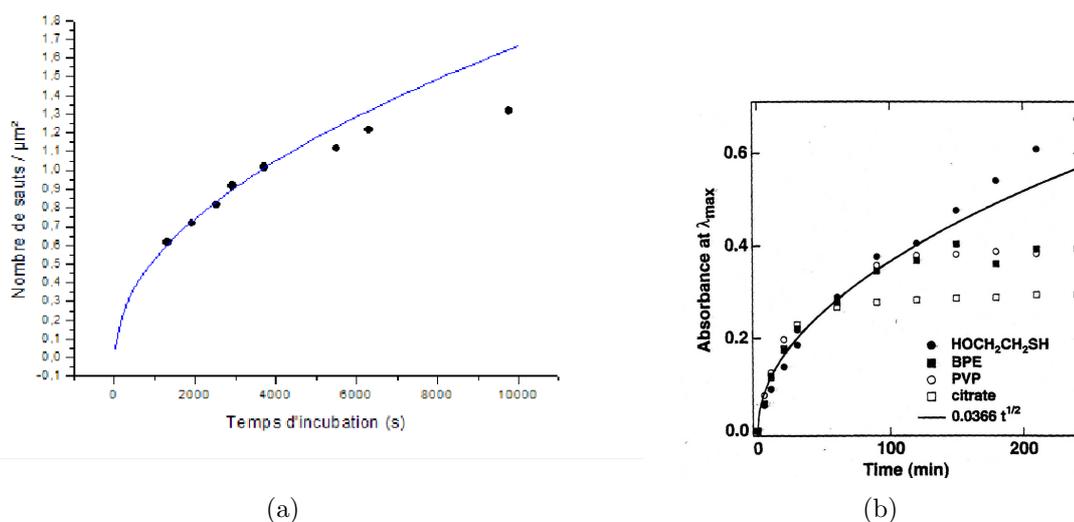


FIG. 3.37 – (a) Évolution de la densité de particules déposées obtenue pour notre dispositif. La ligne pleine représente la régression obtenue pour $t < 4000s$. La régression nous donne $N \simeq 0.1663 \times t^{0.5}$. (b) Mêmes types de courbes obtenues dans l'équipe de K.C.Grabar [146] pour des nanoparticules d'Or de 15 nanomètres de diamètre greffées sur une couche d'APTMS

de nanoparticules sur des surface d' amino-silanes et ont permis de mettre en évidence des variation du nombre N de particules greffées au cours du temps [146] :

$$N = A \times p \times n \times y \times t^{1/2}$$

avec A constante, p probabilité d'immobilisation sur la surface, n concentration des particules en nombre/unité de volume, y une constante (dépendant de la taille des particules, de la viscosité, de la température) et t le temps.

Cette équation est, d'après ces travaux, en bonne corrélation avec l'expérience pour des temps faibles. Au cours du temps, la densité du dépôt tend vers un maximum constant, pour lequel la relation continue à décrire une augmentation du nombre de particules greffées. Si nous effectuons une régression de la forme :

$$N + N_o = C \times t^{1/2}$$

où C est une constante et N_o le nombre de particules immobilisées durant les deux minutes de préparation du dispositif. En limitant la fenêtre de régression à des temps inférieurs à 4000s, nous obtenons la régression représenté dans la figure 3.36 qui nous donne :

$$N + N_o = C \times t^{1/2} \text{ avec } C = 0.1663 \pm 0.001 \quad N_o = 0.5172 \pm 0.05$$

Coefficient de corrélation : $R \simeq 0.9892$

Nous pouvons alors comparer ces résultats à la littérature en représentant l'évolution de la densité de dépôt (Cf figure 3.37).

Nous voyons que les deux courbes décrivent la même tendance et que la divergence pour les temps élevés apparaît dans les deux cas. Toutefois, les valeurs des densités correspondant à notre courbe restent bien inférieures aux densités observées au paragraphe 4.4.1. Ces écarts peuvent s'expliquer par la présence d'une tension de polarisation des électrodes durant le dépôt. Nous avons vu par exemple qu'il était possible d'empêcher le dépôt de nanoparticules fonctionnalisées par des groupements citrates en polarisant une électrode à un potentiel négatif. Cependant, même si ce phénomène limite les mesures de cinétiques que nous avons souhaité effectuer dans le cas de ces particules, ce phénomène est absent dans le cas de particules non chargées telles que les particules que nous allons utiliser dans le chapitre suivant. Par ailleurs, nous pouvons mettre à profit ce phénomène, par exemple pour contrôler et orienter le dépôt de particules sur une surface ce qui laisse présager des perspectives d'applications intéressantes dans le domaine de la nanostructuration.

3.7 Conclusion et perspectives

L'objectif principal de ce chapitre était de démontrer qu'il est possible d'utiliser des nanoparticules pour modifier la réponse électrique d'un dispositif basé sur un réseau d'électrodes interdigitées. Cet objectif semble atteint à l'aide d'une méthode de dépôt basée sur des interactions électrostatiques entre la surface et les particules. Nous avons pu vérifier la compatibilité des électrodes avec un protocole de greffage simple et identifier, de part le très bon état de surface obtenu après greffage, les nanoparticules comme seules responsables de la modification de la conduction électrique.

Nous avons pu mettre en évidence deux phénomènes majeurs qui conditionnent la réussite de la détection. Le premier phénomène concerne la localisation des particules déposées sur la surface. Nous avons pu remarquer que le dépôt s'effectuait de façon préférentielle sur les bords des structures. Cette tendance se traduit, en particulier sur les électrodes, par une majorité de nanoparticules disposées entre les électrodes. Plus exactement, les particules semblent adopter leur conformation pour entrer simultanément en contact avec les électrodes et le substrat. L'origine de ce phénomène semble complexe et la seule prise en compte des interactions électrostatique et de Van der Waals correspondant à l'approche la plus simple du modèle DLVO semble insuffisante pour expliquer l'influence de la topologie du substrat sur le dépôt. Il est important de noter que les simulations que nous avons pu réaliser sont basées sur un système à l'état statique. Il est probable que la prise en compte des phénomènes liés à la dynamique de la particule en solution pourrait permettre de mieux décrire l'influence de la topologie de la surface sur les mouvements d'une particule située à proximité. Quoiqu'il en soit, il est clair que le guidage des nanoparticules dans l'espace inter-électrodes est à l'origine de la modification de la conductivité des dispositifs et plus globalement de la réussite du schéma de détection. L'origine de la localisation des particules n'est pas encore claire et pose la question de la réussite de la détection électrique pour des particules immobilisées par des méthodes différentes que celles mises en jeu dans ce chapitre. Ce phénomène laisse présager des applications intéressantes dans le domaine de l'assemblage et de la nanoconstruction. En effet, la modification de la topographie de la surface semble être un moyen simple et efficace pour guider l'organisation de nanoparticules pour la formations d'édifices plus complexes.

Le deuxième aspect concerne l'interprétation des phénomènes de conduction entre les nanoparticules et les électrodes. Le contact n'est vraisemblablement pas de nature ohmique et met en évidence l'influence des molécules présentes à la fois à la surface de la particule et du substrat. Nonobstant, le principe de la détection semble bien conduire, comme nous l'avions espéré en introduction, à une détection à très haute sensibilité. Une seule nanoparticule est capable de modifier de façon très importante la conductance des réseaux d'électrodes.

Pour l'instant, le faible nombre d'expériences que nous avons pu mener à ce jour ne nous permettent pas de nous avancer quant à la réalisation de mesures quantitatives. Une interprétation des phénomènes de conduction ainsi que la prise en compte de la formation d'agrégats sur les électrodes sont encore nécessaires. Toutefois, nous pouvons d'ores et déjà affirmer qu'il est possible de traduire une augmentation de la densité de greffage sur un réseau d'électrodes en une variation de conductivité facilement mesurable.

Ces premiers résultats nous confortent dans notre approche et dans la perspective de son utilisation pour une application de biodétection. La possibilité de réaliser des mesures directement en solution, la très haute sensibilité de la détection, la simplicité de la mesure sont des atouts essentiels pour répondre aux exigences d'un système de détection de biomolécules. Dans le chapitre suivant, nous allons tester la compatibilité du schéma de détection avec une méthode d'immobilisation des particules basée sur des interactions entre biomolécules.

Chapitre 4

Vers une immunodétection électrique

Sommaire

4.1	Introduction	143
4.2	Principe de la détection d'anticorps	143
4.2.1	Adaptation du schéma de détection	143
4.2.2	Approche adoptée	144
4.3	Protocole expérimental	146
4.3.1	Solutions d'anticorps	146
4.3.1.1	Nature des anticorps utilisés	146
4.3.1.2	Choix des concentrations	147
4.3.2	Immobilisation de la sonde	147
4.3.2.1	Adsorption des anticorps sur la surface des dispositifs	147
4.3.2.2	Protocole expérimental	148
4.3.3	Formation du complexe cible-sonde	149
4.3.3.1	Spécificité de la reconnaissance	149
4.3.3.2	Protocole expérimental	149
4.3.4	Greffage de nanoparticules	150
4.3.4.1	Couplage de nanoparticules et de biomolécules	150
4.3.4.2	Protocole de greffage	150
4.3.5	Utilisation de micro-cuves en PDMS	152
4.4	Étude du greffage des nanoparticules : Résultats préliminaires	152
4.4.1	Densité de greffage	152
4.4.1.1	Greffage des nanoparticules sur un IgG adsorbé	152
4.4.1.2	Influence du couplage IgG - Anti IgG	153
4.4.2	Sélectivité du dépôt	154
4.4.2.1	Sélectivité vis à vis des matériaux	154
4.4.2.2	Chimio-spécificité du greffage	155
4.4.2.3	Sélectivité du procédé complet	155
4.4.3	Résistance du greffage	158
4.4.4	Synthèse	158
4.5	Étude du greffage sur des électrodes interdigitées	158
4.5.1	Homogénéité du dépôt	158
4.5.2	Conformation des particules sur les électrodes	159
4.5.2.1	Observations MEB	159
4.5.2.2	Observations par AFM	160
4.5.3	État de surface	161
4.5.4	Interprétation des résultats de greffage	163
4.6	Détection électrique de la formation du complexe cible-sonde	164
4.6.1	Objectifs	164
4.6.2	Évolution de la conductance au cours des étapes de greffage	164
4.6.2.1	Dispositif vierge	164
4.6.2.2	Dispositif après adsorption du premier anticorps Ig	164

4.6.2.3	Dispositif après incubation du deuxième anticorps	166
4.6.2.4	Dispositif après greffage des nanoparticules	166
4.6.3	Interprétations des résultats	168
4.6.3.1	Nature du contact	168
4.6.3.2	Linéarité de la détection	169
4.6.3.3	Sélectivité	169
4.6.4	Vers une mesure quantitative	170
4.7	Conclusion et perspectives	174

4.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons pu démontrer les possibilités offertes par l'utilisation de réseaux d'électrodes interdigitées pour la détection de l'adsorption de nanoparticules métalliques. Ces premières expériences mettent en jeu le dépôt direct des nanoparticules sur la surface active des dispositifs et semblent démontrer un grand niveau de sensibilité ainsi que la possibilité de travailler avec de faibles volumes de solutions. Ces premiers résultats sont particulièrement encourageants au regard des critères que nous avons fixés dans le premier chapitre pour le développement de dispositifs de biodétection.

Il s'agit désormais de tirer partie de ces premiers résultats pour adapter le schéma de détection pour une immunodétection (ie la détection d'un anticorps). Comme nous l'avons vu en introduction, une stratégie basée sur la formation d'un complexe entre une sonde immobilisée sur la surface des dispositifs et une cible à détecter offre de nombreux avantages mais nécessite une adaptation du protocole expérimental établi dans le chapitre 3.

Les modifications engendrées par un nouveau protocole de greffage sont doubles : d'une part, nous pouvons nous attendre à ce que la présence du complexe cible-sonde modifie la nature des interactions entre la surface et les particules et donc la localisation et l'homogénéité du greffage des nanoparticules. D'autre part, la nature du contact entre les électrodes et les particules sera elle aussi modifiée et aura une répercussion directe sur la signature électrique.

Une large partie de ce chapitre sera donc dédiée à l'étude de la sélectivité du protocole de greffage et son influence sur les modifications de la réponse électrique des dispositifs, en particulier sur la sensibilité de la détection.

Les objectifs de ce chapitre concernent ici aussi la validation du schéma de détection. Ne disposant que de peu d'expérience dans l'utilisation de biomolécules telles que les anticorps et leur manipulation, les différents protocoles ont été volontairement simplifiés de façon à converger très rapidement vers les premiers tests de détection. De nombreuses améliorations resteront à apporter dans les développements futurs du schéma de détection. Toutefois, nous donnerons les premières conclusions quant aux possibilités offertes par notre procédé en comparant nos résultats aux critères que nous avons dégagés dans le chapitre d'introduction.

4.2 Principe de la détection d'anticorps

4.2.1 Adaptation du schéma de détection

Désormais, notre objectif n'est plus de détecter des nanoparticules métalliques mais d'associer la réponse électrique du dispositif à l'interaction entre deux biomolécules. Comme nous l'avons décrit en introduction, nous avons basé notre schéma de détection sur une stratégie impliquant un couplage entre une molécule cible et une molécule sonde. C'est la formation du complexe cible-sonde que nous devons maintenant parvenir à détecter. Dans cette approche, nous allons utiliser les nanoparticules en tant que marqueurs ou plus exactement en tant que révélateurs de la formation de ce complexe.

Dans le chapitre précédent, le schéma de détection était basé sur un protocole en

deux étapes impliquant une première étape de traitement du substrat puis le dépôt des nanoparticules fonctionnalisées. La sélectivité du dépôt était alors liée l'interaction électrostatique entre les groupements citrates de la particule et les molécules silanes amine greffées sur la surface.

Dans le cas présent, nous voulons modifier le schéma de détection pour rendre le greffage des nanoparticules dépendant exclusivement de la reconnaissance moléculaire entre deux anticorps. Pour cela nous souhaitons adopter un schéma classique impliquant une interaction entre un anticorps "sonde" déposé sur la surface et un anticorps "cible" en solution qui, dans notre cas, devra permettre le dépôt sélectif de nanoparticules métalliques.

Le test immunologique typique se déroulera en trois étapes principales (Cf. Figure 4.1) : *i*) dépôt de l'anticorps sonde sur la zone active du dispositif ; *ii*) incubation de l'anticorps cible ; *iii*) révélation du test par incubation des nanoparticules qui vont se déposer uniquement sur les zones de la surface où la cible et la sonde forment un complexe stable. Parmi les modifications que nous devons apporter au protocole, nous pouvons distinguer deux étapes clés : d'une part le dépôt des anticorps sur la surface et son influence sur la réactivité et d'autre part le greffage des nanoparticules métalliques après l'interaction entre les molécules cibles et sondes. Ce nouveau schéma de détection va nécessiter la mise au point d'un protocole spécifique qui devra respecter au mieux les restrictions imposées par le principe de reconnaissance, en particulier la sélectivité et la spécificité de la reconnaissance et qui devra s'adapter au mieux à notre méthode de détection. En particulier, nous attacherons beaucoup d'importance au suivi de l'évolution de l'état de surface du dispositif au fur et à mesure des étapes. La présence de résidus aura des répercussions directes sur le contact électrique entre les particules et les électrodes et donc sur la sensibilité globale de la détection.

L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre est principalement de démontrer la compatibilité du schéma de détection avec une immunodétection et de dégager les paramètres clés de la technique. Nous avons choisi de déposer les anticorps sondes par simple adsorption sans utiliser de greffage covalent ce qui, comme nous le verrons, constitue probablement une des principales limitations de ces expériences. Toutefois, chacune des étapes du protocole sera discutée à la lumière de nos observations et des résultats publiés dans la littérature et des solutions technologiques alternatives seront proposées dans la perspective des prochains développements de la technique.

4.2.2 Approche adoptée

Tous les dispositifs utilisés dans ce chapitre sont semblables à ceux utilisés dans le chapitre précédent. Il s'agit de réseaux d'électrodes interdigitées en Or fabriquées sur une couche de silice de 300nm d'épaisseur. Les dimensions des électrodes seront conservées (pas de 100nm pour un espace inter-électrodes d'environ 65nm).

Le schéma de détection complet que nous allons mettre en oeuvre est représenté dans la figure 4.1. Il regroupe les deux cas de figure dans lesquels nous allons tester notre approche à savoir une expérience de test "positive" pour laquelle la reconnaissance entre l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire doit mener au greffage de nanoparticules et un test "négatif" impliquant deux anticorps non complémentaires à partir duquel nous testerons la sélectivité du protocole.

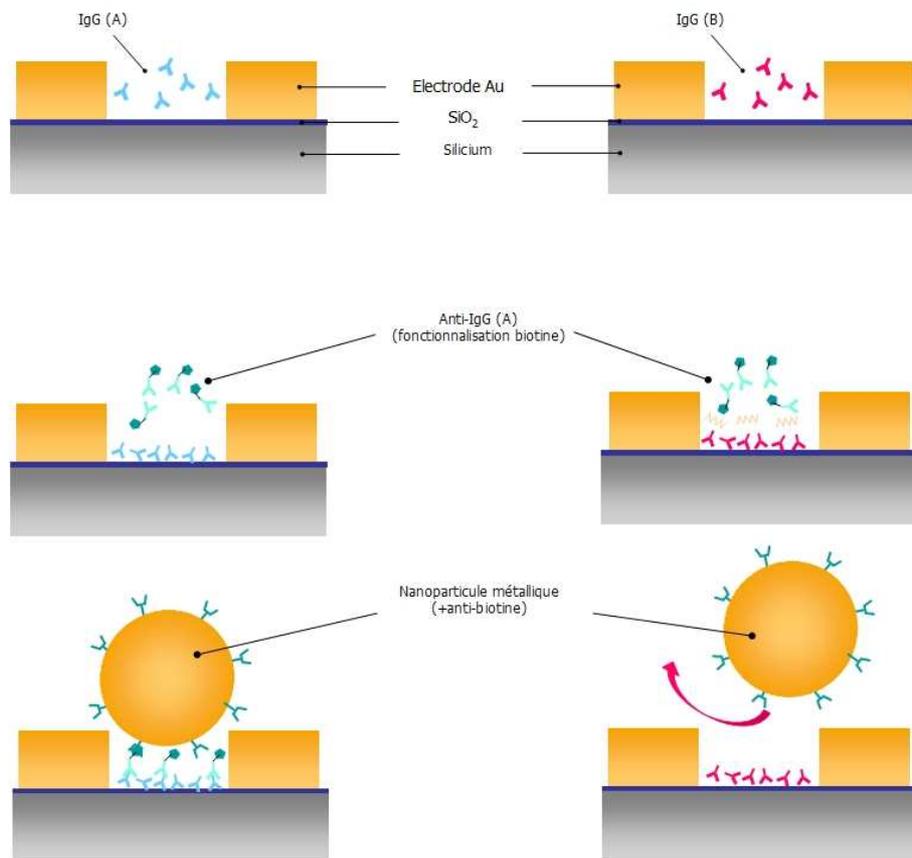


FIG. 4.1 – Schéma de principe des différentes étapes du protocole de détection électrique de l'interaction entre deux anticorps. Un premier anticorps "sonde", est déposé dans l'espace inter-électrode du dispositif. L'anticorps "cible" est ensuite incubé sur la surface. Cet anticorps sera fonctionnalisé par des molécules de biotine. En cas d'interaction avec la sonde (colonne de gauche - test positif), des molécules de biotine seront accessibles sur la surface. La présence de la cible sur la surface pourra alors être "révélée" par le greffage de nanoparticules métalliques fonctionnalisées par un anticorps anti-biotine. Le greffage de ces particules dans l'espace inter-électrode modifie la conductance globale du dispositif. Dans le cas où la cible n'interagit pas avec la sonde (colonne de droite - test négatif), les nanoparticules métalliques ne trouveront pas de site d'accrochage sur la surface et n'engendreront aucune modification de la réponse électrique.

Un premier anticorps, la "sonde", est déposé sur la surface du dispositif par simple adsorption. Un deuxième anticorps, la "cible", est ensuite incubé sur le dispositif. Cet anticorps présente la particularité d'être fonctionnalisé par des molécules de biotine. Dans le cas d'une interaction avec la sonde, les molécules cible vont être immobilisées sur la surface. La présence de ces fonctions biotines sur la surface permet alors le greffage de nanoparticules métalliques fonctionnalisées par des molécules anti-biotine. Ainsi, ces nanoparticules vont révéler la présence de la cible sur la surface. Dans le cas d'un test négatif où la cible n'interagit pas avec la sonde, les particules ne disposeront pas de site de greffage sur la surface.

Les questions qui se posent concernent premièrement la conformation du dépôt. En

effet, comme nous l'avons vu au chapitre 3, des forces d'attraction semble favoriser le dépôt de nanoparticules dans l'espace inter-électrodes des dispositifs. Cependant, dans le cas présent, le couple de molécules permettant le greffage des particules est totalement différent et la contribution électrostatique aux forces d'interactions devient beaucoup plus faible.

Une deuxième question se pose quant à la variation de conductivité engendrée par les nanoparticules. Si nous admettons que le dépôt conduit ici aussi au pontage des électrodes, nous ne savons pas quelle sera la nature du contact entre la particule et les électrodes. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, les molécules qui vont servir de lien avec la particule et qui vont donc s'insérer entre les électrodes et la molécule sont bien plus volumineuses que précédemment et pourront conduire à une augmentation de la résistance de jonction. Nous prêterons une grande attention à la variation de la sensibilité du dispositif ainsi qu'à la linéarité de la réponse au greffage.

Enfin, la multiplication des étapes de traitement ne doit pas détériorer la sélectivité du schéma de détection. Nous attacherons donc une grande importance à réaliser des expériences de contrôle à chacune des étapes du traitement.

4.3 Protocole expérimental

4.3.1 Solutions d'anticorps

Note : L'annexe C rassemble une introduction rapide au rôle des anticorps dans le système immunitaire animal ainsi qu'un glossaire des termes spécifiques à l'immunologie.

4.3.1.1 Nature des anticorps utilisés

L'ensemble des anticorps utilisés dans ces expériences sont des anticorps monoclonaux. Ces anticorps ont été générés à partir de la duplication à l'identique ou clonage d'un seul type de lymphocyte B et ne reconnaissent qu'un seul épitope ou site de reconnaissance porté par l'antigène. Ces anticorps sont généralement préférés aux anticorps polyclonaux qui, bien qu'offrant une plus grande sensibilité, sont beaucoup moins sélectifs. En effet ces derniers sont générés à partir de plusieurs clones de lymphocytes B chacun de ces clones présentant une spécificité avec un des épitopes portés par l'antigène.

Anticorps fonctionnalisés

Nous avons utilisé un seul type d'anticorps marqués par des molécules de biotine. Il s'agit d'anticorps complets (H+L) monoclonaux de type anti-boeuf et provenant du Lapin. Chacun de ces anticorps présente une à trois molécules de biotine réparties sur l'ensemble de la chaîne peptidique. La biotine aussi appelé appelée vitamine H ou B8, est un coenzyme naturel. Une représentation simplifiée de sa structure est donnée dans la figure 4.2.

La très grande stabilité et la grande affinité vis à vis d'espèces telles que la streptavidine ou l'avidine font de la biotine une molécule très largement utilisée dans des applications de marquage et d'immobilisation de biomolécules.

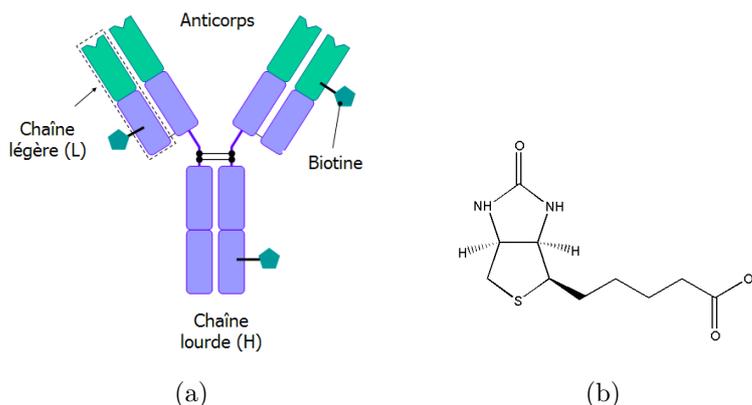


FIG. 4.2 – (a) Représentation de la fonctionnalisation des anticorps par des molécules de biotine. (b) Représentation semi-développée de la molécule de biotine ($M=244.3\text{g.mol}^{-1}$).

Les solutions mères d'anticorps fonctionnalisés de concentration 1mg/mL ont été fournies par la société Uptima (Interchim). Dans la suite du chapitre, cet anticorps sera noté IgG(A). La surface occupée par un anticorps peu a été considérée comme circulaire avec un diamètre compris entre 10 et 15nm [147].

Anticorps non fonctionnalisés

Deux variétés d'anticorps ont été utilisés en tant que sonde. Il s'agit d'anticorps (H+L) de type Anti-lapin provenant du singe que nous noterons Anti-IgG(A) et de type Anti-chèvre provenant du lapin noté IgG(B) (Uptima - Interchim).

4.3.1.2 Choix des concentrations

Les solutions d'anticorps ont été préparées par simple dilution des solutions mères dans un tampon phosphate (PBS : Phosphate Buffer Saline) à $\text{pH}=7.2$. Les concentrations des anticorps en solution ont toutes été fixées à $10\ \mu\text{g/mL}$. Comme nous le verrons par la suite, cette concentration offre un bon compromis entre temps de réaction et densité de greffage. Cette concentration a été retenue après des expériences de tamponnage moléculaire et de détection en fluorescence qui ne seront pas reportées dans ce manuscrit.

Note : PBS (Phosphate Buffer Saline : $\text{pH} = 7.2$ Mélange Na_2HPO_4 (48mMol.L^{-1})/ KH_2PO_4 (20mMol.L^{-1}) dans de l'eau + NaCl ($\approx 250\text{mMol.L}^{-1}$))

4.3.2 Immobilisation de la sonde

4.3.2.1 Adsorption des anticorps sur la surface des dispositifs

A la différence des oligonucléotides notamment, il n'existe pas de solution technologique pour la synthèse in-situ des protéines sur un substrat. Aussi, la recherche de solutions technologiques pour l'immobilisation d'anticorps et plus largement de protéines sur une surface a suscité de nombreuses recherches [148] en particulier dans le cadre d'applications liées à la biodétection.

La méthode utilisée doit offrir un bon compromis entre la densité de greffage et la conservation de la réactivité des molécules. En effet, il a été démontré que la densité de greffage avait une incidence directe sur l'accessibilité des anticorps greffés sur la surface et donc sur leur réactivité [149]. D'autres facteurs tels que l'orientation des molécules sur la surface, leur taille, l'homogénéité du dépôt influencent également l'accessibilité des anticorps [150].

Parmi les solutions proposées, de nombreuses stratégies sont basées sur la fonctionnalisation d'un substrat et l'utilisation d'un ligand pour fixer la molécule d'intérêt au substrat. Une autre stratégie consiste à utiliser les propriétés d'adsorption des protéines. Cette solution est bien souvent préférée car elle permet de réduire le nombre d'étapes de traitements et de simplifier le protocole. Par ailleurs, en modifiant les propriétés physico-chimiques de la surface du substrat, il est non seulement possible de favoriser l'adsorption mais aussi de passiver la surface vis à vis du dépôt [151]. Il est donc possible d'immobiliser de façon spécifique les anticorps en modifiant localement les propriétés de la surface. Les méthodes de modification des propriétés du substrat passent généralement par la fonctionnalisation de la surface par des monocouches auto-assemblées (SAMs). Leur utilisation en combinaison des techniques telles que le micro-contact printing [106] ou des dispositifs de micro fluidique est particulièrement intéressante car elle permet une fonctionnalisation simple et localisée de la surface.

Bien qu'ayant suscité de nombreux travaux, le contrôle et la compréhension des mécanismes d'adsorption restent encore controversés [152]. Les anticorps et dans un cadre plus général les protéines présentent un caractère amphiphyle et semblent pouvoir s'adsorber sur la plupart des surfaces solides [153]. Bien que la nature exacte des interactions soit difficilement accessible, certaines tendances ont pu être dégagées. Il semble en particulier que l'adsorption de protéines est sensible à l'organisation des molécules d'eau sur la surface [151] et que le dépôt est favorisé par les surfaces présentant une bonne mouillabilité [154].

Nous avons souhaité mettre à profit les bonnes propriétés de mouillage de la surface de silice présente sur nos dispositifs pour adsorber les anticorps. De nombreux résultats concernant ce matériau ont d'ailleurs été rapportés à ce jour et ont pu démontrer d'une part l'adsorption mais surtout la conservation de la réactivité des anticorps après adsorption [149, 155, 156, 147]. Nous pensons, comme cela sera démontré par la suite, qu'une stratégie d'immobilisation des sondes protéique plus raffinée sera un passage obligé pour améliorer les performances de nos nano-dispositifs.

4.3.2.2 Protocole expérimental

Pour mettre au point le protocole d'adsorption des anticorps sur la surface du dispositif, nous nous sommes inspirés des protocoles utilisés au laboratoire dans le cadre de la technique de Micro Contact Printing (μCP) [157, 158, 106, 147].

Les anticorps ont été déposés sur la surface des échantillons par simple adsorption. Les échantillons n'ont subi aucun traitement de surface spécifique en vue du dépôt. Les solutions d'anticorps à 10 $\mu g/mL$ ont simplement été incubées en déposant une goutte de solution sur l'échantillon dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau ou bien en injectant 1 μL de solution dans une micro-cuve déposée sur l'échantillon (Cf. Annexe 4.7).

- Incubation de l'anticorps cible :
 - . Dépôt d'une goutte de $8\mu\text{L}$ de solution sur un échantillon . dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau ou
 - Introduction de $1\mu\text{L}$ de solution dans une micro-chambre en PDMS déposée sur l'échantillon.
- Incubation pendant 20 minutes
- Lavages
 - . Deux lavages successifs par immersion de l'échantillon dans du tampon phosphate $t = 2\text{min}$ (x2) (avec agitation).
 - . Deux rinçages successifs par immersion de l'échantillon dans une solution d'eau désionisée. $t = 2\text{min}$ (x2) (avec agitation).
- Séchage et stockage sous azote

4.3.3 Formation du complexe cible-sonde

La description plus détaillée de la structure et des mécanismes intervenant lors de la reconnaissance entre un anticorps et son antigène est donnée en AnnexeC. Nous ne rappellerons ici que les éléments principaux.

4.3.3.1 Spécificité de la reconnaissance

Dans la réponse immunitaire le rôle des anticorps est de reconnaître et de se lier de façon spécifique à une molécule nommée antigène. Dans notre cas, nous avons utilisé des anticorps appelés "anticorps secondaires". Ces anticorps ont été générés par le système immunitaire d'une espèce animale en réponse à l'introduction d'un premier anticorps provenant d'une espèce différente. Ce premier anticorps a déclenché une réponse immunitaire et constitue donc l'antigène de l'anticorps secondaire généré. Ces anticorps sont donc capables de reconnaître et de se fixer sur un autre anticorps IgG présentant un épitope complémentaire et sont qualifiés d'anti-immunoglobulines. Dans notre cas, les anticorps de type anti-lapin du singe ont donc été produits par le système immunitaire du singe en réponse à l'introduction d'un anticorps produit par le système immunitaire du lapin. Par ailleurs, ces anticorps sont monoclonaux et possèdent donc une très grande spécificité (Cf Annexe C). Ce paramètre est capital dans notre approche car il contrôlera directement la sélectivité du greffage.

4.3.3.2 Protocole expérimental

Le protocole d'incubation du premier anticorps "sonde" avec le deuxième anticorps "cible" fonctionnalisé par des molécules de biotine est issu d'expériences sur lames de verres sur lesquelles des Anticorps sonde ont été déposés par tamponnage moléculaire et le résultat de l'interaction avec un anticorps cible suivi par fluorescence. Nous avons retenu la procédure suivante :

- Incubation de l’anticorps cible :
 - Dépôt d’une goutte de $8\mu\text{L}$ de solution sur un échantillon dans une atmosphère saturée en vapeur d’eau *ou*
 - Introduction de $1\mu\text{L}$ de solution dans une micro-chambre en PDMS déposée sur l’échantillon.
- Incubation ($t = 30$ à 45 minutes)
- Lavages
 - Deux lavages successifs par immersion de l’échantillon dans du tampon phosphate $t = 2\text{min}$ (x2) (avec agitation).
 - Deux rinçages successifs par immersion de l’échantillon dans une solution d’eau désionisée. $t = 2\text{min}$ (x2) (avec agitation).
- Séchage et stockage sous azote

4.3.4 Greffage de nanoparticules

4.3.4.1 Couplage de nanoparticules et de biomolécules

De très nombreuses techniques permettent de fonctionnaliser des nanoparticules avec des biomolécules [79]. Dans le cas particulier des immunoglobulines, plusieurs solutions sont disponibles pour lier la nanoparticule avec la protéine. Par exemple, il est possible d’utiliser une fonctionnalisation de certains amino acides des protéines avec des groupements de type thiols qui peuvent se lier directement à des colloïdes d’Or. Il est également possible d’utiliser des groupements amines qui permettent d’utiliser des interactions électrostatiques avec des nanoparticules fonctionnalisées et stabilisées par des groupements citrate.

Dans notre cas, nous avons choisi de travailler avec des nanoparticules fonctionnalisées par des anticorps de type anti-biotine qui pourront lier la nanoparticule au groupement biotine porté par les anticorps cibles. Même si les constantes d’affinité sont plus faibles que dans le cas du couple biotine/streptavidine ($Ka \simeq 10^{15}$), ces anticorps présentent une très grande affinité (Ka compris entre 10^4 et 10^{12} (Cf. Annexe C)) avec les molécules de biotine et seront donc bien appropriés pour le greffage de nanoparticules sur une surface présentant des groupements de type biotine (Cf Figure 4.3).

Nous avons utilisé des nanoparticules d’Or de 78 nm de diamètre moyen fournies par la société QIAGEN ¹ et initialement destiné au marquage de molécules d’ADN et à leur détection par diffusion de lumière. Ce kit comprend, entre autre, toutes les solutions tampons de lavage, de dilution ainsi que des nanoparticules d’Or fonctionnalisées par des anticorps anti-biotine monoclonaux qui nous offrent donc une très grande sélectivité.

4.3.4.2 Protocole de greffage

Le protocole de greffage que nous avons employé tout au long de nos expériences a été adapté à partir du protocole fournit par Qiagen ([159]) :

¹Kit "HighLightTM Single Color kit" (Réf.934001)

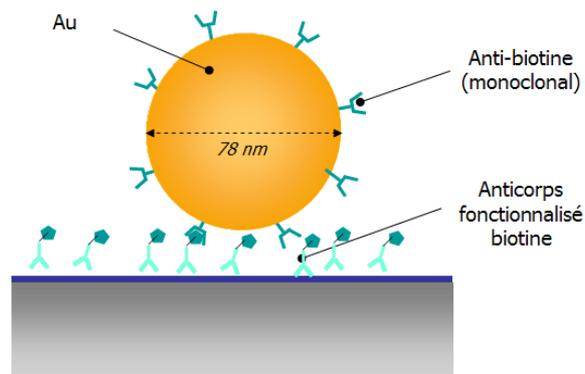


FIG. 4.3 – Schéma du principe de greffage des nanoparticules fonctionnalisées par des anticorps antibiotine sur une surface couverte d'anticorps fonctionnalisés par des molécules de biotine.

- Préparation du substrat :
 - . Adsorption ou incubation des anticorps (Cf Paragraphes précédents)
- Préparation de la solution colloïdale :
 - . Homogénéisation de la solution colloïdale (agitation Vortex $t=30s$)
 - . Mélange de $1\mu L$ de la solution colloïdale (HighLight RLS particles) avec $0.5\mu L$ de solution de dilution.
- Incubation de la solution colloïdale :
 - . Introduction de $1\mu L$ de solution colloïdale diluée dans la micro-cuve en PDMS
 - ou*
 - . Dépôt de $8\mu L$ de solution colloïdale sur la surface de l'échantillon dans une atmosphère saturée en eau
 - . Incubation pendant 20 minutes
- Préparation de la solution de lavage (Solution 3[†])
 - . Mélange 95 % / 5 % en volume d'eau désionisée et de tampon "WA[†]"
- Lavages
 - . Deux Lavages successifs par immersion de l'échantillon dans 2mL de solution 3[†] $t = 2min$ () (avec agitation).
 - . Deux Rinçages successifs par immersion de l'échantillon dans une solution d'eau désionisée. $t = 2min$ () (avec agitation).
- Séchage et stockage sous azote

[†] : références des solutions utilisées dans le protocole QIAGEN [159]

textitNote : Toutes les solutions sont préparées avant chaque expérience

Nous reviendrons en détail sur la morphologie des particules dans les paragraphes qui vont suivre.

4.3.5 Utilisation de micro-cuves en PDMS

Parmi les premiers tests concernant la détection de la formation du complexe cible-sonde, deux essais ont été menés en utilisant des micro-cuves en PDMS pour l'incubation des deux anticorps cibles et sondes sur la surface. Les solutions d'anticorps et de lavage ont été introduites par l'intermédiaire d'un capillaire relié à une micropipette (Cf. Annexe 4.7). Les volumes des solutions d'anticorps et de lavage ont été réduits respectivement à $2\mu\text{l}$ et $100\mu\text{L}$. Le contrôle du remplissage des cuves a été effectué sous microscope. La micro-cuve a été reportée sur la surface du dispositif sans traitement préalable au plasma O_2 et maintenue par l'intermédiaire d'une lame de verre pour éviter toute fuite due à une surpression lors du remplissage. Après remplissage par la solution d'anticorps cibles et lavage, la cuve est enlevée et la surface de l'échantillon est séchée sous flux azote. Nous n'avons pas souhaité procéder à l'incubation de la solution colloïdale par l'intermédiaire de la cuve pour éviter tout problème de séchage du aux bulles d'air qui délimitent les différents volumes de solutions dans les capillaires. La solution colloïdale a donc été utilisée soit par dépôt direct sur la surface de l'échantillon soit en utilisant une micro-cuve ouverte déposée sur la surface sans traitement préalable. Dans les deux cas, le lavage est effectué en immergeant l'échantillon dans une solution de PBS ou d'eau DI.

4.4 Étude du greffage des nanoparticules : Résultats préliminaires

4.4.1 Densité de greffage

4.4.1.1 Greffage des nanoparticules sur un IgG adsorbé

Avant de nous intéresser au protocole complet mettant en jeu la reconnaissance entre les deux anticorps, nous avons souhaité étudier le greffage des nanoparticules sur une surface de SiO_2 après adsorption de l'anticorps Anti-IgG(A) fonctionnalisé par la biotine. Cette première étape nous permet d'une part de valider le greffage et d'autre de comparer les densités de greffage à celles obtenues par interaction électrostatique.

La figure 4.4(b) nous donne un exemple d'observation MEB d'un greffage de particules d'Or de 78nm fonctionnalisées anti-biotine après incubation d'un anticorps biotinilés sur la surface (Cf protocole). Une image MEB du greffage de nanoparticules par interaction électrostatique (citrate-amine) est donnée pour comparaison. L'image (a) a été obtenue suivant le protocole décrit dans la chapitre précédent après 30 minutes d'incubation. Le dépôt de l'image (b) a été obtenu après incubation pendant 45 minutes d'un anticorps biotinilé et 20 minutes d'incubation de la solution de nanoparticules fonctionnalisées anti-biotine.

Faisons abstraction dans un premier temps des différences de densités de greffage et intéressons nous à l'homogénéité du dépôt. Contrairement aux résultats du chapitre précédent, la répartition des particules sur la surface n'est pas homogène et montre une proportion très importante d'agrégats constitués de quelques particules.

Nous n'avons que peu d'information sur la solution colloïdale et il nous est difficile d'interpréter ce phénomène. Toutefois, les conditions expérimentales du dépôt sont parfaitement similaires à celles présentées dans le chapitre précédent et il paraît légitime

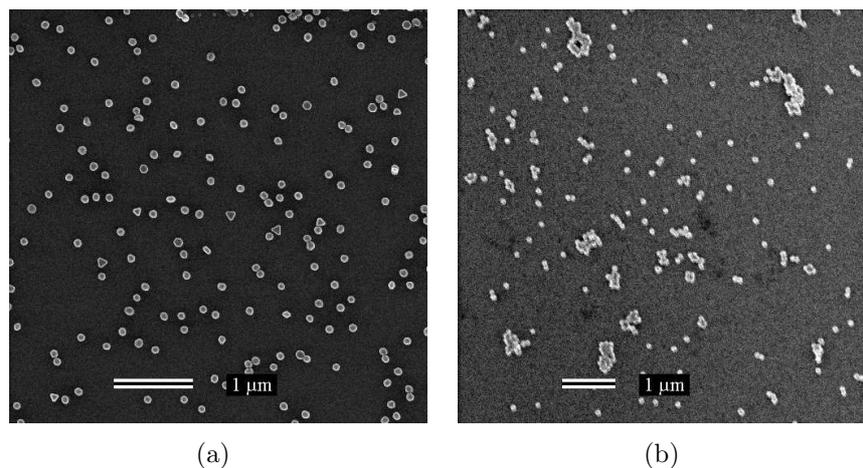


FIG. 4.4 – Images MEB du greffage de nanoparticules d’Or par interaction électrostatique (de type citrate-amine)(a) et par couplage biotine anti-biotine (b).

d’attribuer cet effet à la présence des biomolécules (IgG, biotine, anti-biotine). L’origine la plus probable peut être naturellement attribuée à l’absence ou la faiblesse des répulsions électrostatiques entre les particules de la solution qui peut favoriser la floculation des particules. Ce premier résultat semble constituer une première limitation majeure dans notre schéma de détection en particulier en ce qui concerne l’obtention d’une réponse quantitative.

Intéressons nous maintenant à l’influence sur le dépôt de la présence de l’anticorps cible.

4.4.1.2 Influence du couplage IgG - Anti IgG

La figure 4.5 permet de comparer le résultat précédent au résultat obtenu après 20 minutes d’adsorption d’un anticorps de type IgG(A) biotinilé puis incubation de l’anticorps cible Anti-IgG(A) (45min) et greffage des particules (20min).

Nous pouvons voir que les dépôts présentent les mêmes caractéristiques, à savoir la présence d’agrégats dont la taille peut atteindre quelques dizaines de nanoparticules et une densité de greffage équivalente de l’ordre de 5 à 6 particules μm^2 . Ce phénomène d’agglomération des particules sur la surface apparaît donc aussi bien lors du greffage des nanoparticules directement sur un anti-corps biotinilé adsorbé ou lors du greffage des nanoparticules sur un complexe anticorps/anticorps biotinilé. Son origine n’est donc pas liée à la présence du complexe anticorps primaire/anticorps secondaire sur la surface. Bien que le couplage entre les deux anticorps ne soit donc pas à mettre en cause, l’origine de la formation d’agglomérats est difficile à cerner. La première cause peut être attribuée à la solution de nanoparticules. Toutefois, les conditions de conservation et d’utilisation imposées par le protocole QIAGEN ont été strictement respectées. En particulier, les solutions ont été homogénéisées par agitation (Vortex) avant chaque utilisation. Ce n’est pas cette explication que nous privilégions.

Une autre origine pourrait être attribuée au phénomène de désorption des anticorps Anti-IgG(A) fonctionnalisés par des molécules de biotine. En effet, nous avons vu au paragraphe 4.3.2, que les anticorps sont uniquement adsorbés sur la surface. Lors de

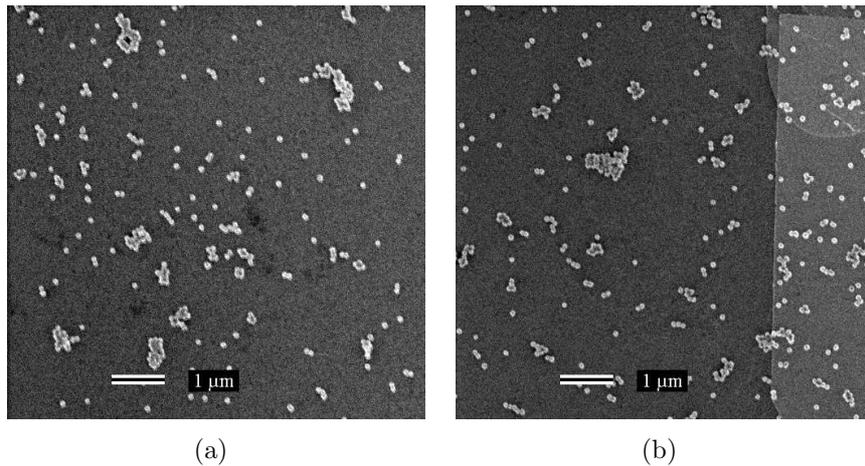


FIG. 4.5 – Deux exemples d’observations MEB de greffage de nanoparticules d’Or par interaction biotine anti-biotine sur un anticorps cible biotinilé en l’absence (a) et en présence de l’anticorps sonde (b) déposé au préalable sur le substrat.

l’incubation de la solution colloïdale, il est probable que certains soient désorbés et resolubilisés dans la solution colloïdale. Ces anticorps peuvent alors réagir avec un ou plusieurs nanoparticules et conduire à un phénomène ”d’agglutination”. Ce phénomène très bien connu est utilisé en immunologie [160] pour visualiser la fixation Anticorps-Antigène (exemple : hemagglutination pour détermination d’un groupe sanguin). Comme nous l’avons vu dans le cas des anticorps IgG (Cf. Annexe C), deux sites de reconnaissance sont présents sur la molécule. Si un antigène est placé à la surface de grosses particules (bactéries,...), un anticorps peut alors se lier à deux particules simultanément. Lorsque les concentrations en anticorps sont suffisantes, ce phénomène conduit à un précipité formés d’agrégats de particules réunies par les anticorps.

Dans notre cas, nous savons que les anticorps Anti-IgG(A) possèdent plusieurs molécules de biotines fixées à leur surface. Il est donc probable que certains anticorps présents en solution puissent se lier à plusieurs particules et conduire à la formation d’agrégats.

4.4.2 Sélectivité du dépôt

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité étudier la sélectivité du greffage vis à vis de l’adsorption des différents anticorps que nous allons utiliser. Cette première étape nous permettra de déterminer l’origine exacte de leur fixation sur la surface.

4.4.2.1 Sélectivité vis à vis des matériaux

La figure 4.6 nous donne un aperçu d’une observation MEB après adsorption d’un anticorps sonde, incubation d’un anticorps cible et greffage des particules. Sur cette figure, on observe clairement l’adsorption des nanoparticules sur la surface. Les surfaces de silice (à gauche) ou d’Or (à droite) présentent des densités de nanoparticules tout à fait comparables.

Ce résultat a été confirmé par l’ensemble des expériences faites sur les dispositifs fabriqués et démontre clairement que le dépôt de nanoparticules induit les mêmes densités

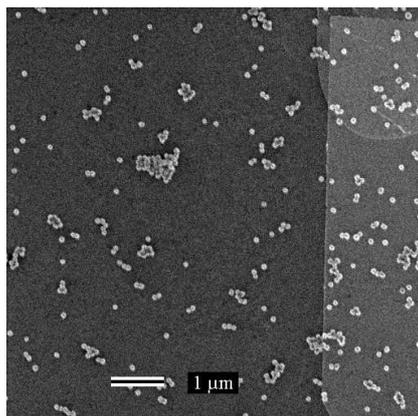


FIG. 4.6 – Exemple d'observation MEB du greffage de nanoparticules après interaction entre anticorps (IgG(A) - Anti IgG(A)) sur une surface d'Or et de silice.

de greffage sur les deux matériaux.

4.4.2.2 Chimio-spécificité du greffage

Pour identifier l'origine exacte du greffage, nous avons procédé à une série de tests pour identifier l'influence de chacune des molécules utilisées sur les résultats de greffage. Notre objectif est d'identifier clairement l'origine du greffage de nanoparticules. La figure 4.7 rassemble les résultats de greffage obtenus après dépôt sur des surfaces de dispositifs vierges de chacune des molécules utilisées.

Ces résultats nous montrent clairement que, dans nos expériences, seule l'adsorption d'anticorps marqués par de la biotine permettent le greffage sur la surface des particules métalliques fonctionnalisées. Ce résultat est très important car il nous permet d'associer avec certitude la présence de nanoparticules avec l'adsorption ou le greffage sur la surface d'anticorps biotinilés. Ces expériences confirment le rôle que nous souhaitions voir jouer par les nanoparticules c'est à dire de révéler les zones de la surface ou tout anticorps biotinilé s'est adsorbé de manière stable.

4.4.2.3 Sélectivité du procédé complet

Dans ce paragraphe, nous allons finalement nous intéresser au protocole expérimental complet que nous avons décrit en introduction de ce chapitre.

La figure 4.8 nous permet de comparer les deux résultats de greffage obtenus après incubation de l'anticorps Anti-IgG(A) et de la solution colloïdale, pour un test dit "positif" et un test "négatif" correspondant respectivement à l'adsorption d'un anticorps IgG(A) et IgG(B) sur la surface.

Nous observons clairement une différence notable de la densité de nanoparticules adsorbées sur la surface. Le test positif est révélé par une forte densité de nanoparticules, le test négatif conserve une densité de nanoparticules extrêmement faible. Nous pouvons donc conclure que dans le cas d'un test immunologique complet, les nanoparticules conservent bien leur rôle de marquage. Comme nous l'avions constaté au paragraphe 4.4.1.2, les densités de greffage obtenues dans le cas positif sont voisines de 5 particules/ μm^2 .

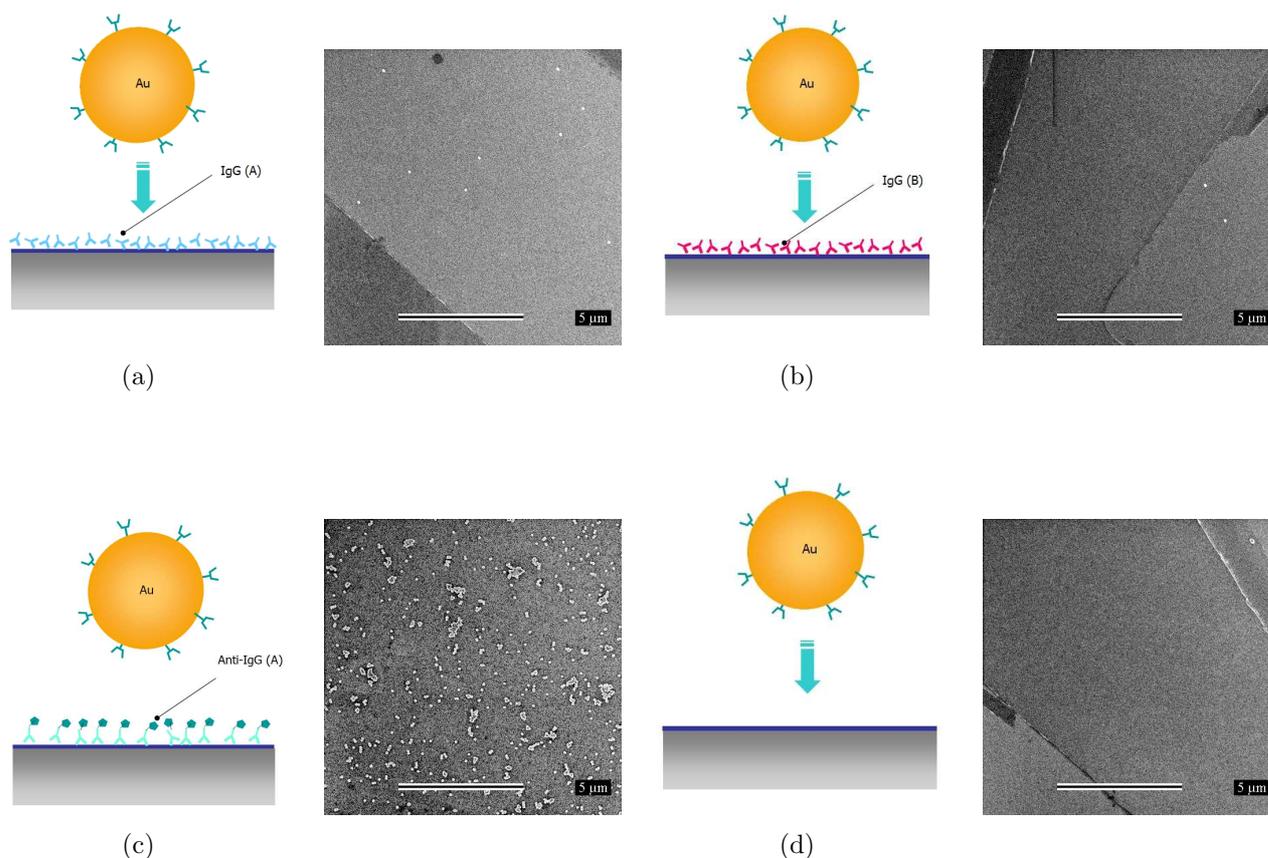


FIG. 4.7 – Comparaison des résultats de greffage de particule (observations MEB) consécutive à l'incubation d'une solution colloïdale sur une surface de silice obtenus après adsorption de l'anticorps IgG(A) (a), de l'anticorps IgG(B) (b) et d'un anticorps anti IgG(A) fonctionnalisé par des molécules de biotine (c). Les derniers résultats (d) ont été obtenus sur un échantillon vierge. Les parties les plus claires des échantillons sont couvertes d'or. Les parties les plus sombres correspondent à la silice.

Dans le cas "négatif" où l'anticorps IgG(B) a été adsorbé sur la surface, nous observons que malgré la non spécificité des deux anticorps, la densité de nanoparticules n'est pas nulle. Une estimation rapide nous permet de dénombrer $0.4 \text{ particules}/\mu\text{m}^2$.

Même si l'écart de densité est très important, nous voyons que la sélectivité du protocole n'est pas totale. Une des interprétations probable de ce phénomène est liée à la première étape d'adsorption de l'anticorps sonde et peut être rapprochée de l'observation faite au paragraphe 4.4.1. En effet, nous savons que les anticorps peuvent s'adsorber spontanément sur une surface de silice et d'Or. Or, nous n'avons aucune information sur la densité et sur le taux de couverture de ces molécules sur la surface. En admettant que le taux de couverture de la surface par la molécule sonde ne soit pas total, il existe donc des sites vacants qui pourront alors permettre l'adsorption des molécules cibles biotinilées. Dans le cas du test négatif, les molécules Anti-IgG(A) biotinilées pourront s'adsorber dans les sites laissés vacants par les molécules sondes et stabiliser ainsi des nanoparticules sur la surface. En ce sens, l'image de la figure 4.8(b) peut être considérée comme une caractérisation des lacunes présentes dans la couche moléculaire formée par

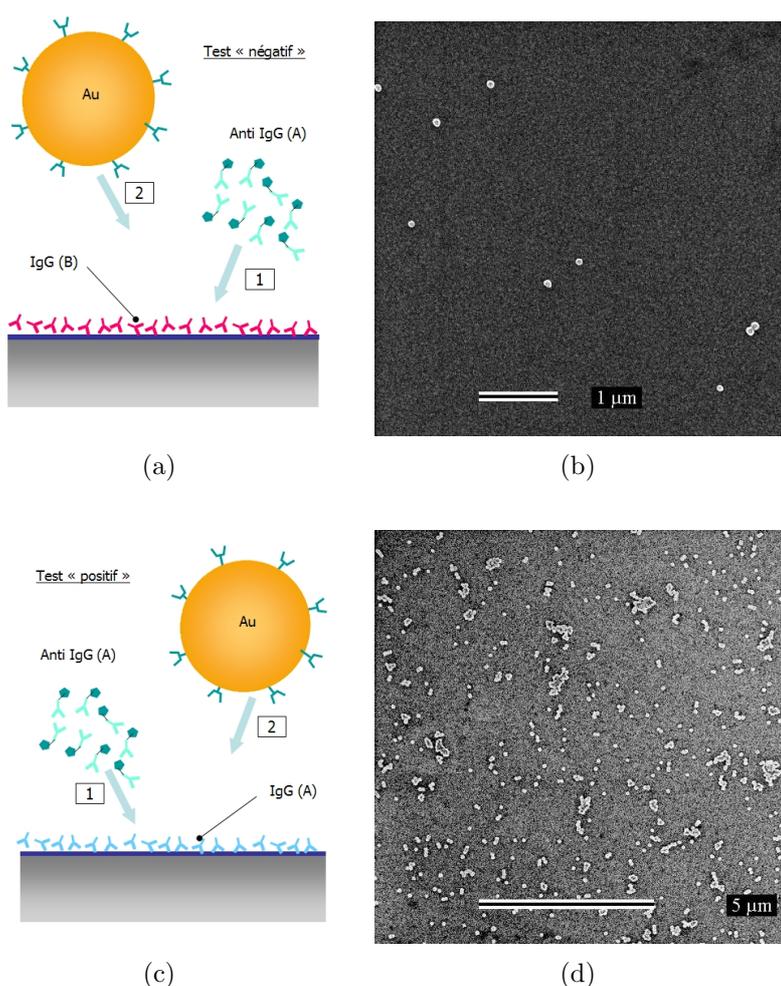


FIG. 4.8 – Comparaison du greffage de particules obtenu après incubation de l'anticorps Anti-IgG(A) sur une surface où ont été adsorbés des anticorps IgG(A) (a) et IgG(B) (b).

les anticorps sondes. Cette image atteste que l'adsorption des sondes n'est pas parfaite et totalement couvrante (ou que les molécules sondes puissent être désorbées de la surface lors de l'incubation de la cible), mais elle montre toutefois que le nombre de défauts est suffisamment faible pour que le discernement des tests positifs et négatifs soit possible. Comme nous l'avons noté au paragraphe 4.4.1, la méthode d'immobilisation que nous avons choisi permet de simplifier les protocoles mais présente un certain nombre d'inconvénients liés à l'adsorption des anticorps sonde sur la surface. Dans les prochains développements de la technique, un greffage irréversible sera à envisager à la fois pour augmenter la densité de greffage mais surtout pour éviter tout phénomène de désorption.

En ce qui concerne le taux de couverture, nous avons pu tester avec succès l'influence de la BSA (Bovine Serum Albumine) pour la passivation des sites laissés vacants après l'adsorption de la sonde. Toutefois, l'utilisation de la BSA ne permet pas de résoudre le problème de la désorption de l'anticorps sonde. Les expériences réalisées par adsorption de la BSA ne sont pas reportées dans ce manuscrit.

4.4.3 Résistance du greffage

Comme dans le cas du chapitre précédent, les échantillons ont subi, après incubation des solutions colloïdales, de nombreuses procédures de lavage par une solution de tampon phosphate y compris des lavages assistés par ultra-sons. Des observations MEB ont permis de confirmer que ces divers traitements n'affectent pas la densité de particules greffées.

4.4.4 Synthèse

A la lumière de ces premiers résultats, nous pouvons faire une première synthèse des propriétés du greffage et des ses limitations.

- La procédure d'immobilisation choisie semble conduire à l'adsorption des anticorps sur la surface des détecteurs sans sélectivité par rapport à la silice ou aux régions métallisées.
- Le protocole expérimental choisi permet d'atteindre des densités de l'ordre de 5 à 6 particules/ μm^2 .
- L'origine du greffage semble être liée uniquement à la présence de molécules d'anticorps fonctionnalisés par des molécules de biotine. La procédure de greffage présente donc une bonne chimio-spécificité.
- La procédure de dépôt choisie semble présenter deux limitations : d'une part l'adsorption des anticorps sur la surface n'est pas un mécanisme irréversible. La désorption des anticorps immobilisés lors d'incubations très longues ne peut pas être totalement exclue. D'autre part, nous n'avons pas d'information sur le taux de couverture offert par la procédure d'adsorption des anticorps sondes sur la surface. La densité de greffage pourrait être augmentée en favorisant l'immobilisation des anticorps.

4.5 Étude du greffage sur des électrodes interdigitées

Dans la section précédente, nous nous sommes intéressés à la chimio-spécificité du greffage des nanoparticules sur la surface. Il serait intéressant à présent d'évaluer l'influence des réseaux d'électrodes sur le dépôt des particules. Pour cela, nous avons reproduit les expériences précédentes sur des dispositifs similaires à ceux utilisés dans le chapitre précédent, à savoir des réseaux de 39 nanoélectrodes inter-digitées séparées de 65nm et présentant une largeur de 35 nm. La surface totale couverte par les électrodes est de l'ordre de $10\mu m^2$. L'épaisseur du dépôt métallique constituant les électrodes a été évalué à 20nm.

4.5.1 Homogénéité du dépôt

Une observation MEB des premiers résultats de greffage de nanoparticules sur un réseau d'électrodes est donné dans la figure 4.9. Dans cet exemple, un premier anticorps IgG (A) a été adsorbé sur la surface pendant 20 minutes puis un anticorps Anti-IgG(A)

biotinilé a ensuite été incubé pendant 45 minutes. Une solution de nanoparticules a alors été incubée sur la surface du dispositif pendant 20 minutes.

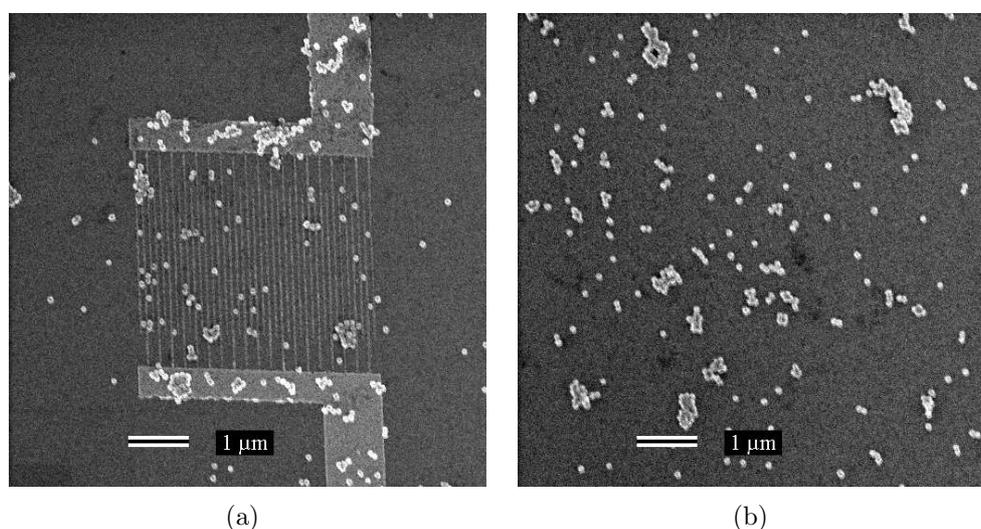


FIG. 4.9 – Comparaison des densités de greffage sur un réseau d'électrodes interdigitées (a) et sur zone non structurée proche du réseau(b).

Nous observons une densité de nanoparticules tout à fait comparable sur la zone active de nos dispositifs et sur des régions de référence situées à proximité du dispositif (b). La présence des électrodes ne change donc pas de façon notable la densité des nanoparticules. De même, les effets d'agglomération entre les nanoparticules déjà observés et discutés dans les paragraphes précédents sont de nouveau clairement visibles sur le réseau d'électrodes inter-digitées. Un seul effet très reproductible spécifique à la présence des nanoélectrodes est toutefois à noter. Dans la périphérie immédiate du réseau, sur des distances de quelques micromètres, il existe une zone déplétée en nanoparticules pour laquelle la densité de nanoparticules adsorbées sur la surface de silice est significativement plus faible que loin des nanoélectrodes. Ainsi, le réseau de nanoélectrodes apparaît dans son ensemble comme une zone favorisant l'adsorption des nanoparticules au détriment des régions adjacentes. La portée de cette interaction est de quelques microns. Cet effet, fort heureusement, conduit à une bonne réactivité de la zone active des dispositifs. Nous n'avons pas cherché à réaliser plus d'expériences systématiques pour tenter de déterminer l'origine de cet effet qui, bien que primordial pour la réussite de notre projet, sera considéré comme secondaire.

4.5.2 Conformation des particules sur les électrodes

4.5.2.1 Observations MEB

Les informations communiquées par la société QIAGEN en ce qui concerne les dimensions des particules nous indiquent un diamètre moyen de 78nm. Aussi, bien que les dispositifs présentent les mêmes dimensions que dans le chapitre précédent, les particules utilisées dans ce chapitre présentent un diamètre moyen légèrement inférieur aux particules déjà utilisées. La figure 4.10(a) nous donne un aperçu des quelques particules

déposées sur une surface de silice couverte après adsorption d'AntiIgG(A). Ces observations MEB nous montrent d'une part que les nanoparticules présentent une morphologie similaire à celle observée dans le chapitre précédent (fluctuations de taille, de forme, présence de facettes,...). Par ailleurs, au vue des observations, leur diamètre est légèrement supérieur au diamètre indiqué et semble compris entre 80 et 90nm.

Remarque : L'analyse logicielle des distributions en taille est rendue difficile par la présence de nombreux agrégats ce qui ne nous permet pas d'être plus précis sur ces données.

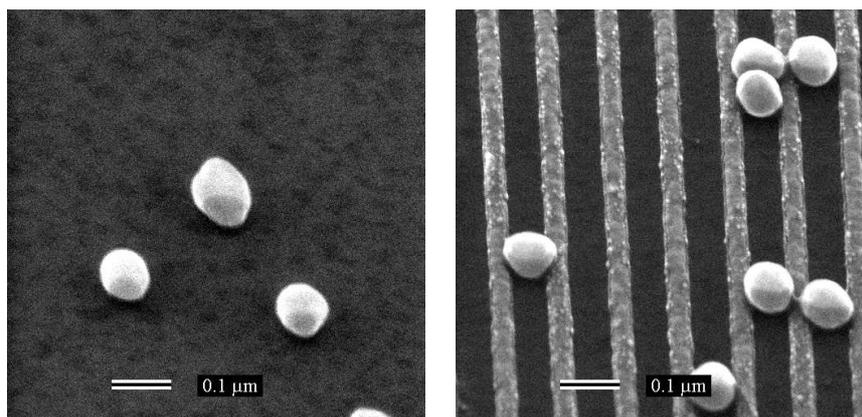


FIG. 4.10 – Exemple d'observation MEB à fort grandissement de particules d'Or fonctionnalisées par des molécules de type anti-biotine et déposées sur dispositif après interaction cible-sonde sur une surface de silice (a) et sur un réseau d'électrodes (b).

Bien que les dimensions des particules soient inférieures de 10 à 20% au cas des premières nanoparticules utilisées, les conditions de pontage semblent respectées. Les particules se placent majoritairement dans les espaces inter-électrodes et semblent entrer en contact avec les deux électrodes en vis à vis (Cf. Figure 4.10(b)). Ce résultat est important car il témoigne de la polyvalence du schéma de détection vis à vis des solutions colloïdales.

4.5.2.2 Observations par AFM

Comme nous l'avions fait dans le chapitre précédent, nous nous sommes également intéressés à l'observation des profils AFM des électrodes après greffage. Il s'agit ici de vérifier les conditions de contact et de pontage en étudiant la variation de hauteur induite par les particules déposées entre les électrodes et en la comparant aux profils enregistrés en l'absence d'électrodes. La figure 4.11 nous donne deux profils issus du dispositif présenté précédemment.

Les observations MEB nous ont confirmé un diamètre moyen des nanoparticules compris entre 80 et 90nm. L'analyse du profil (a), correspondant à une zone hors des électrodes, nous donne effectivement une hauteur relative des particules par rapport à la surface comprise entre 80 et 90nm. Cette première valeur confirme bien les résultats des observations MEB. En ce qui concerne les particules greffées dans l'espace inter-électrode des dispositifs, les profils témoignent également d'une hauteur relative comprise entre 80 et 90nm. Il semble donc bien que les particules adaptent leur conformation pour satisfaire

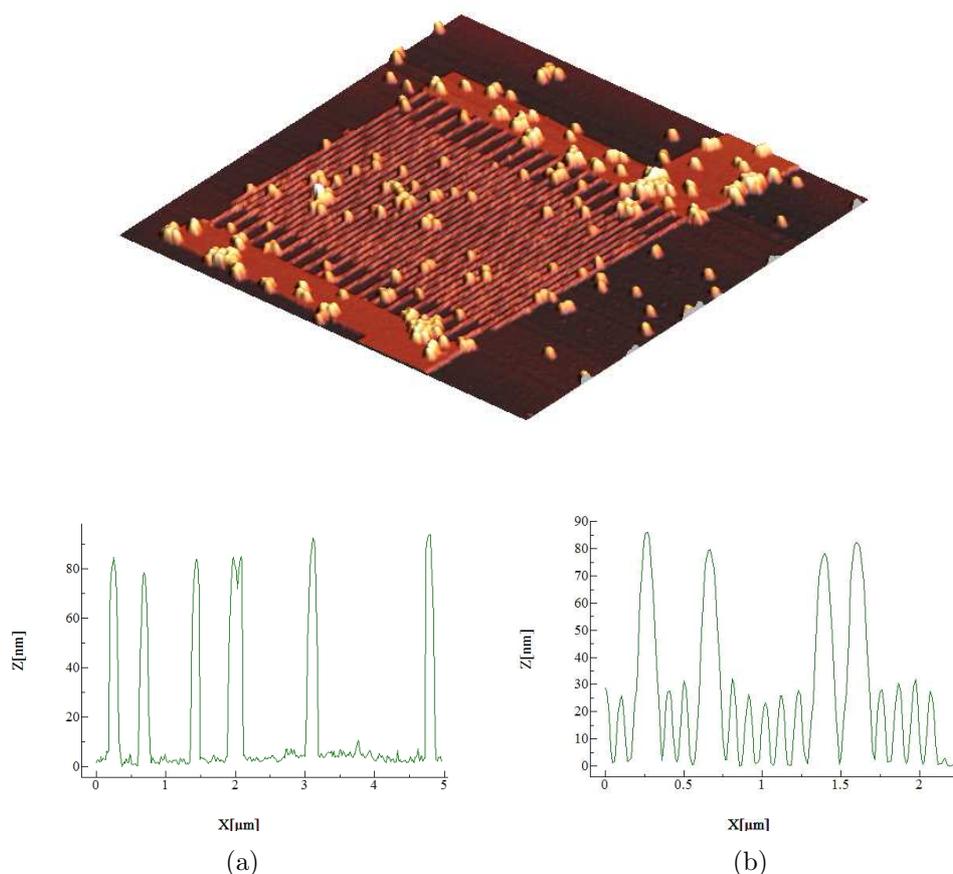


FIG. 4.11 – Observation AFM de la surface d'un réseau d'électrodes interdigitées après le greffage de nanoparticules d'Or fonctionnalisées anti-biotine. (a) Profil AFM obtenus sur une région hors des électrodes et sur le réseau d'électrodes (b).

aux conditions de contact sur le substrat. Par ailleurs, le diamètre des particules satisfait toujours les conditions présentées dans le chapitre précédent (Equation 3.1).

L'épaisseur du dépôt métallique a été évalué à environ 25nm. Toutefois, la hauteur relative moyenne des électrodes paraît bien plus irrégulière que précédemment en dépassant localement 30nm. Aussi allons nous nous intéresser maintenant à l'état de surface des électrodes.

4.5.3 État de surface

La figure 4.12 rassemble deux exemples d'observations MEB de deux réseaux d'électrodes interdigitées obtenus après greffage de nanoparticules d'Or par voie électrostatique (citrate/amine) (a) et après interactions entre anticorps et greffage (b). Intéressons nous particulièrement au cas de la figure 4.12 qui correspond à un procédé complet : adsorption d'un premier anticorps IgG(A), réaction avec un deuxième anticorps biotinilé anti-IgG(A) et adsorption des nanoparticules fonctionnalisées anti-biotine.

La première observation concerne l'état de surface général de la zone de dépôt qui paraît très "propre" et très homogène. L'apparence globale du dispositif paraît très

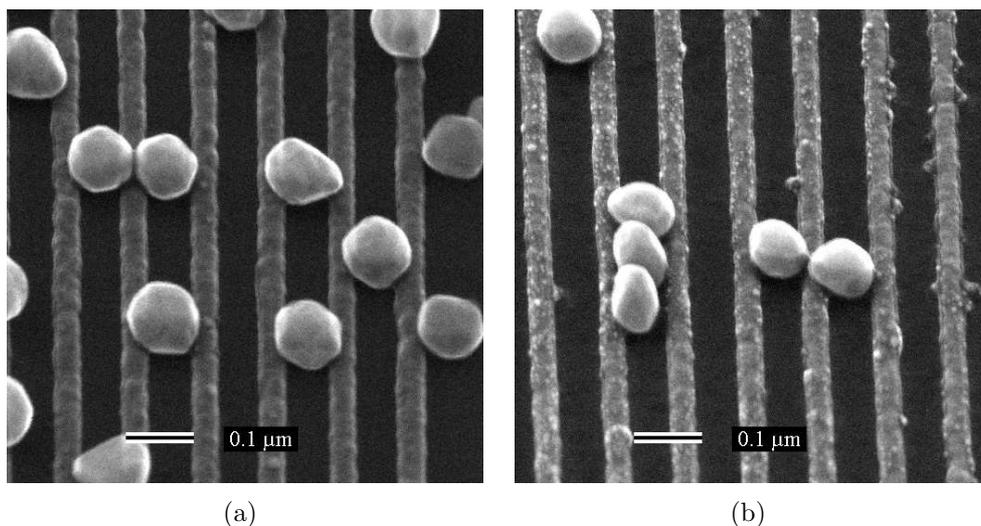


FIG. 4.12 – Comparaison du résultat de greffage de nanoparticules d'Or par voie électrostatique (a) et par couplage d'anticorps (b).

satisfaisante et ne témoigne pas de problème de dépôt parasite au cours du protocole qui comporte pourtant de nombreuses opérations de dépôt et de rinçage consécutives. Toutefois, la comparaison de ces deux images nous permet de mettre en évidence une légère différence dans l'état de surface au niveau des électrodes métalliques. Il semble que des résidus soient présents sur les électrodes sous la forme d'amas globulaires de quelques nanomètres de diamètre.

Il semble également qu'un dépôt résiduel soit présent dans les zones de contact de la particule avec l'électrode et apparaît sur les images sous la forme d'un film transparent qui est particulièrement visible entre deux particules juxtaposées. (Cf. Figure 4.13).

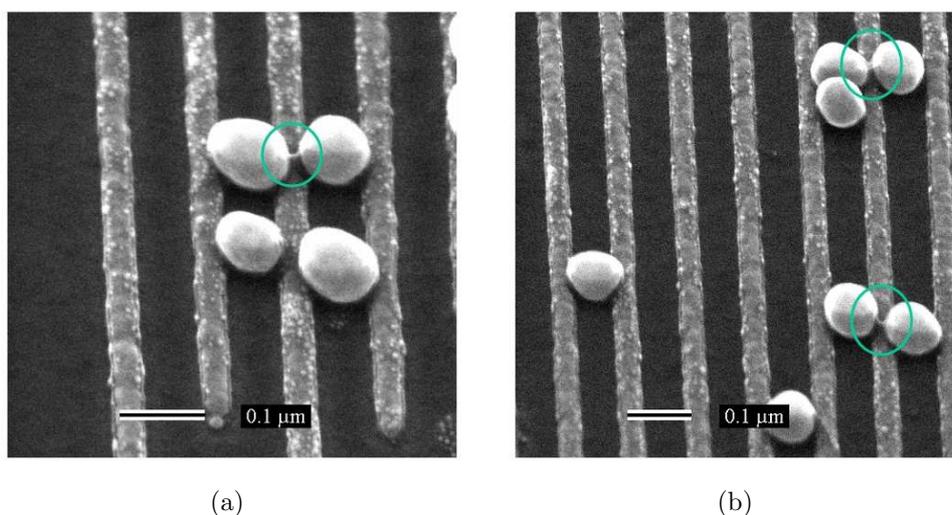


FIG. 4.13 – Observations MEB des zones de contacts entre les particules et entre les particules et les électrodes. Ces observations témoignent d'un dépôt résiduel présent dans les zones de contact ainsi que sur l'ensemble des électrodes.

Ces dépôts n'apparaissent pas dans le cas des premiers greffages par interaction

électrostatique (Cf. Figure 4.12 (a)). Leur origine ne peut donc être liée qu'à la présence d'anticorps ou de résidus provenant des solutions utilisées pour le lavage (Tampon Phosphate, tampon de lavage ...). Même s'il est difficile de cerner l'origine exacte de ces dépôts, il est probable qu'il soient liés à la présence d'anticorps. En effet, les dimensions de ces dépôts pourraient correspondre à la taille typique des anticorps rencontrés dans la littérature [161]. D'autre part, nous savons que ces molécules s'adsorbent très bien sur les surfaces de silice. Cette observation est confortée par les nombreuses étapes de lavages qui permettent vraisemblablement de dissoudre les sels déposés sur la surface mais pas les anticorps.

Ces résultats ne remettent pas en cause pour l'instant le schéma de détection proposé. Les dépôts observés restent très limités et ne compromettent pas le greffage des particules ni même leur faculté à se fixer dans l'espace inter-électrode. Par contre, il est possible que ces dépôts jouent un rôle capital sur la nature du contact électrique entre les nanoparticules et les électrodes, en particulier au niveau de la transparence aux électrons des jonctions formées entre les nanoparticules et les électrodes.

4.5.4 Interprétation des résultats de greffage

Les expériences que nous venons de décrire ont montré que le comportement des nanoparticules d'Or fonctionnalisées anti-biotine est très similaire au comportement des particules vues dans le chapitre précédent. Le dépôt se fait préférentiellement dans l'espace inter-électrodes et les particules semblent également adapter leur conformation pour satisfaire les conditions de contact.

Toutefois, comme en témoigne le phénomène d'agglomération observé dans ce cas, les forces d'interaction intervenant entre les particules elles mêmes et entre les particules et le substrat semblent différentes. Les forces de Van der Waals peuvent toujours être considérées. Par contre les autres forces d'interaction sont cette fois dépendantes des propriétés des anticorps anti-biotine présent sur la surface des nanoparticules et des anticorps immobilisés sur la surface du dispositif. Les forces intervenant dans la formation du complexe antigène-anticorps (Cf. Annexe C) sont basées sur des interactions électrostatiques, dipôle-dipôle et hydrophobes. Le modèle simple que nous avons construit autour du modèle DLVO semble limité et nécessiterait d'être étendu pour prendre en compte l'ensemble de ces forces [129]. Quoiqu'il en soit, il semble que le greffage des nanoparticules dans l'espace inter-électrodes soit reproductible d'un système à l'autre ce qui laisse présager de la polyvalence du schéma de détection vis à vis des méthodes de greffage utilisées et donc des biomolécules impliquées. La généralisation de cet effet pour tout type d'interactions de surface conduisant à l'adsorption des nanoparticules, demeure pour l'instant non expliqué sur le plan de la modélisation, mais les différentes expériences réalisées semblent indiquer une assez grande robustesse de cet effet vis à vis des conditions de surface pourtant très différentes.

4.6 Détection électrique de la formation du complexe cible-sonde

4.6.1 Objectifs

D'après les résultats que nous venons de commenter, il apparaît clairement que notre protocole ne permet pas d'obtenir un dépôt de particules aussi homogène que dans le cas du dépôt par interaction électrostatique. D'une part l'agglomération des particules sur la surface limite la population de particules isolées et d'autre part, l'adsorption des particules semble limiter la sélectivité du procédé. C'est ce que nous souhaitons démontrer dans ce paragraphe. Pour autant, les premiers résultats concernant la sélectivité du greffage nous montrent que les différences de densités de greffage des colloïdes entre les expériences "positives" et "négatives" nous laissent espérer que la différence de conductivité sera elle aussi significative.

4.6.2 Évolution de la conductance au cours des étapes de greffage

Le système de caractérisation électrique utilisé tout au long des expériences est décrit en annexe 4.7. Les paramètres de mesure et de configuration de l'appareil utilisé sont également reportés.

Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser à l'évolution de la conductivité des réseaux d'électrodes interdigitées au cours des étapes de traitement menant au greffage de nanoparticules fonctionnalisées. Cette évolution est représentée sur la figure 4.14. Le dispositif utilisé est constitué comme précédemment d'un réseau de 39 nanoélectrodes interdigitées séparées de 65nm et présentant une largeur de 35 nm. La surface totale couverte par les électrodes est de l'ordre de $10\mu m^2$. L'épaisseur du dépôt métallique constituant les électrodes a été évaluée à 20nm.

4.6.2.1 Dispositif vierge

Comme nous l'avons vu au chapitre 2, les dispositifs vierges présentent une très faible conductance. Avant le début des étapes de fonctionnalisation, nous observons un niveau de courant difficilement mesurable et inférieur à 100fA à 1V. Cette valeur correspond à une résistance supérieure à $20T\Omega$.

4.6.2.2 Dispositif après adsorption du premier anticorps Ig

L'incubation du premier anticorps, la "sonde", a été effectuée suivant le protocole présenté au paragraphe 4.3.2.2. Dans, l'exemple présenté dans la figure 4.14, nous avons utilisé un Anticorps de type IgG(A) (Anti-Lapin du singe). Nous n'observons pas de modification mesurable de la conductance du dispositif. La courbe I(V) nous indique toujours une valeur du courant inférieure à 100fA sous 1V. Ces expériences ont été reproduites avec l'anticorps IgG(B) (Anti-Chèvre du Lapin) et ont conduit au même résultat.

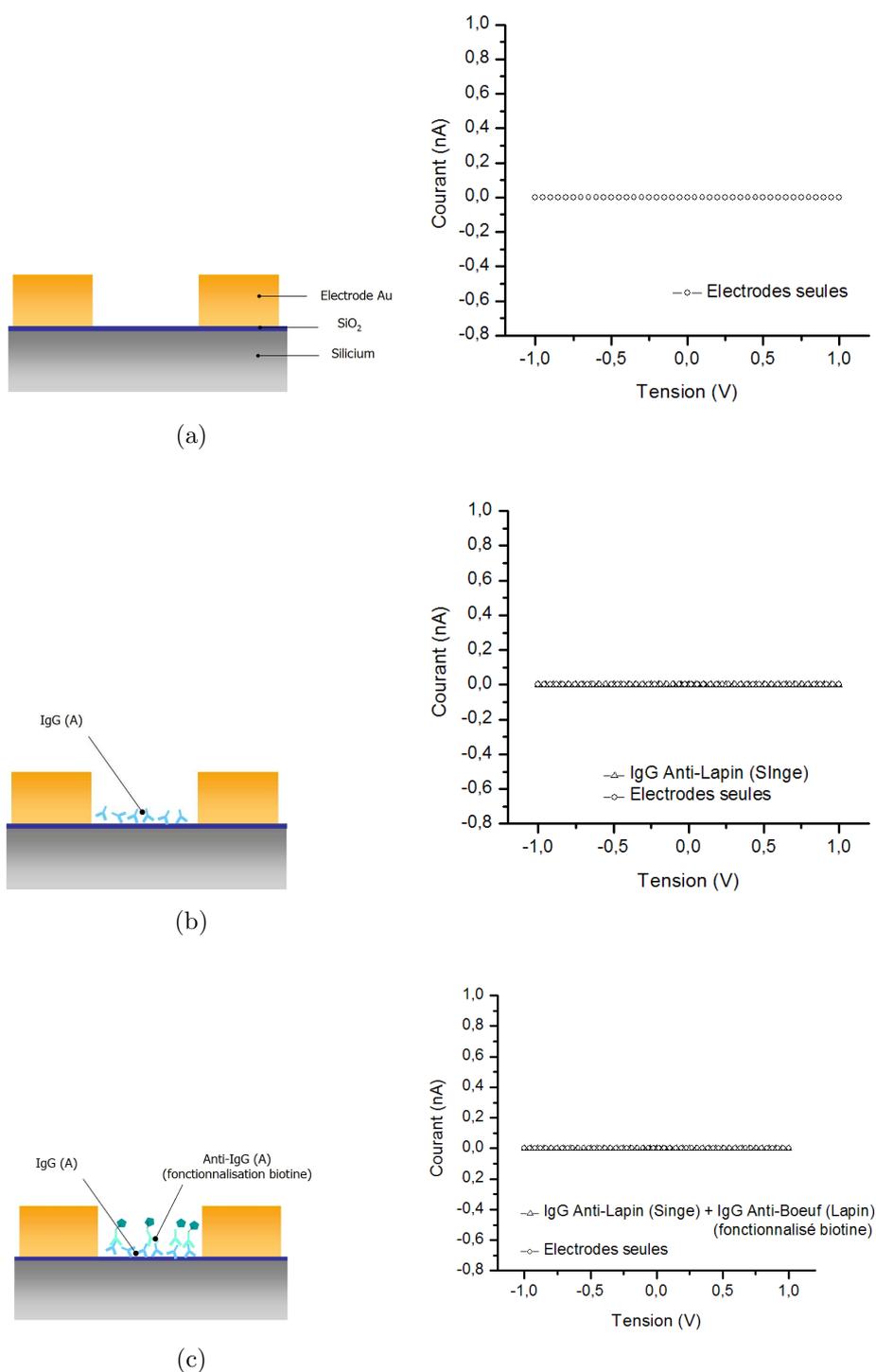


FIG. 4.14 – Evolution de la conductivité d'un réseau d'électrodes interdigitées (largeur=35nm, pas=100nm, épaisseur=20nm) (a) avant adsorption de l'anticorps sonde IgG(A), (b) après adsorption de l'anticorps IgG(A), (c) après incubation de l'anticorps Anti-IgG(A) biotinilé.

4.6.2.3 Dispositif après incubation du deuxième anticorps

Après adsorption de l'anticorps sonde, la solution d'anticorps cible Anti-IgG(A) est incubée sur le dispositif. Après lavage et séchage, les mesures de conductance ne nous permettent pas de noter une variation mesurable du courant. Le faible niveau de courant (inférieur à 100fA à 1V) est un facteur important dans notre protocole car il est une confirmation supplémentaire du bon état de la surface. Il s'agit d'un résultat clef qui nous permettra de donner une interprétation claire de l'origine des modifications de conductance éventuelles. D'autre part, ce résultat met bien évidence le caractère fortement isolant des protéines après leur dépôt sur la surface. En effet, nous savons grâce aux expériences qui vont suivre, qu'à ce stade du protocole, de nombreux anticorps recouvrent la surface des électrodes et de la silice. Une évaluation rapide de la taille de ces protéines par rapport à la séparation des électrodes nous indique qu'une dizaine de molécules seraient susceptibles de former un possible chemin de conduction entre les électrodes. La conductance non mesurable de nos dispositifs avant l'adsorption des nanoparticules montre que la résistance intrinsèque des anticorps après le séchage est supérieure au TOhm. Ceci montre qu'un schéma de détection uniquement fondé sur la mesure de la résistance intrinsèque des biomolécules est irréalisable. L'utilisation de nanoparticules métalliques fonctionnalisées ou de tout autre stratagème pour augmenter la conductance de nos nanodispositifs est donc un passage obligé.

4.6.2.4 Dispositif après greffage des nanoparticules

Nous allons maintenant nous intéresser à deux exemples de caractéristiques électriques obtenues dans les deux cas de figure envisagés.

Dans le premier cas, le test "positif", nous avons déposé sur la surface un anticorps Anti-Lapin du singe qui présente une grande affinité pour l'anticorps fonctionnalisé biotine. Dans le deuxième cas, le test "négatif", un anticorps Anti-Chèvre du Lapin est présent sur la surface. La figure 4.15, résume les caractérisations électriques et les observations MEB dans les deux cas.

Intéressons nous dans un premier temps aux caractéristiques $I(V)$. Nous voyons tout d'abord que dans le cas du test négatif, les niveaux de courants mesurés sont toujours très faibles et inférieur à 100fA sous 1V de polarisation ($R = 10T\Omega$). Dans le cas positif, par contre, la variation de conductance du dispositif est significative. La valeur du courant dépasse 800pA à 1V correspondant à une valeur de résistance de 1.2 GOhms. La différence de conductance entre les cas positifs et négatifs est donc de plus de trois ordres de grandeurs. Nous avons observé précédemment que l'interaction entre les deux anticorps complémentaires engendrait une forte densité de nanoparticules sur la surface orienté dans l'espace inter-électrodes. Nous savons maintenant que ce greffage s'accompagne d'une variation des caractéristiques électriques très largement mesurable.

Ces résultats interprétés seuls sembleraient démontrer une très grande sélectivité du protocole de greffage des nanoparticules et paraissent très encourageants pour une application de détection. Toutefois, les observations MEB des deux échantillons viennent nuancer ces premiers résultats. Dans le cas positif, nous trouvons une valeur de densité de particules proche de 20 particules/ μm^2 qui est en bon accord avec les résultats de la section 4.5.1. Par contre, malgré les niveaux de courants très faibles associés au test négatif, nous observons que quelques nanoparticules se sont déposées sur le dispositif

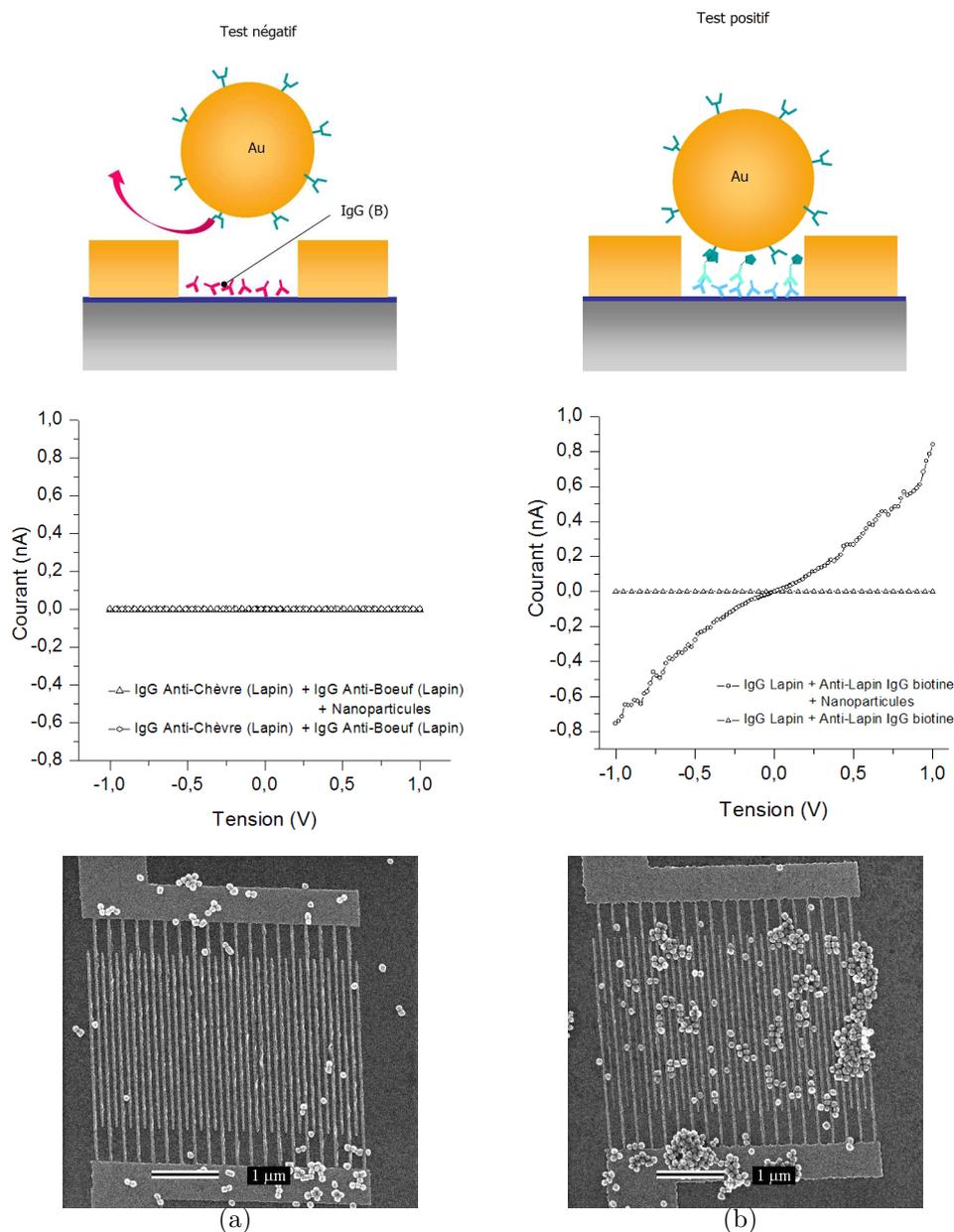


FIG. 4.15 – Principe du test immunologique, caractéristiques électriques et images MEB des dispositifs après incubation pendant 45 min d'un anticorps Anti-Chèvre (Lapin) fonctionnalisé biotine et greffage des nanoparticules d'Or fonctionnalisées Anti-biotine. (Colonne (a) - Expérience de contrôle : la sonde déposée au préalable est un anticorps AntiBoeuf du Lapin (IgG(B)) qui ne se lie pas à la cible. Colonne (b) - Test de reconnaissance. L'anticorps sonde est un Anticorps de type AntiLapin du singe (IgG(A)) qui reconnaît l'épitope porté par la cible.

en se plaçant dans l'espace inter-électrode. Il est difficile d'évaluer le densité de greffage car les particules sont généralement coagulées. Nous avons compté 10 particules sur la surface active du dispositif ($10\mu\text{m}^2$). Ces particules sont a priori susceptibles de modifier la conductance du dispositif mais n'engendrent pas de modification mesurable de la caractéristique I(V). Nous avons vu dans le chapitre précédent que la détection du

greffage d'une seule particule semblait possible. Dans le cas présent, ce résultat est remis en cause et son interprétation nécessite une étude plus précise de la nature du contact entre les nanoparticules et les électrodes recouvertes de protéines.

4.6.3 Interprétations des résultats

4.6.3.1 Nature du contact

La nature du contact entre les nanoparticules et les électrodes peut être discutée en comparant les résultats avec ceux obtenus dans le chapitre précédent pour le cas de l'adsorption de type électrostatique. Dans ce dernier cas, en analysant la réponse électrique des dispositifs après adsorption des nanoparticules, il a été possible de déterminer la résistance moyenne de chaque chemin de conduction engendré par une nanoparticule. Nous avons distingué deux cas différents en fonction du nombre total de nanoparticules déposées. Dans le cas où les nanoparticules restent isolées les unes des autres, la résistance moyenne était d'environ $90G\Omega$ (Cf. Figure 3.27 (b)). Dans le cas où les nanoparticules formaient des agrégats plus ou moins importants, la résistance moyenne par nanoparticule était réduite à $5G\Omega$ (Cf. Figure 3.27 (d)). Rappelons également que cette résistance est, selon nous, liée à la transparence aux électrons des jonctions formées au contact des nanoparticules sur les électrodes et en aucun cas à la résistivité intrinsèque des nanoparticules. Dans le cas qui nous intéresse maintenant, nous avons deux expériences qui peuvent être comparées à ces résultats. Dans le cas du test immunologique négatif, (Cf. Figure 4.15 (a)), nous observons une dizaine de nanoparticules isolées qui résultent de l'adsorption non spécifique de l'anticorps biotinilé en quelques sites épars. La caractéristique électrique indique dans ce cas une conductance très faible qui reste non mesurable pour des tensions de polarisation inférieure à 1V. Nous estimons donc que la résistance moyenne du chemin de conduction induit par chaque nanoparticule reste supérieure à $10T\Omega$. Cette valeur est environ 100 fois supérieure au cas des nanoparticules adsorbées sur une surface silanisée sans biomolécule ($90G\Omega$). Nous pouvons donc conclure que les résistances des jonctions formées au contact des nanoparticules sont nettement plus fortes dans le cas des nanoparticules adsorbées par interaction cible/sonde entre protéines que dans le cas d'une interaction de type citrate/amine. Ce résultat n'est en aucun cas surprenant. En effet, compte tenu de la taille des biomolécules impliquées dans ces deux types de fixation, il est probable que les jonctions métal/complexe de type anticorps/biotine/anti-biotine/nanoparticules soient plus opaques au transfert d'électrons que les jonctions de type métal/silane-amine/citrate/nanoparticules, même si la conformation exacte et le nombre exact de molécules impliquées dans ces contacts soient très difficile à connaître avec précision. Ces résultats viennent de plus corroborer les observations faites au paragraphe 4.5.3 qui ont montré la présence de résidus sur les nanoélectrodes qui sont probablement liés à la présence des anticorps et qui constituent autant d'obstacles pour le transfert électronique. Dans le cas du test immunologique positif (Cf. Figure 4.15 (b)), nous observons environ 200 nanoparticules piégées entre les électrodes qui s'organisent sous la forme d'agrégats de grande taille. A partir de la conductance du dispositif (800pA à 1V), nous pouvons estimer la résistance moyenne de chaque chemin de conduction induit par chaque nanoparticule à $250G\Omega$. Si l'on compare cette valeur à celle obtenue dans le cas des nanoparticules adsorbées par interaction électrostatique pour une densité de nanoparticules comparable ($5G\Omega$), nous voyons une

fois de plus que les nanoparticules fixées par un complexe anticorps/anticorps sont significativement plus résistives. Le rapport est maintenant d'environ 50.

Les deux résultats et leur comparaison avec ceux obtenus au chapitre précédent montrent clairement que les nanoparticules fixées par un complexe entre protéines induisent des chemins de conduction qui sont environ 50 à 100 fois plus résistifs à température ambiante que ceux engendrés par des nanoparticules fixées par interaction électrostatique de type citrate/amine-silane. La nature du contact entre les nanoparticules et les électrodes est donc significativement différente d'un point de vue électrique ce qui confirme les observations morphologiques de la surface des électrodes. Tous nos résultats convergent pour indiquer de manière claire que la réponse en courant des dispositifs est dictée par la résistance des jonctions formées au contact des nanoparticules sur les électrodes. L'élucidation des mécanismes de transport mériterait de nombreuses études spécifiques. Une étude en température (vers les basses températures) permettrait probablement de mieux identifier la nature du transport au sein des jonctions. La dispersion des conductances de toutes les nanojonctions formées par les nanoparticules est également un point capital qui conviendrait d'être étudié même si de nombreuses difficultés techniques sont à envisager. En effet, nous verrons dans la suite que cette dispersion conditionne fortement l'interprétation que nous pourrions donner en terme quantitatif de la réponse électrique des dispositifs.

4.6.3.2 Linéarité de la détection

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les mesures quantitatives étaient rendues difficiles de par la disparité des résistances de contacts associées à chaque particule ainsi que de par la juxtaposition de particules qui multiplie les chemins de conduction. Nous nous confrontons ici à un problème supplémentaire qui est celui de l'agglomération des particules sur les dispositifs. En effet, la proportion de nanoparticules isolées telle que celle que nous pouvons observer dans la figure 4.15 est relativement faible de l'ordre de 20%. Il est donc difficile d'évaluer le nombre de nanoparticules participant à la conduction.

Comme nous l'avons vu tout au long du chapitre une des interprétations les plus probables pour interpréter ce phénomène est liée à la désorption des anticorps anti-IgG(A) qui conduit vraisemblablement à une agglutination des particules sur la surface. Nous voyons une fois de plus l'importance du protocole d'immobilisation des molécules sondes sur la surface et les limitations d'un protocole basé sur la simple adsorption des anticorps sur la surface.

4.6.3.3 Sélectivité

Nous avons vu que dans le cas des expériences de test "négatives", l'incubation de la solution colloïdale conduisait malgré l'interaction non spécifique entre la cible et la sonde, au dépôt de quelques particules sur le réseau d'électrodes. Cette observation est facilement interprétable à partir des résultats du paragraphe 4.4.2.2. Le taux de couverture offert par l'adsorption de la molécule sonde n'est pas de 100% et des sites d'adsorption sont alors disponibles pour l'immobilisation des anticorps cibles et donc pour le greffage de particules.

4.6.4 Vers une mesure quantitative

Jusqu'à présent, nous n'avons discuté que de l'utilisation des dispositifs pour des applications de détection en tout ou rien. Il serait maintenant intéressant de pouvoir envisager les performances du schéma de détection dans la perspective de mesures quantitatives permettant d'évaluer la quantité de molécules cibles, et l'occurrence des anticorps, immobilisés sur une surface. Même si nous n'avons pas pu effectuer de tests complémentaires en ce sens, nous nous proposons de discuter des perspectives offertes par le schéma de détection à la vue des résultats que nous avons obtenus dans ces deux derniers chapitres.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'utilisation de nanoélectrodes séparées par de très faibles gaps nous permettait d'obtenir une détection hautement sensible jusqu'à une nanoparticule. Toutefois, dans le cas de la détection d'anticorps, le principe de la détection n'est pas basé sur la détection des anticorps eux-mêmes mais uniquement de leur présence par l'intermédiaire du dépôt de particules. Aussi, comme nous allons le voir, nous ne pouvons pas assimiler la sensibilité de la détection des nanoparticules avec la sensibilité de la détection des anticorps cibles. Pour illustrer notre propos, considérons le schéma de la figure 4.16.

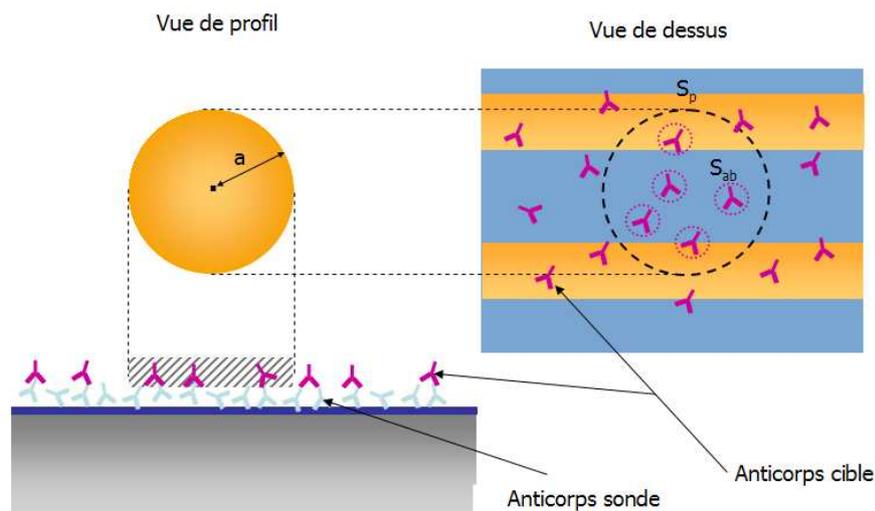


FIG. 4.16 – Schéma illustrant l'influence du diamètre a d'une nanoparticule sur le nombre d'anticorps impliqués dans l'immobilisation de la particule sur la surface. S_p et S_{ab} sont les surfaces moyennes projetées d'une nanoparticule et d'une molécule d'anticorps respectivement. Les groupements biotine et anti-biotine présents respectivement sur les anticorps cible et la particule ont été volontairement effacés pour favoriser la compréhension du schéma.

Soient S_p et S_{ab} les surfaces moyennes projetées d'une nanoparticule et d'une molécule d'anticorps respectivement. Comme nous pouvons l'observer sur ce schéma, chaque particule greffée occupe un volume défini et masque, vis à vis des autres particules encore en solution, une surface circulaire S_p de rayon a . Le diamètre des particules que nous avons utilisé est de l'ordre de 78nm. La surface occupée par un anticorps peu, quand à elle être considérée comme circulaire avec un diamètre compris entre 10 et 15nm [147].

Nous voyons clairement d'après ces valeurs que $S_p \gg S_{ab}$. Aussi, quelque soit le nombre d'anticorps cibles permettant son immobilisation, chaque particule couvre une surface pour laquelle plusieurs anticorps sont immobilisés. Le nombre de nanoparticules greffées sur le dispositif ne traduit donc pas directement le nombre d'anticorps cibles immobilisés sur la surface.

Le nombre maximal d'anticorps N_{ab} correspondant à la surface couverte par une nanoparticule peut être déduit du rapport

$$N_{ab} \simeq \frac{S_p}{S_{ab}}$$

Par ailleurs, chaque molécule cible déposée sur la surface est susceptible d'engendrer l'immobilisation d'une nanoparticule. Aussi à chaque nanoparticule déposée sur la surface peut être attribué un nombre d'anticorps compris entre 1 et N_{ab} .

Comment cette observation se traduit-elle au niveau de la réponse électrique du dispositif? Pour simplifier notre discussion, considérons que chaque nanoparticule greffée sur la surface et placée dans l'espace inter-électrodes du dispositif, engendre une variation de conductivité constante et reproductible pour chaque particule. Le courant global I_{tot} traversant le dispositif peut donc être assimilé à la somme des contributions i_p de chaque particule. En évaluant la valeur de i_p , nous serions donc en mesure de donner le nombre N_p de nanoparticules immobilisées entre les électrodes du dispositif en utilisant la relation :

$$I_{tot} = N_p \times i_p$$

Toutefois, le nombre de particules N_{ab} ne nous permet pas, comme nous l'avons dit, d'évaluer précisément le nombre d'anticorps masqués par une nanoparticule. Dans un cas extrême, nous pouvons considérer qu'à chaque nanoparticule est associé un seul anticorps qui a permis son immobilisation. A l'opposé, nous pouvons considérer qu'un nombre maximal N_{ab} d'anticorps est attribuable à la surface couverte par chaque particule. Ainsi, pour chaque valeur de I_{tot} , nous pouvons encadrer le nombre réel N de molécules d'anticorps fixées sur la surface par :

$$N_p \leq N \leq N_p \times N_{ab}$$

Il nous est donc possible de tracer une courbe d'étalonnage de la réponse en courant I_{tot} d'un dispositif en fonction du nombre de d'anticorps N . Considérons le graphe de la figure 4.17.

Sur ce graphe nous pouvons distinguer deux courbes (1) et (2). La courbe (1) représente un premier cas limite pour lequel un seul et unique anticorps est attribué à chaque particule. Nous voyons ainsi que chaque anticorps détecté contribue à une augmentation du courant d'une valeur i_p . Il s'agit donc d'une droite de pente égale à l'unité. La courbe (2) représente le cas opposé pour lequel un nombre N_{ab} d'anticorps cibles peuvent être associés à chaque nanoparticule. Cette courbe n'est pas linéaire. Elle est constitués de sauts qui apparaissent lorsque une particule supplémentaire est immobilisée c'est à dire pour chaque valeur de N correspondant à un multiple de N_{ab} .

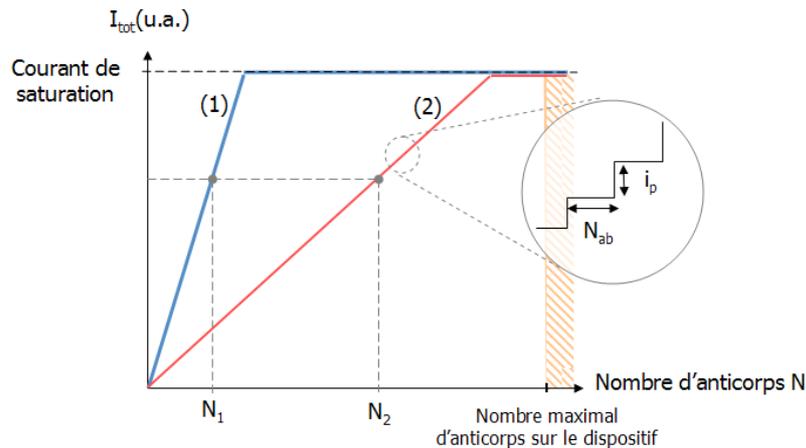


FIG. 4.17 – Illustration de la réponse électrique d'un dispositif à base de nanoélectrodes interdigitées vis à vis du nombre d'anticorps réellement fixés sur la surface de la zone active.

Nous voyons donc que pour une valeur donnée I du courant le nombre d'anticorps mis en jeu par le dépôt de nanoparticules est compris entre deux valeurs limites de N : N_1 et N_2 données par chacune des courbes. Bien entendu, le nombre maximal de nanoparticules détectables est limité par la surface active du dispositif. Il existe donc une valeur limite du courant liée à la saturation du dispositif par les nanoparticules. Ce nombre limitera par conséquent le nombre maximal d'anticorps détectables.

Procédons à une application numérique dans le cas de nos dispositifs. Considérons un réseau d'électrodes couvrant une surface de $10\mu\text{m}^2$ (largeur $4\mu\text{m}^2$, longueur $2.5\mu\text{m}^2$). Considérons tout d'abord des particules de 78nm de diamètre sur un réseau au pas de 100nm. Un calcul simple nous permet d'estimer le nombre maximal de nanoparticules détectables, en d'autres termes couvrant la totalité des espaces inter-électrodes, à $\simeq 1200$ particules. Chaque nanoparticule couvre une surface équivalent à environ $S_p/S_a \simeq 33$ anticorps. Le nombre maximal d'anticorps immobilisés sur la surface du dispositif est donc de $N_{max} \simeq 39600$. Le graphe de la figure 4.18(a) résume ces données.

A titre d'exemple, nous voyons que pour une valeur de courant de $10 \times i_p$, soit 10 nanoparticules détectées, le nombre d'anticorps qu'il est possible d'évaluer varie entre 10 et 330. Ce premier résultat paraît particulièrement limitant pour la réalisation de mesures quantitatives puisqu'il nous très difficile de quantifier le nombre d'anticorps immobilisés sur le dispositif.

La modification d'un paramètre permettrait toutefois d'améliorer les capacités de détection du schéma proposé. En effet, intéressons nous à l'influence d'une diminution de la taille des nanoparticules sur la réponse électrique. Pour cela considérons une surface active des dispositifs toujours égale à $10\mu\text{m}^2$. Le nombre maximal d'anticorps immobilisés sur le dispositif est toujours le même $N_{max} \simeq 39600$. Toutefois, nous voyons que le nombre d'anticorps attribuables à chaque particule n'est plus compris qu'entre 1 et 2. La répercussion de cette modification est illustrée sur le graphe de la figure 4.18(b). Nous voyons que les deux courbes qui définissent les deux valeurs limites du nombre d'anti-

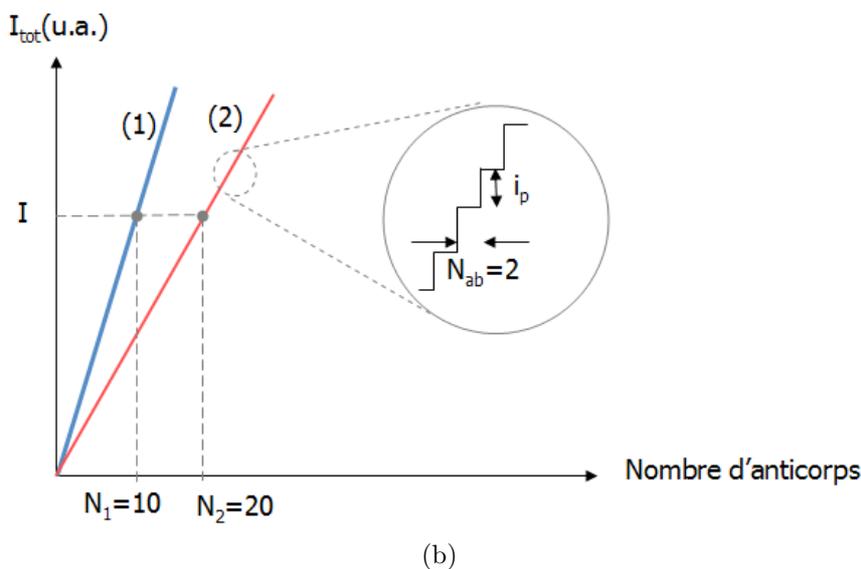
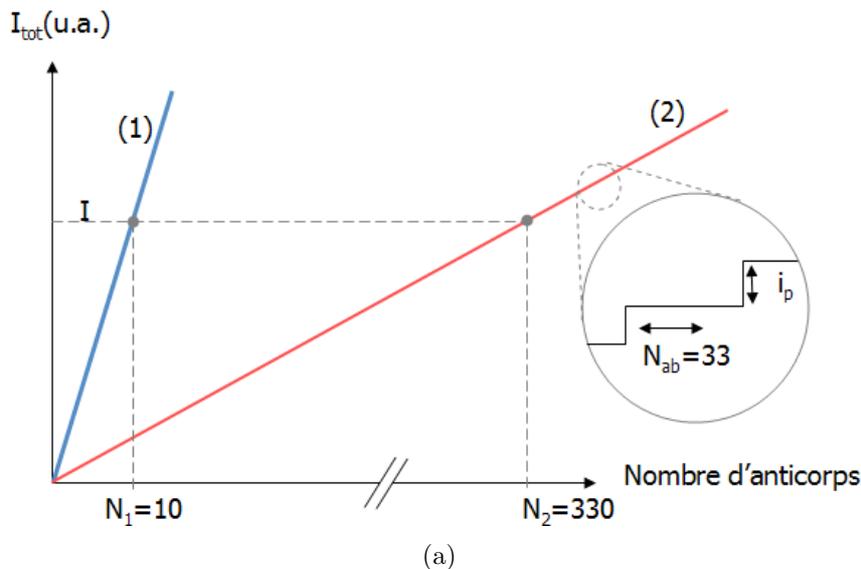


FIG. 4.18 – Comparaison des réponses électriques de deux dispositifs de type réseaux d'électrodes interdigitées aux pas de 100nm (a) et 40nm (b) pour lesquels sont utilisées respectivement des particules de 78 et 20 nm de diamètre. Les valeurs de courant sont exprimées en multiple de i_p

corps correspondant sont très proches l'une de l'autre. Reprenons l'exemple précédent en considérant une valeur de courant de $10 \times i_p$. Nous voyons cette fois que le nombre d'anticorps qu'il nous est possible d'évaluer ne varie plus qu'entre 10 et 20.

Ainsi, une diminution de la taille des nanoparticules d'un facteur 4 permet d'améliorer par un facteur environ 16 la précision de l'évaluation du nombre d'anticorps.

Bien entendu, cette discussion simpliste doit être nuancée par les approximations que nous avons effectuées. D'une part, nous avons considéré une répartition homogène des anticorps sur l'ensemble de la surface et une efficacité absolue des anticorps pour l'immobilisation des nanoparticules. D'autre part, nous avons effectué une approximation très importante quant à la réponse électrique associée à chaque pontage des électrodes par

une particule. Les dispersions de courant observées pour chaque particule immobilisée dans l'espace inter-électrodes (Cf. chapitre 3) constitueront une source supplémentaire d'erreur sur la détermination du nombre réel d'anticorps sur la surface. En ce sens, la figure 4.18 ne peut être vue que comme une hypothèse optimiste. Aussi, l'interprétation et la compréhension de la nature du contact électrique entre particule et électrodes est fondamentale pour notre étude.

Cependant, malgré ces approximations fortes, l'influence d'une diminution des dimensions des nanoparticules et donc des dispositifs est particulièrement prometteuse pour les développements du schéma de détection. Nous voyons que dans le cas de nanoparticules de 20 nanomètre de diamètre, la sensibilité du dispositif serait comprise entre 1 et 2 anticorps ce qu'aucune méthode de détection ne permet de proposer à l'heure actuelle. Le nombre maximal d'anticorps détectables reste constant puisque directement lié à la surface active des dispositifs.

Il est maintenant relativement simple d'imaginer l'influence de la dispersion des conductances liées à chaque particule. En effet, il suffit de considérer que chaque saut de courant imputable à une nanoparticule supplémentaire est distribué. Cette distribution rend compte de l'hétérogénéité, des jonctions tunnels formées entre chaque particule et les électrodes et la possible agglomération d'une particule à un amas déjà existant. Bien sûr, dans l'état actuel de nos connaissances, cette distribution est inconnue. Nous n'avons pas réalisé suffisamment de mesures pour connaître l'amplitude de cette distribution. Nous allons donc considérer que chaque saut de courant est maintenant compris entre deux valeurs limites i_{pmin} et i_{pmax} . Les courbes de la figure 4.19 peuvent être simplement retracées en considérant que les droites limites (1) et (2) sont maintenant des bandes dont la largeur dépend du nombre de particules détectées.

On constate désormais que la fourchette d'encadrement du nombre réel d'anticorps N est étendue du fait de la dispersion des courants de conduction. De manière très intéressante, nous constatons que dans le cas des plus petites particules (diamètre 20nm (Cf. figure 4.19 (b)), l'élargissement de la fourchette due à la dispersion des conductances est moindre, car la pente de la courbe (2) devient plus grande, ce qui limite l'étendue de la zone hachurée. Là encore, nous voyons tout l'intérêt de réduire la dimension des nanoparticules et de se rapprocher de l'adéquation des tailles entre les nanoparticules et les molécules cibles.

4.7 Conclusion et perspectives

Dans le chapitre précédent, nous avons pu mettre en évidence la pertinence de l'approche combinant des réseaux de nanoélectrodes interdigitées avec la détection de nanoparticules métalliques. Nous venons ici de démontrer qu'il était possible de transposer ce schéma de détection pour la détection d'anticorps. Le dépôt de nanoparticules obtenu par cette voie semble respecter la spécificité de cette interaction biologique. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence, comme dans le cas des interactions électrostatiques (citrate-amine), que la topologie induite par les réseaux d'électrodes permettait de favoriser le dépôt de nanoparticules dans l'espace inter-électrodes. Nous avons également montré que ce phénomène engendrait une augmentation très importante de la conductance des dispositifs et que seules les nanoparticules sont à l'origine de ces modifications. Ainsi, le protocole que nous avons développé est parfaitement compatible avec

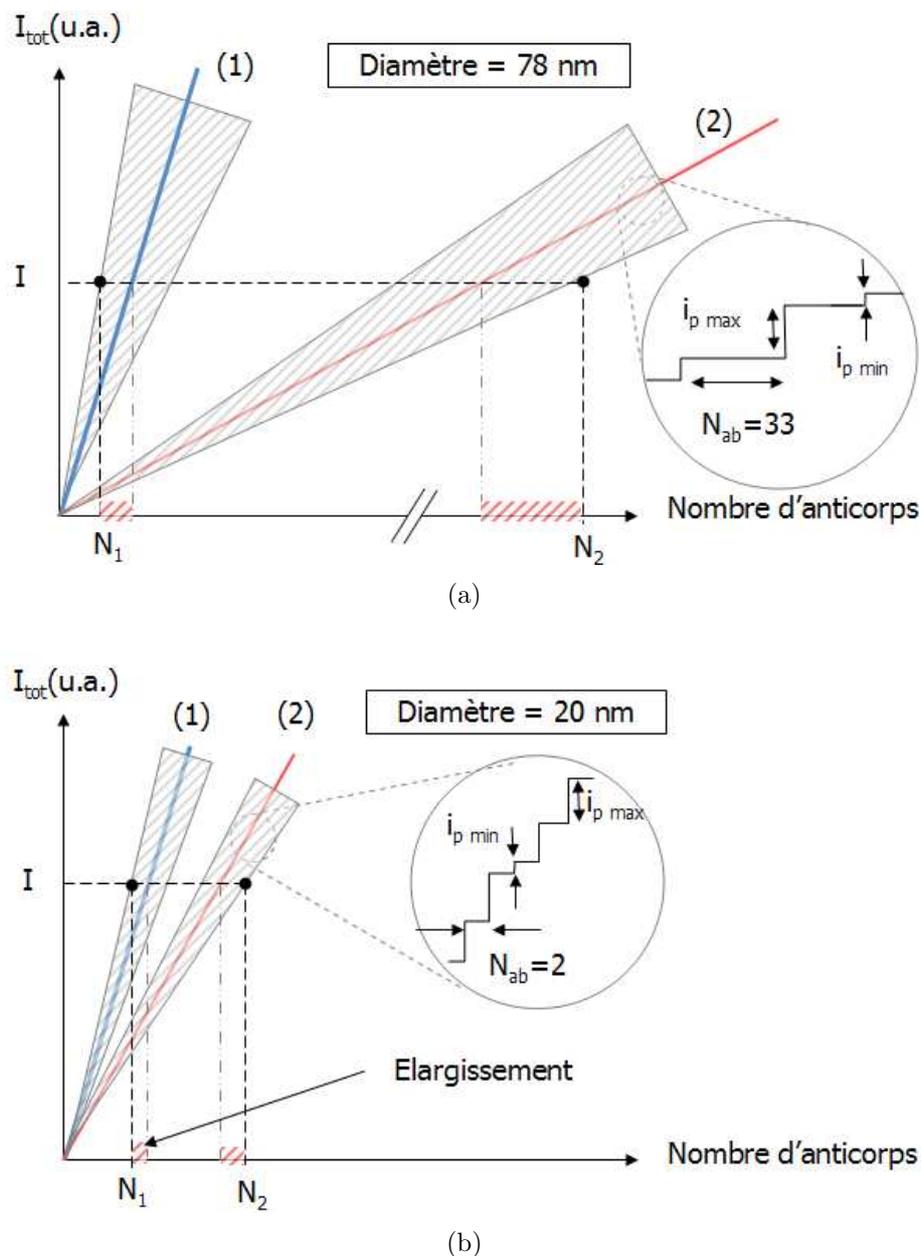


FIG. 4.19 – Influence sur la réponse globale des dispositifs d'une distribution des valeurs de courant associées à chaque nanoparticule de diamètre 100nm (a) et 20nm(b)

un procédé de détection d'anticorps ie un immuno-détecteur.

Les avantages apportés par ce schéma de détection sont nombreux. Tout d'abord, le principe de mesure reste très simple et consiste simplement au suivi de l'évolution des caractéristiques $I(V)$ des dispositifs. Nous utilisons également des dispositifs planaires qui permettent d'utiliser une approche conventionnelle d'interaction cible-sonde sur une surface. Enfin, la compatibilité des électrodes avec des mesures en solutions et l'utilisation de dispositifs simples de microfluidiques sont des arguments essentiels pour l'intégration de ces dispositifs et le développement d'un biocapteur.

Quelles sont les perspectives d'évolution et d'amélioration de ce schéma de détection ?

Comme nous l'avons répété plusieurs fois, le principe de la détection repose uniquement sur le pontage des électrodes par des nanoparticules. Ainsi, la sensibilité de la détection est, comme nous avons pu le voir dans le dernier paragraphe de ce chapitre, gouvernée par la dimension des particules. Dans le cas des anticorps, nous avons vu que des particules de 20nm de diamètre environ permettraient d'associer à chaque anticorps une ou deux particules et donc d'atteindre une sensibilité ultime. Toutefois, nous avons vu que les dimensions des nanoparticules sont directement liées aux dimensions des espaces inter-électrodes et une réduction de la taille des particules nécessitera la mise au point des paramètres de fabrication de dispositifs de plus faibles dimensions. Des améliorations doivent également être apportées au protocole d'immobilisation des sondes sur la surface. En effet, nous avons mis en évidence les limitations liées à l'utilisation des seules propriétés d'adsorption des anticorps qui ne permettent pas d'obtenir une fonctionnalisation complète et durable de la surface. Certains phénomènes de désorption semblent limiter la sélectivité en offrant la possibilité à certaines molécules cibles de se fixer sur la surface et d'engendrer une réponse non-spécifique. Un de nos prochains objectifs consistera à immobiliser de façon covalente les anticorps sur la surface et de passiver les sites laissés vacants, par exemple en utilisant un dépôt de BSA. Enfin, la réalisation de mesures quantitatives reste pour l'instant à l'étude. Les résultats que nous avons pu obtenir ont montré que la sensibilité du dispositif reste très importante. Des tests complémentaires sont actuellement en cours pour évaluer plus précisément la linéarité de la réponse électrique des dispositifs. Toutefois, nous avons proposé quelques pistes de réflexion à partir des résultats que nous avons pu obtenir à ce jour. Nous avons vu en particulier les perspectives offertes par une diminution de la taille des nanoparticules et donc des électrodes.

Conclusion générale

L'objectif principal de ce projet de thèse consistait à démontrer les intérêts potentiels de l'utilisation de nanosystèmes pour réaliser des opérations de biodétection simples, à haute sensibilité, rapides et compatibles avec une intégration dans un système de type biopuce. A l'issue des travaux qui ont été présentés dans ce manuscrit, cet objectif semble atteint.

En utilisant un procédé planaire mettant en jeu la lithographie électronique à haute résolution, nous avons pu démontrer la fabrication reproductible de nanoélectrodes présentant des gaps de dimensions comprises entre 100nm et 15nm. De part leur dimension, ces dispositifs sont compatibles avec des applications d'adressage à l'échelle moléculaire. Nous avons également vu qu'une architecture de type réseaux d'électrodes interdigitées, nous permettait d'intégrer un très grand nombre d'électrodes sur une très faible surface pour augmenter considérablement les surfaces d'interaction offertes par les dispositifs. Le protocole de fabrication mis en place nous permet de produire ces dispositifs avec une très bonne reproductibilité et un très bon contrôle dimensionnel.

Toutefois, malgré les résolutions qu'elle permet d'atteindre, l'utilisation de la lithographie électronique reste une technique de fabrication lourde, lente et coûteuse. Aussi, une large partie de mes travaux de thèse ont été consacrés dans un premier temps au développement d'une technique de Nanoimpression, capable de reproduire par moulage les nanoélectrodes fabriquées par lithographie électronique. Les propriétés de moulage, de conformation, de réticulation du PDMS font de ce matériau un candidat potentiellement intéressant pour la Nanoimpression. Nous avons pu démontrer qu'il était possible d'utiliser le PDMS pour reproduire de façon très reproductible des micro-structures et de procéder à leur transfert par lift-off ou gravure. Toutefois, il ne m'a pas été possible de reproduire des nanostructures telles que des nanoélectrodes en raison des propriétés mécaniques insuffisantes du PDMS. Même si l'objectif de ces recherches n'a pu être atteint, ces premiers travaux ont permis d'identifier l'utilisation des matériaux polymères fluides réticulables comme une voie particulièrement prometteuse dans le domaine de la Nanoimpression. Cette voie est toujours en développement au laboratoire et a montré depuis peu que ces matériaux permettent de reproduire et de transférer des structures nanométriques. L'étude de la réplique des dispositifs à base de nanoélectrodes est actuellement en cours.

Le choix de l'utilisation de nanoparticules pour la biodétection n'a pas été introduit dès nos premières expériences. Comme nous l'avons décrit en introduction, notre première idée était basée sur l'utilisation directe des propriétés de conduction des biomolécules pour leur détection électrique. J'ai consacré une large partie de ma deuxième année de thèse à cet objectif en étudiant en particulier les propriétés de conduction de l'ADN. Dans nos conditions opératoires (dépôt direct d'ADN sur la surface des élec-

trodes et séchages), il ne nous a pas été possible de démontrer un caractère conducteur pour ces molécules. Ces résultats ont été confirmés par le bilan d'un projet Européen paru quelques mois après nos premières expériences. Notre projet de recherche s'est donc orienté vers une solution de marquage permettant de modifier les propriétés conductrices associées aux biomolécules.

Pour cela, nous avons démontré la compatibilité de ces dispositifs avec un procédé de détection de nanoparticules métalliques. En réalisant des dispositifs planaires à base de nanoélectrodes présentant des espaces inter-électrodes du même ordre de grandeur que le diamètre des nanoparticules, nous disposons d'un procédé de détection de très haute sensibilité capables de détecter des nanoparticules individuellement. Ces dispositifs semblent parfaitement compatibles avec les procédés de greffage et les traitements de surface utilisés et permettent également de réaliser des opérations de détection directement en solution.

Enfin, nous avons vu qu'il est possible de transposer un tel schéma de détection à la détection d'anticorps. En utilisant un schéma conventionnel basé sur l'interaction entre une molécule sonde immobilisée sur une surface puis une interaction avec une molécule cible fonctionnalisée, il nous est possible de traduire la présence des molécules cible au travers d'un dépôt de nanoparticules et de façon consécutive en une variation importante de la conductivité des dispositifs.

L'approche que nous avons développée laisse présager des applications très prometteuses dans le domaine de la biodétection. Des travaux complémentaires sont actuellement en cours en particulier en ce qui concerne la réalisation de mesures quantitatives qui est liée de façon directe à la compréhension des phénomènes de transport au niveau des jonctions entre les nanoparticules et les électrodes. De nombreuses améliorations sont envisageables pour la biodétection. Tout d'abord, nous avons vu qu'une réduction de la taille des nanoparticules et donc des espaces inter-électrodes pourrait permettre d'obtenir un procédé de détection d'anticorps de sensibilité ultime permettant des mesures quantitatives très précises. Ces travaux devront s'accompagner d'une amélioration des procédés d'immobilisations, en particulier des anticorps sondes sur la surface des dispositifs. Enfin, le schéma de détection que nous avons mis au point n'est pas limité à la seule détection des anticorps. En effet, le principe de l'interaction sonde-cible sur une surface est compatible avec une large variété de biomolécules (ADN, ARN, protéines, peptides, ...) et des travaux futurs seront dédiés à démontrer la polyvalence de notre approche.

Outre les développements spécifiques aux applications de biodétection, les différentes études que nous avons menées autour des nanoélectrodes, du greffage de nanoparticules, des procédés d'interaction entre biomolécules, nous ont permis, parfois de façon très opportune, de mettre en évidence certains phénomènes particulièrement intéressants. Par exemple, nous avons découvert l'influence de la topologie de la surface sur un dépôt de nanoparticules. Cet effet est très reproductible et ne semble pas lié aux fonctionnalisations des surfaces des dispositifs et des particules elles-mêmes. Ce phénomène est capital dans notre schéma de détection car il est la base de la modification de conductivité des dispositifs. Cet effet est également particulièrement intéressant car il montre qu'il est possible de contrôler ou plutôt de guider de façon très simple l'organisation d'un dépôt de nanoparticules. Les perspectives dans le domaine de l'auto-assemblage, de la construction d'édifices à base de nano-objets sont intéressantes.

A l'échelle du laboratoire, ce projet constitue la première démonstration concernant l'utilisation de nanodispositifs pour une application de biodétection. Ces travaux ont pu démontrer la pertinence du couplage des nanotechnologies et des biotechnologies. Le principe de la détection paraît quant à lui très avantageux : il permet une lecture directe et simple des dispositifs et semble parfaitement compatible avec une intégration dans un dispositif de type biopuce.

L'ensemble des mesures qui sont reportées dans ce manuscrit ont été réalisées à partir d'un même système de mesure composé d'un testeur sous pointe permettant la connexion des dispositifs avec un appareil de mesure électrique permettant de suivre les caractéristiques I-V des dispositifs.

Testeur sous pointes

L'équipement que nous avons utilisé pour réaliser les contacts électriques est un testeur sous pointe Cascade (Microtech). Cet appareil dispose d'une plate forme motorisée sur laquelle est déposé l'échantillon. L'ensemble est placé dans une enceinte fermée servant de cage de Faraday. Des pointes de tests sont introduites dans la chambre et permettent de connecter chaque plot de contact de l'échantillon à l'appareil de mesure. Cet équipement nous permet donc d'éviter toute étape de montage des échantillons sur un boîtier et ainsi toute étape de soudure. Un microscope permet de positionner les pointes sur les zones de contact. Dans notre cas ce microscope nous a également été utile durant les séries de mesures réalisées en solution pour contrôler de façon régulière le niveau de remplissage et l'étanchéité des micro-cuves en PDMS. Une photo globale de l'équipement est donnée dans la figure 20.

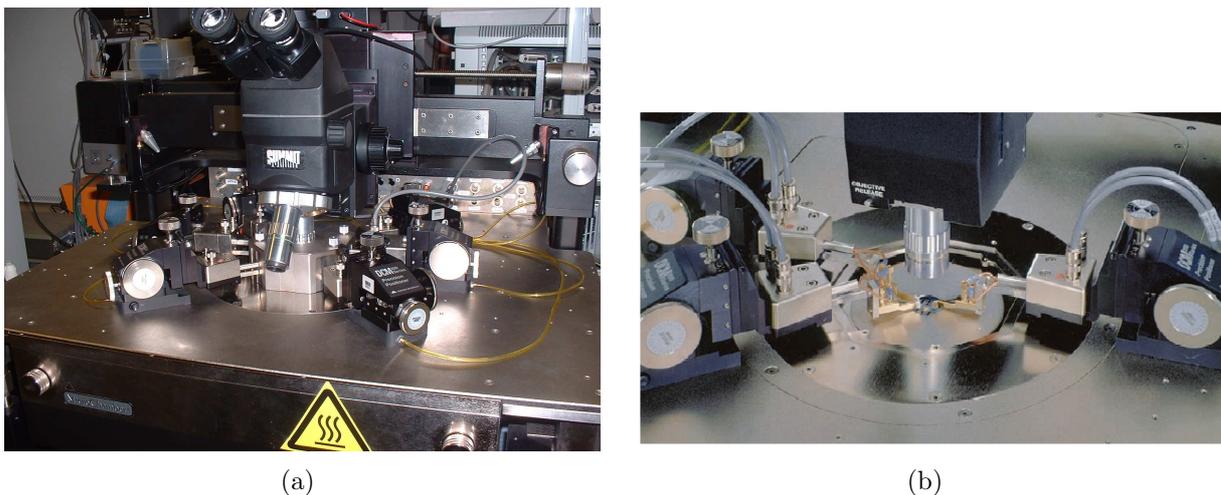


FIG. 20 – (a) Vue générale du testeur sous pointe CASCADE (Société Microtech) utilisé pour la réalisation des contacts électriques avec les dispositifs. (b) Vue détaillée des pointes de contact

Le principal avantage de cet équipement repose tout d'abord sur le blindage de la chambre de mesure qui permet de limiter considérablement les bruits de mesures. Par ailleurs, la chambre est balayée en permanence par un flux d'azote qui permet également de limiter l'influence des paramètres environnementaux (en particulier l'humidité) sur les nanoélectrodes.

Remarque : Une seule limitation nous est apparue lors de nos expériences en ce qui concerne la réalisation de mesures en solution. En effet, l'architecture de la chambre de mesure et la présence d'une cage de faraday permettant d'isoler les pointes de contact limitent considérablement l'accès à l'échantillon une fois que celui-ci a été chargé et que les pointes ont été connectées. Il nous a donc été impossible de réaliser les remplissages des micro-cuves en PDMS durant la mesure. Les dispositifs ont été préparés avant la

connexion des pointes de contact, introduits dans le testeur puis caractérisés électriquement. Aussi, nous n'avons pu débiter les mesures électriques que 2 à 3 minutes après leur remplissage.

Système de mesure

Les niveaux de courant observés lors de nos mesure sont généralement compris entre quelques centaines de fA et quelques dizaines de nA . Ces mesures "à bas niveaux" requièrent donc un équipement et surtout un montage électrique adapté[162].

L'appareil de caractérisation électrique utilisé est le modèle 4200 Keithley. Ce système est composé d'une unité de mesure et de deux pré-amplificateurs placés près des pointes de mesures.



FIG. 21 – *Equipement de caractérisation utilisé pour les mesures électriques (Modèle 4200 Keithley)*

Cet appareil est particulièrement bien adapté aux mesures bas niveaux. Les données constructeurs garantissent en particulier un niveau de sensibilité de l'ordre de quelques fA pour des calibres de mesures compris entre $1pA$ et $1nA$ avec une erreur inférieure à 0.1% . Les mesures ont été effectuées en utilisant deux voies de l'appareil de mesure (une voie pour le signal et une voie pour le commun). Chaque voie est reliée à une pointe de mesure par l'intermédiaire de deux câbles "force" et "sense". Ainsi seules deux pointes ont été utilisées pour caractériser chaque dispositif.

De nombreuses précautions ont été prises conformément aux recommandations du constructeur [162, 163] de façon à limiter les sources d'erreurs de mesures et de bruits. Tout d'abord, toutes les connexions ont été réalisées en utilisant des câbles triaxiaux. Par ailleurs, des câbles de faibles longueurs ont été employés pour relier les pointes de tests aux pré-amplificateur de façon à limiter au maximum l'amplification de bruits lors de la mesure. Enfin, le châssis du testeur ainsi que les différents blindages ont été reliés en un même point du châssis de l'appareil de mesure pour éviter tout phénomène de bouclage de masse. Ainsi, le niveau de bruit observé à température ambiante sur des

échantillons connectés (électrodes seules) est compris typiquement entre 10 et 20 fA.

Remarque : Une attention toute particulière a été consacrée à la protection des échantillons contre les décharges électrostatiques (utilisation d'un bracelet et d'un tapis antistatiques). Les échantillons sont très sensibles à ces phénomènes qui conduisent immédiatement à leur destruction.

Annexe A

Réalisation de mesures électriques en solution

A.1 Principe des mesures

Deux approches "similaires" ont été mises au point pour permettre la réalisation de mesures électriques en solution en particulier durant l'étape d'incubation des solutions de nanoparticules métalliques sur les nanoélectrodes. Ces deux approches sont basées sur l'utilisation de dispositifs simples de microfluidique permettant de confiner un faible volume de solution sur les dispositifs. Cette approche est beaucoup plus satisfaisante que le dépôt direct de solution sur l'échantillon car elle permet de limiter les phénomènes d'évaporation et ainsi de conserver les concentrations des solutions constantes. Pour effectuer ces mesures, nous avons donc mis au point la fabrication de micro-cuves qui, déposées sur la surface des échantillons, permettent de confiner un volume de solution d'environ $1\mu L$ sur les électrodes et également d'isoler les contacts électriques.

La fabrication des structures s'est appuyée sur les très nombreux travaux publiés dans le domaine de la microfluidique et en particulier sur les protocoles de fabrication de dispositifs basés sur le moulage de polymère. De façon générale, les matériaux polymères sont particulièrement bien adaptés aux applications de microfluidiques car ils permettent de fabriquer par moulage des structures permettant la manipulation de fluides (canaux, chambres de réactions, ...) et ce de façon simple, rapide et à faible coût. De nombreux polymères ont d'ores et déjà été étudiés pour dans le cadre de ces applications (Polycarbonate, le PMMA, le polystyrène, PETG ...) [164]. Parmi eux, les matériaux élastomères sont particulièrement intéressants car ils offrent généralement de très bonnes propriétés de contact et de conformation sur les surfaces sur lesquelles ils sont déposés. Pour la réalisation de ces structures, nous avons utilisé un matériau élastomère désormais bien connu : le PDMS (PolyDiméthylSiloxane). Nous avons en particulier mis en oeuvre une formulation commerciale proposée par la Société Dow Corning sous la référence Sylgard 184.

L'utilisation du PDMS pour des applications de microfluidique a été très largement étudiée et documentée [106, 164]. En plus de ses propriétés physico-chimiques (transparence (UV-visible), stabilité chimique et thermique, bio-compatibilité, ...) la mise en forme du PDMS est particulièrement simple à mettre en oeuvre et ses très bonnes propriétés de moulage [165] et de conformation en font un matériau particulièrement adapté pour ces applications [164]. Comme nous le verrons dans l'annexe D.3 ces mêmes propriétés de moulage peuvent également être exploitées pour une technique de lithographie alternative, la NanoImpression qui repose elle aussi sur le transfert de structures par moulage.

A.2 Réalisation des microréacteurs PDMS

Le protocole de fabrication des micro-cuves en PDMS est reporté dans la figure A.2. Dans un premier temps, deux moules en acier inoxydables ont été fabriqués par électro-usinage. Ces moules permettent de définir une structure rectangulaire creuse dont les dimensions extérieures sont d'environ $3 \times 3 \times 3 \text{mm}^3$. Le diamètre et la hauteur de la cavité sont tous deux de 1mm correspondant à un volume d'environ $1\mu L$.

Le PDMS est introduit entre les deux moules et réticulé pendant 1 heure à 100°C . Le démoulage est effectué directement après la réticulation et ne nécessite pas de traitement préalable des surfaces des moules. Le contrôle de l'espace séparant les deux moules

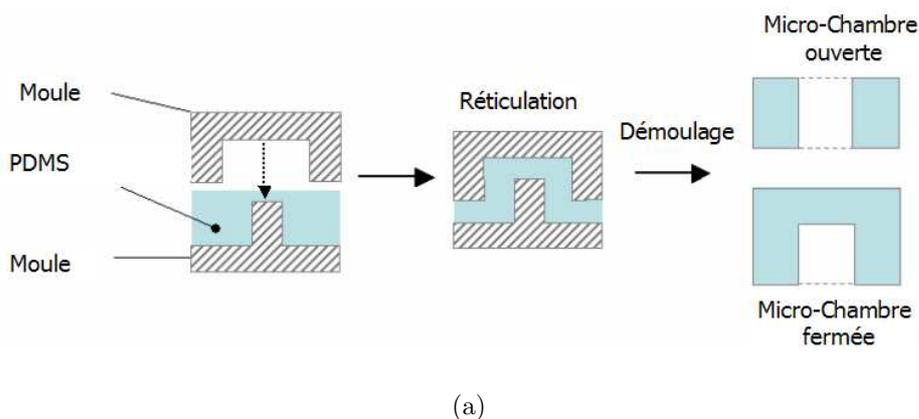


FIG. A.1 – Schéma illustrant la procédure de moulage des microchambres en PDMS.

nous permet soit de définir des cavités fermées ou bien des cavités ouvertes. Les micro-chambres sont ensuite déposées et alignées sur les échantillons de silicium de 4mmx4mm. Deux protocoles ont été utilisés lors du report des micro-chambres.

A.2.1 Report et alignement des microréacteurs sur les dispositifs électriques

A.2.1.1 Greffage réversible

Un premier report que nous qualifierons de réversible à tout d'abord été réalisé en exploitant directement les très bonnes propriétés de conformation du PDMS. Cette méthode simple et rapide permet de créer un contact étanche entre le PDMS et le substrat. Elle paraît bien adaptée à des applications nécessitant un démontage rapide des dispositifs pour observation de la surface ou encore pour procéder à des étapes de lavage [166]. Cette procédure est particulièrement utile dans le cas de nos premières expériences de mise au point pour lesquelles un contrôle régulier des états de surface et également une évaluation des densités de nanoparticules immobilisées par observation MEB a été nécessaire.

Dans ce cas de figure, nous avons utilisé des micro-chambres ouvertes pour lesquelles le remplissage a été effectué en utilisant une micropipette. La cavité a ensuite été fermée en utilisant une lame de verre découpée aux dimensions de la micro-chambre et déposée sur la cavité (Cf Figure A.2(a)).

Toutefois, bien que cette première méthode de montage soit particulièrement simple et directe, celle-ci reste limitée en particulier pour des applications requérant de nombreuses étapes de lavage car elle nécessite un démontage systématique des microchambres. Nous n'avons utilisé cette méthode que pour les étapes d'incubation des solutions colloïdales en particulier pour les solutions de nanoparticules fonctionnalisées par des groupes anti-biotine. Cette approche nous a permis de limiter la consommation de solution en limitant très avantageusement les volumes nécessaires.

D'un point de vue plus général, le report de dispositifs de microfluidique en utilisant les propriétés de conformation du PDMS reste également limitée dans le cas d'applications où les pressions des fluides transportés est trop élevée [167]. Typiquement, si

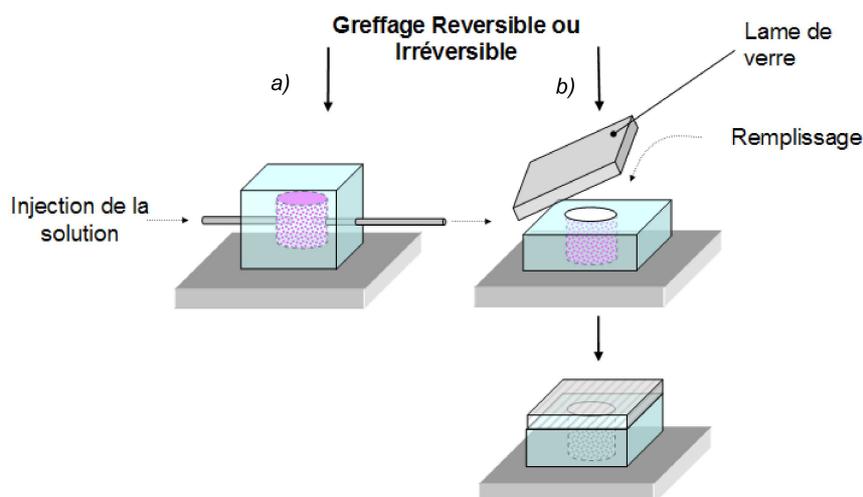


FIG. A.2 – Schéma illustrant les deux procédures de remplissage utilisées lors de nos expériences. (a) Dans le cas de micro-chambres fermées, le remplissage est effectué en utilisant deux capillaires introduits au travers des parois dans la cavité. Un des capillaires est connecté à une micropipette qui permet l'injection successive de solutions. Le deuxième capillaire permet l'évacuation des solutions. (b) Dans le cas de micro-chambres ouvertes, le remplissage est effectué directement en utilisant une micropipette.

aucune force extérieure de maintien n'est exercée sur les dispositifs, les pressions maximales utilisables ne peuvent dépasser une valeur critique d'environ 5psi¹.

A.2.1.2 Greffage irréversible

Dans le cas d'applications nécessitant des pressions plus élevées (jusqu'à 30 à 50 psi), un greffage irréversible du PDMS sur la surface est envisageable. Celui-ci peut être facilement obtenu en effectuant un traitement simultané par plasma O_2 des surfaces du PDMS [168] et du substrat sur lequel seront reportés les structures [167, 164, 169, 170]. Ces traitements de surfaces permettent de créer des liaisons covalentes entre le PDMS et des substrats de nature très variées (Si, SiO_2 , verre, quartz, nitrure de silicium, etc.). Dans notre cas, nous avons utilisé un traitement plasma O_2 dont la durée est comprise entre 20 et 30 s pour des puissances de l'ordre de 400W (Equipement LFE). Immédiatement après le traitement une goutte d'éthanol est déposée sur le substrat de silicium avant le report des micro-chambres en PDMS [171]. Cette procédure permet d'éviter un greffage instantané du PDMS sur le substrat et facilite l'alignement du dispositif sur les électrodes (cette opération a été menée sous microscope optique). Le greffage est achevé en plaçant le dispositif dans une étuve à $60^\circ C$ pendant 12 heures. À l'issue de ce traitement, le démontage des micro-chambres est impossible sans occasionner une rupture des structures en PDMS.

Dans la plupart des expériences utilisant ce protocole, nous avons préféré utiliser des micro-chambres fermées. Une fois reportées sur la surface leur remplissage a été effectué

¹1 psi = 0,068 94 bar

en utilisant deux capillaires métalliques introduits de part et d'autre de la cavité au travers des parois . Un des capillaires est ensuite relié à une micropipette. Ce montage permet un remplissage simple de la cavité et autorise des protocoles plus complexes intégrant plusieurs étapes d'incubation et de greffage.

Cette méthode a été mise au point dans l'objectif principal de démontrer la compatibilité des dispositifs et du protocole de détection avec une intégration dans un dispositif plus complexe de type laboratoires sur puce. En particulier, nous avons démontré la possibilité de réaliser un protocole complet de détection immunologique par cette voie (immobilisation d'un anticorps sonde, incubation d'un anticorps cible, incubation de la solution de nanoparticules fonctionnalisées par des molécules d'anti-biotine et lavages). Cette approche est particulièrement intéressante pour des applications dans le domaine de la protéomique [172] car elle permet de limiter considérablement les volumes réactionnels et confirme la possibilité d'intégration de dispositifs complets de traitement et de détection. Cette méthode a également été utilisée avec succès au laboratoire pour des applications de détection en solution avec des dispositifs de type ISFET [173].

Annexe B

Le modèle DLVO

Le modèle DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) a été développé dans le but de décrire les interactions de courte portée existantes entre des surfaces placées en solution. Son principe repose sur la prise en compte des forces électrostatiques liées aux phénomènes d'apparition de charges sur les surfaces ainsi que des forces de Van der Waals. Ce modèle est particulièrement bien adapté à la description de solution colloïdales telles que les solutions de nanoparticules que nous avons utilisées dans nos expériences[129]

B.1 Interactions électrostatiques

En solution, plusieurs phénomènes peuvent être à l'origine de l'apparition de charges sur une surface. Outre la polarisation électrique de la surface comme dans le cas d'une électrode, ce phénomène peut résulter de mécanismes d'ionisation ou de dissociation de groupes fonctionnels présents à la surface (ex : groupes acides carboxyliques $\text{COOH} \rightarrow \text{COO}^- + \text{H}^+$) ou encore d'adsorption d'espèces ioniques constituant l'électrolyte.

Quelque soit le mécanisme qui conduit à son apparition, cette charge de surface est systématiquement compensée par une modification de la répartition des espèces ioniques (des contre-ions) en solution résultant en une zone de charge opposée située à proximité de la surface. Cette répartition des charges peut être décrite au travers du modèle de Stern. La figure B.1 donne une description schématique de la répartition de ions à proximité de la surface.

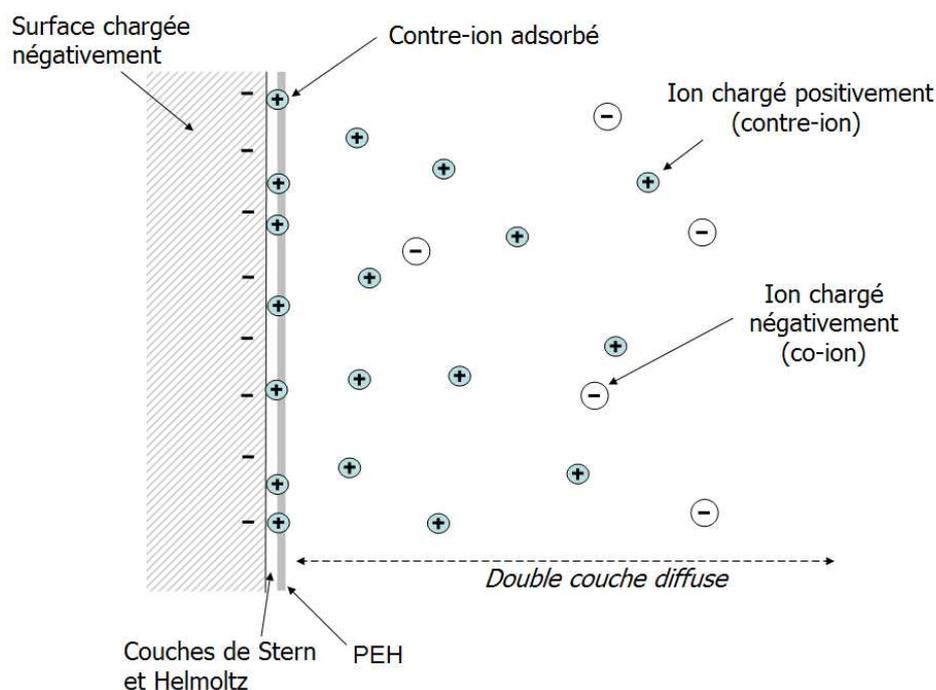


FIG. B.1 – Illustration de la distribution spatiale des espèces ioniques à proximité d'une surface chargée en solution. Le plan externe d'Helmholtz délimite les couches de Stern et Helmholtz de la double couche diffuse.

Près de la surface, les contre-ions sont majoritaires et permettent de contre-balancer

la charge de surface. Certains d'entre eux sont adsorbés temporairement tandis qu'en solution, d'autres ions tendent à se ressembler sous l'influence de la charge de surface pour former une atmosphère ionique appelée double couche électrique diffuse. Ces deux régions sont délimitées par un plan appelé plan externe d'Helmoltz (PEH). La région comprise entre la surface et le plan externe d'Helmoltz regroupe les couches dites de stern et d'Helmoltz. Au delà du plan d'Helmoltz, les ions évoluent en solution et leur distribution est modifiée par la charge de surface.

Evolution de la concentration des espèces en solution

Le potentiel chimique μ_i d'une espèce ionique i présente en solution peut s'exprimer sous la forme :

$$\mu_i = z_i e \psi + k_B T \log(C_i) \quad (\text{B.1})$$

où z_i et C_i représentent respectivement la charge et la concentration (en nombre d'ions par m^3 de solution) d'une espèce ionique i , ψ le potentiel électrostatique et e la charge de l'électron.

La distribution des contre-ions en solution peut être décrite par une distribution de Boltzmann. A une distance x de la surface, nous pouvons exprimer la concentration $C_{x,i}$ d'une espèce ionique i présente en solution par la relation :

$$C_{x,i} = C_{\infty,i} e^{-z_i e \psi / k_B T} \quad (\text{B.2})$$

où $C_{\infty,i}$ (en nombre d'ions par m^3 de solution) représente la concentration en espèce i à une distance infinie de la surface.

La figure B.2 nous donne un exemple d'évolution des concentrations des espèces ioniques obtenue dans le cas d'un électrolyte symétrique (ions ayant des charges de même valeur absolue) composé seulement de deux espèces ioniques.

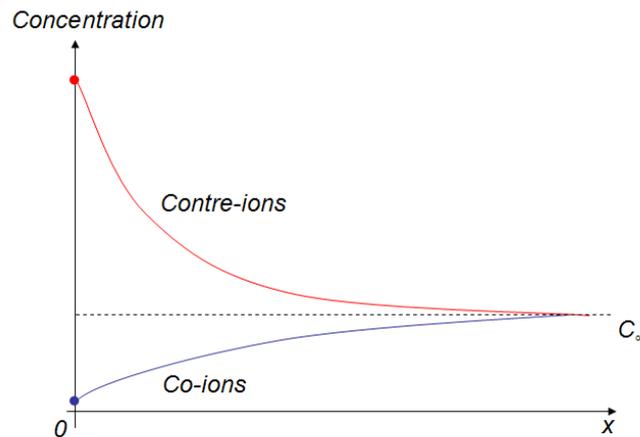


FIG. B.2 – Exemples de courbes décrivant l'évolution des concentrations des espèces ioniques en solution en fonction de la distance x dans le cas d'un électrolyte symétrique [129]. Les concentrations des contre-ions et des co-ions suivent une distribution de Boltzmann et évoluent vers une valeur limite C_∞ lorsque $x \rightarrow \infty$

Nous voyons que la concentration des contre-ions, majoritaires à proximité de la surface, décroît exponentiellement pour atteindre une valeur limite C_∞ pour laquelle l'influence de la charge de surface devient négligeable. Au contraire, la concentration de co-ions augmente pour atteindre elle aussi une valeur limite C_∞ , qui dans le cas de l'électrolyte symétrique que nous avons considéré, correspond également à la concentration des contre-ions.

L'utilisation de l'équation de Poisson nous permet d'exprimer la densité de charge en fonction de la distance x de la surface :

$$z_i e \rho(x) = -\varepsilon \varepsilon_0 \left(\frac{d^2 \psi}{dx^2} \right) \quad (\text{B.3})$$

où $\rho(x)$ désigne la densité de charge en x , ψ le potentiel électrostatique et ε la permittivité relative de la solution.

Cette densité de charge s'exprime également à partir des concentrations des différentes espèces en solution (Cf. Equation B.2) :

$$\rho(x) = \sum_i z_i e C_i = \sum_i z_i e C_{\infty, i} e^{-z_i e \psi / k_B T} \quad (\text{B.4})$$

La combinaison des équations B.3 et B.4 nous permet d'écrire l'équation de Poisson-Boltzmann :

$$\frac{d^2 \psi}{dx^2} = -\frac{z e \rho}{\varepsilon \varepsilon_0} = -\left(\frac{z e \rho_\infty}{\varepsilon \varepsilon_0} \right) e^{-z e \psi / k_B T} \quad (\text{B.5})$$

Equation de Grahame

Nous pouvons donner une expression de la charge de surface σ à partir des conditions aux limites $(d\psi/dx)_{x \rightarrow \infty} = 0$ (champ électrostatique nul pour $x \rightarrow \infty$) et d'électroneutralité $\sigma = -\int_0^\infty z_i e C_{x,i} dx$:

$$\left(\frac{d\psi}{dx} \right)_0 = \sigma / \varepsilon \varepsilon_0 \quad (\text{B.6})$$

La combinaison de la relation B.6 et B.5 nous permet de définir l'équation dite de Grahame :

$$\sum_i \rho_{0i} = \sum_i \rho_{\infty i} + \frac{\sigma^2}{2 \varepsilon \varepsilon_0 k_B T} \quad (\text{B.7})$$

Longueur de Debye

Si nous considérons le cas de surfaces faiblement chargées (potentiel inférieur à 25mV), l'équation de Grahame se simplifie suivant l'expression :

$$\sigma = \varepsilon \varepsilon_0 \kappa \psi_0 \quad (\text{B.8})$$

avec

$$\kappa = \left(\frac{\sum_i \rho_{\infty i} e^2 z_i^2}{\varepsilon \varepsilon_0 k_B T} \right)^{1/2} \quad (\text{B.9})$$

Nous voyons dans ce cas que le potentiel devient proportionnel à la charge de surface. Nous pouvons constater également que l'équation B.8 est similaire à l'expression de la charge dans un condensateur plan dont les deux armatures seraient séparées par une distance $1/\kappa$ de charges $\pm\sigma$. Cette analogie avec un condensateur plan est à l'origine de terme de double couche électrique qui décrit la répartition des espèces ioniques entre deux surfaces chargées. Cette distribution a pour longueur caractéristique la longueur de Debye $1/\kappa$ qui définit la région dans laquelle la distribution des espèces ioniques peut être décrite par le modèle de la double couche.

Cette grandeur $1/\kappa$ est indépendante de la nature des surfaces et ne dépend que des propriétés de la solution et pas de la charge des surfaces. Plus la force ionique de la solution est élevée plus la longueur de Debye sera faible correspondant à des interactions électrostatiques de plus courte portée.

Evolution du potentiel électrostatique loin de la surface

Pour de faibles valeurs de potentiels, la théorie de Gouy-Chapman [129] nous permet de donner une expression approchée du potentiel d'interaction électrostatique connue sous le nom d'équation de Debye-Huckel :

$$\psi(x) \approx \psi_0 e^{-\kappa x} \quad (\text{B.10})$$

Nous voyons que la longueur de Debye permet de caractériser la décroissance exponentielle du potentiel dans la double couche diffuse.

Pour des valeurs de x supérieures à cette longueur $1/\kappa$, le terme kT devient prédominant dans l'expression. L'agitation thermique est alors le facteur prédominant dans la répartition des espèces ioniques et masque l'influence de la charge de surface sur la distributions des ions en solution. Cet effet est particulièrement présent dans le cas de solutions de forces ioniques élevées c'est à dire de faibles longueurs de Debye.

Il nous est possible de donner un profil de l'évolution du potentiel $\psi(x)$ en solution dans le cas d'une surface chargée négativement (Cf. FigureB.3).

Nous retrouvons sur ce graphe la zone de décroissance exponentielle du potentiel correspondant à la double couche diffuse. Les variations du potentiel au sein des couches de Stern et Helmholtz sont affectées par la présence des contre-ions adsorbés sur la surface qui engendrent une augmentation du potentiel jusqu'au plan externe d'Helmholtz.

Potentiel d'interaction électrostatique

A partir de l'expression du potentiel chimique, il est possible de donner une expression de la force de répulsion qualifiée de pression de répulsion P entre les deux surfaces. Celle-ci s'exprime à partir du potentiel chimique μ par la relation :

$$\left(\frac{\partial P}{\partial x}\right)_{x,T} = \rho \left(\frac{\partial \mu}{\partial x}\right)_{x,T} \quad (\text{B.11})$$

Cette relation nous permet de donner une expression de P à partir de laquelle nous pouvons déduire l'expression du potentiel d'interaction électrostatique W_{el} .

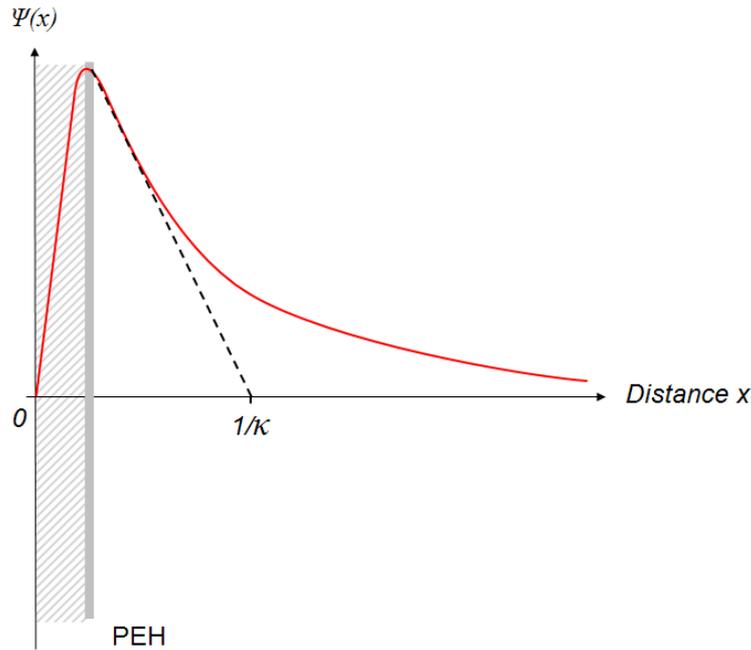


FIG. B.3 – Illustration de l'évolution du potentiel ψ_x électrostatique en fonction de x . Le potentiel présente un maxima au niveau du plan externe d'Helmoltz.

En particulier, dans le cas de deux plans parallèles de dimensions infinies, nous avons :

$$W_{el} = \left(\frac{64k_B T \rho_\infty \gamma_1 \gamma_2}{\kappa} \right) e^{\kappa D} \quad (\text{B.12})$$

où D représente la distance séparant les deux surfaces, $\gamma_i = \tanh(ze\psi_{0,i}/4k_B T)$ s'exprime à partir du potentiel de la surface i considérée. Cette expression a été utilisée dans ce manuscrit en nous servant d'expression de base pour décrire l'interaction entre un élément de surfaces d'une particule et de sa projection sur le substrat. Nous voyons que dans le cas de deux surfaces chargées de même signe, la nature de l'interaction entre les deux surfaces est répulsive. Ce phénomène permet à deux nanoparticules identiques en solution de se repousser et globalement de garantir la stabilité de la solution colloïdale. Dans le cas contraire, comme dans le cas de l'interaction entre les nanoparticules fonctionnalisées par des groupements citrate et un substrat fonctionnalisé par de l'APTMS, l'interaction est attractive et favorise l'immobilisation des nanoparticules.

B.2 Forces de Van der Waals

Les forces de Van der Waals jouent un rôle central dans les phénomènes faisant intervenir des interactions moléculaires. Ces forces sont toujours de nature attractive. Elles sont omniprésentes et bien qu'elles soient généralement de très courte portée, elles peuvent être considérées dans certains systèmes étendus comme des forces à longue distance.

L'interaction de Van der Waals entre deux atomes peut être décrite par un potentiel W_{vdw} s'exprimant sous la forme

$$W_{vdw}(d) = \frac{-C}{d^6}(J) \quad (\text{B.13})$$

où r représente la distance entre les deux entités considérées et C une constante.

Dans le cas de corps massifs en interaction il est possible d'utiliser cette loi simple et de la généraliser en définissant un paramètre caractéristique A appelé constante de Hamaker qui peut s'exprimer à partir de la constante C par la relation :

$$A = \pi^2 C \rho_1 \rho_2 (J) \quad (\text{B.14})$$

où ρ_1 et ρ_2 sont les densités respectives des deux molécules considérées.

Il est ensuite possible d'appliquer cette relation pour déterminer l'énergie d'interaction entre deux surfaces en tenant compte de leur géométrie [129]. Par exemple, dans le cas de deux plans parallèles de dimensions infinies, un calcul par intégration nous permet de donner une expression simple du potentiel d'interaction par unité de surface :

$$W_{vdw} = -\frac{A}{12\pi D^2} \quad (\text{B.15})$$

où D représente la distance séparant les deux plans.

Il est également possible de donner une expression simple de ce potentiel d'interaction par unité de surface W_{vdw} pour des géométries simples de corps en interaction telles que sphère-plan, cylindre-plan, sphère-sphère, etc [129].

Les valeurs du paramètre A sont comprises entre 0.4 et 50.10^{-9} J. Elles dépendent essentiellement de la nature des matériaux en interaction, de la nature du milieu les séparant.

B.3 Le modèle DLVO

Le modèle DLVO est né des contributions de Derjaguin et Landau en 1941 [127] qui ont été complétées par Verwey et Overbeek en 1948 [128]. Ce modèle permet de décrire les interactions entre deux surfaces placées en solution en prenant en compte simultanément de l'influence des forces électrostatiques et des forces de Van der Waals. Dans ce paragraphe nous nous proposons de discuter de façon qualitative l'évolution du potentiel en fonction de la charge de surface et de la force ionique de la solution [129] et de son influence sur le comportement d'une solution colloïdale telle que celle que nous avons utilisée.

À la différence des forces électrostatiques, les forces de Van der Waals sont, comme nous l'avons vu, très peu sensibles aux variations de concentrations des espèces dans l'électrolyte et seront donc considérées comme fixes en première approximation. La figure B.4 montre un exemple typique de variation du potentiel d'interaction entre deux surfaces soumises à la combinaison de ces deux forces.

Dans cet exemple, nous voyons que pour de faibles distances, les forces de Van der Waals dont le potentiel d'interaction résultant varie en $1/x^6$ restent prédominantes.

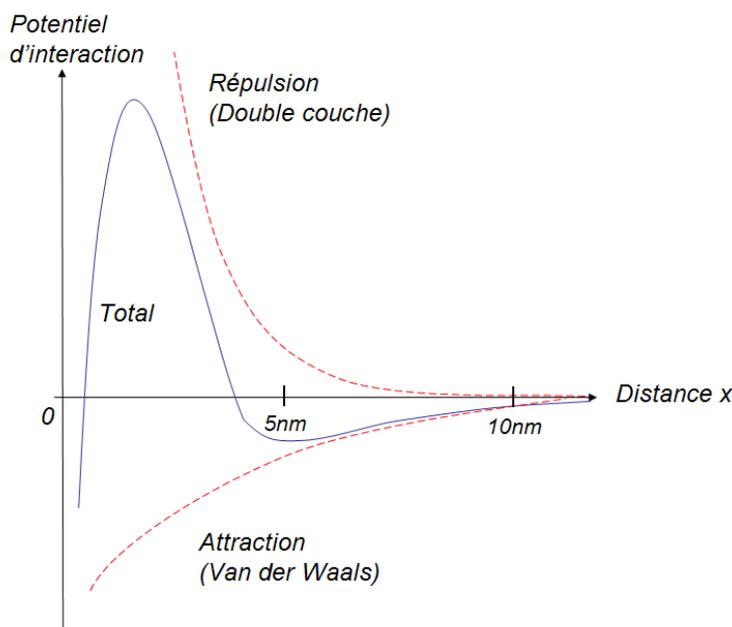


FIG. B.4 – *Illustration de la variation du potentiel d'interaction entre deux surfaces chargées de même signe en solution. Le modèle utilisé est basé sur la prise en compte des forces électrostatiques et des forces de Van der Waals. [129]*

Leur influence se traduit par une forte baisse du potentiel qualifié de minimum primaire. Lorsque l'on augmente la distance entre les deux surfaces, l'influence des forces de répulsion électrostatique augmente et se traduit dans cet exemple par une forte barrière de potentiel pour des valeurs de distances généralement de l'ordre de 5nm. Pour des distances supérieures à la longueur de Debye, les forces de Van der Waals redeviennent prédominantes et se traduisent généralement par l'apparition d'un minimum de potentiel appelé minimum secondaire.

L'exemple que nous venons de choisir nous a permis d'illustrer les variations relatives de l'intensité des forces de Van der Waals et d'interaction électrostatiques. Toutefois, l'influence de chacune de ces forces dépend étroitement des propriétés de la solution ainsi que de la charge de la surface. La figure B.5 illustre l'influence de ces paramètres sur l'évolution du potentiel total d'interaction.

Dans le cas de figure (a), correspondant à une surface très fortement chargée placée dans un électrolyte de faible force ionique, les forces de répulsion électrostatiques restent prédominantes sauf pour de très faibles valeurs de x .

Lorsque la force ionique de la solution augmente, impliquant une diminution de la longueur de Debye, la courbe laisse apparaître un minimum secondaire. Ce cas de figure correspond à celui que nous avons traité précédemment. Dans le cas d'une solution colloïdale, la barrière séparant le minimum secondaire du minimum primaire est généralement trop grande pour que les particules entrent en contact. Ainsi, les particules se trouvent majoritairement dispersées en solution. Certaines particules subissent l'effet d'attraction de ce minimum secondaire et forment des agrégats par un phénomène dit de floculation. Toutefois, le puits de potentiel étant de faible intensité, ce phénomène de floculation reste réversible et permet aux nanoparticules d'être redispersées.

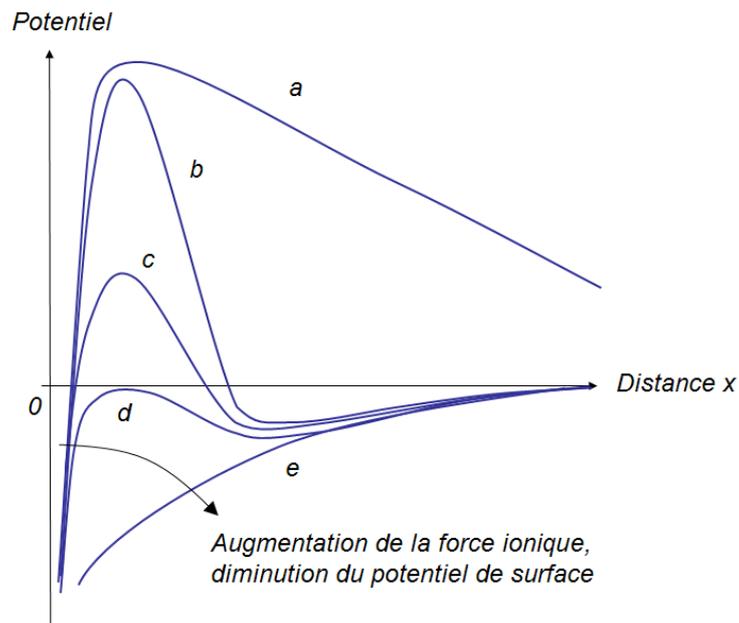


FIG. B.5 – *Illustration de l'influence de la charge de surface et de la force ionique de la solution sur la répartition spatiale du potentiel électrostatique [129].*

Si la charge de surface décroît encore ou que la force ionique de la solution augmente encore, nous voyons que la hauteur de la barrière de potentiel diminue progressivement (courbe c et d).

Dans un cas extrême (courbe d), cette barrière disparaît. Les interactions de Van der Waals prédominent et engendrent une agrégation rapide et irréversible des particules.

Ainsi, nous voyons au travers de ces différents exemples que le contrôle de la force ionique de la solution ainsi que le potentiel des surfaces sont deux paramètres critiques dans la mise en oeuvre de solutions de nanoparticules et dans leur immobilisation sur un substrat chargé.

Annexe C

Modèle de Fowler Nordheim

Notre analyse des phénomènes de transport électrique entre les nanoparticules et nanoélectrodes s'est appuyée sur une description du contact par une jonction tunnel de type métal-isolant-métal (MIM). En utilisant ce modèle, il nous est possible d'exprimer la densité de courant J traversant une telle jonction polarisée sous une tension V en utilisant le modèle de Stratton [137] :

$$J(V, T) = \frac{4\pi m^* q}{h^3} \cdot \frac{e^{-b_1}}{c_1^2} \cdot \frac{\pi c_1 k_B T}{\sin(\pi c_1 k_B T)} \cdot (1 - \exp(-c_1 V)) \quad (\text{C.1})$$

où q représente la charge d'un électron, m^* la masse effective d'un électron dans l'isolant. Les coefficients c_1 et b_1 sont définis par rapport aux caractéristiques de la jonction (hauteur de barrière, épaisseur de la jonction, masse effective de l'électron dans l'isolant) et de la tension de polarisation.

A température ambiante il est possible de donner une expression approchée de cette équation [174, 30]. En particulier, pour des fortes tensions de polarisation V supérieures à Φ_0 la hauteur de barrière de la jonction tunnel considérée, on obtient :

$$J(V) = \frac{q^2}{8\pi h} \cdot \frac{V^2}{s^2 \phi_o} \cdot \exp\left(\frac{-2\alpha^* s \phi_o^{3/2}}{3V}\right) \quad (\text{C.2})$$

avec

$$b_1 = \frac{2\alpha^* s}{3V} \cdot \Phi_0^{3/2} \quad \text{et} \quad c_1 = \frac{\alpha^* s}{V} \cdot \Phi_0^{1/2}$$

et

$$\alpha^* = \alpha \frac{m^*}{m_0} \quad \text{et} \quad \alpha = \frac{2(2m_0 q)^{1/2}}{\hbar} = 10.25 \quad (eV^{-1/2} \cdot nm^{-1})$$

Dans ces expressions, s représente la largeur de la barrière tunnel considérée et m^* la masse effective de l'électron dans l'isolant. Dans nos calculs, nous avons utilisé $m^* = 0.4$ [30].

Cette équation nous montre que pour des fortes polarisations, le terme $\ln(J/V^2)$ dépend linéairement de $1/V$. Nous nous trouvons ici dans le cas du régime de Fowler-Nordheim. Ce comportement nous permet donc d'identifier au travers des caractéristiques électriques obtenues lors de nos mesures les propriétés d'une jonction métal-isolant-métal équivalente. En particulier, le tracé de la fonction $\ln(J/V^2)$ en fonction de $1/V$ nous permet de proposer une estimation des termes s et Φ_0 qui sont deux grandeurs caractéristiques de la jonction et dont les valeurs pourront nous permettre de valider la description du transport électrique entre les nanoparticules et les électrodes par ce modèle.

Annexe D

Rappels d'Immunologie

Ce chapitre est destiné à présenter sommairement d'une part le rôle des anticorps dans le système immunitaire chez les espèces animales mais surtout les relations entre la structure de la molécule d'anticorps et sa réactivité.

La fin de cette annexe regroupe un glossaire des termes spécifiques à l'immunologie employés tout au long du manuscrit.

D.1 Rôle des anticorps dans la réponse immunologique

Le système immunitaire, par définition, est un système qui protège un hôte contre les infections. Une réponse "immune" est une réponse de l'hôte pour se défendre lui-même contre un (micro-organisme) pathogène responsable de l'infection qui sera qualifié d'immunogène. Dans l'étude des mécanismes spécifiques de la réponse immunitaire, les anticorps ont été les premières molécules à être caractérisées et impliquées dans la reconnaissance spécifique de l'immunité.

On distingue de l'immunité innée ou naturelle, l'immunité adaptative (ou immunité acquise) qui est induite lorsque l'immunité naturelle échoue dans l'élimination d'un agent infectieux. Cette immunité adaptative est caractérisée par la production d'anticorps spécifiques contre un pathogène. Les anticorps jouent, comme nous allons le voir, un rôle prépondérant dans l'immunité adaptative.

D.1.1 Rôle des Lymphocytes (ou cellules) B

La réponse du système immunitaire se traduit par la production de lymphocytes (appartenant à la famille des leucocytes ou globules blancs). Ces lymphocytes sont dotés de récepteurs qui permettent au système immunitaire de reconnaître tout élément étranger à l'organisme. Ces sites de reconnaissance sont dits spécifiques d'un antigène. La diversité des spécificités est telle que l'on considère qu'il existe toujours des récepteurs lymphocytaires capables de se lier à un antigène donné. L'ensemble de ces lymphocytes constitue le répertoire de récepteurs lymphocytaire d'un individu.

Les molécules qui permettent aux lymphocytes B de reconnaître un antigène sont les immunoglobulines ou Ig. Ces protéines sont fixées à la surface des lymphocytes et possèdent toutes la même spécificité. Lorsqu'un lymphocyte B reconnaît l'antigène qui correspond à son anticorps, il va se diviser en cellules filles. Les cellules filles qui résultent de la division d'un seul lymphocyte B sont appelées des clones. Les cellules filles vont alors se différencier des lymphocytes et sécréter des immunoglobulines particulières : les anticorps. Les anticorps synthétisés seront tous de la même spécificité que les Ig présents à la surface du lymphocyte. Il reconnaîtront donc spécifiquement l'antigène qui est à l'origine de la réponse du système immunitaire.

D.1.2 Le rôle des anticorps

La sécrétion des anticorps est la principale fonction "effectrice" des cellules B dans l'immunité dite adaptative. Cette réponse immune est donc adaptative car les mécanismes qu'elle implique sont liés spécifiquement à un antigène. Elle va conduire à l'éli-

mination du pathogène et dans le même temps va permettre de générer des lymphocytes qui serviront de mémoire lors de prochaines infections.

La molécule d'anticorps a deux fonctions distinctes dans la réponse immune : l'une est de se fixer spécifiquement aux molécules des pathogènes qui ont suscité la réponse immunitaire, l'autre est de recruter d'autres cellules et d'autres molécules qui vont pouvoir détruire le pathogène une fois l'anticorps fixé dessus.

D.2 Structure des anticorps IgG

Les anticorps sont des macromolécules complexes qui appartiennent à la famille des immunoglobulines (Ig) qui est commune à l'ensemble de la famille des vertébrés. Ces protéines sont constituées par un assemblage de quatre chaînes polypeptidiques reliées entre elles par des liaisons (ou ponts) disulfure.

Une description schématisée de la structure d'un anticorps est donné dans la figure D.1.

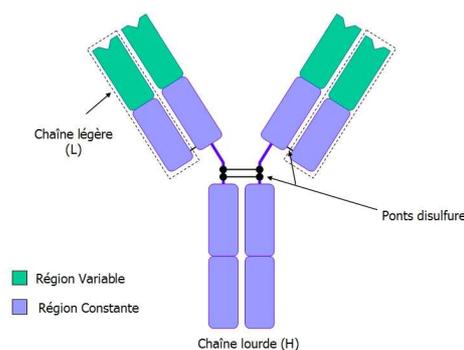


FIG. D.1 – *Structure simplifiée d'un anticorps de type IgG. Cet anticorps présente une structure en Y composée de deux chaînes lourdes (H) liées par deux ponts disulfures sur lesquelles deux chaînes légères (L) sont liées par un pont disulfure. Chaque chaîne H et L présente une région "variable". Les parties variables de H et L s'associent pour former le site de liaison à l'antigène*

La famille des immunoglobulines est caractérisée par une structure composée de deux chaînes dites lourdes (H) et deux chaînes dites légères (L). Ces chaînes sont liées entre elles par des liaisons disulfure et confèrent à l'anticorps une structure en Y. Les deux bras de l'anticorps sont terminés par des régions appelées régions variables qui constituent les sites de liaison à l'antigène ou paratope. La structure reconnue par l'anticorps est appelée épitope ou déterminant antigénique. Cette région est très différente d'un anticorps à l'autre et permet à un individu de pouvoir assurer la reconnaissance de n'importe quelle structure. La variabilité de ces régions permet à chaque anticorps de se fixer à un antigène spécifique différent.

Remarque : il est fréquent de rencontrer dans la littérature des anticorps de type (H+L). Cette dénomination indique que la molécule considérée est un anticorps complet possédant les chaînes H et L (Cf. Notion de fragment)

La "queue" de l'Y quant à elle, détermine les propriétés fonctionnelles de l'anticorps c'est à l'ensemble des mécanismes dits "effecteurs" qui vont conduire à l'élimination de l'antigène après reconnaissance et fixation de l'anticorps. Suivant le type de chaîne lourde qui la constitue, on distingue 5 classes d'Ig. Les cinq classes principales sont IgM, IgA, IgD, IgE, IgG. Les immunoglobulines de classe G sont de loin les immunoglobulines les plus abondantes et nous prendrons l'IgG comme modèle pour notre description générale des Ig. Dans le cas des anticorps, la chaîne lourde est hydrophile ce qui facilite sa sécrétion et sa solubilisation.

D.2.1 Taille des anticorps

Les deux chaînes lourdes ou H présentent une masse d'environ 50kDa et deux chaînes légères ou L de masse 25kDa¹. Le masse moléculaire globale de l'IgG est d'environ 150kDa. En ce qui concerne les dimensions des anticorps en solution, on assimile généralement les anticorps à des disques de 10 à 14 nm de diamètre et de quelques nanomètres d'épaisseur [147]...

D.2.2 Notion de fragment

La répétition des séquences d'acides aminés dans un anticorps permet de distinguer plusieurs régions peptidiques. Chaque chaîne légère est constituée de deux domaines appelés domaines d'immunoglobulines, alors que la chaîne lourde en contient quatre.

La figure D.2 nous donne un aperçu plus précis de la structure d'un anticorps au travers de la représentation de sa structure en ruban (chaque ruban représentant une chaîne peptidique).

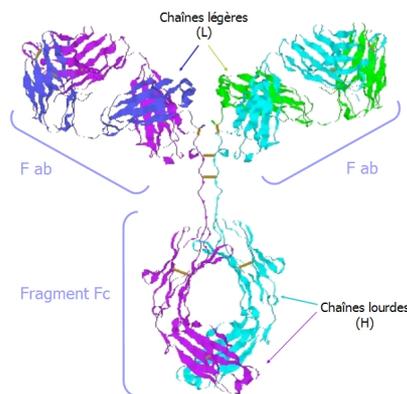


FIG. D.2 – Exemple d'une représentation en ruban d'un anticorps

L'utilisation de certaines enzymes (protéases) permet de cliver un anticorps. Il est possible de cliver un anticorps pour donner trois fragments. Deux fragments identiques conservent les sites de liaison à l'antigène. Ces fragments sont appelés Fab ("Fragment Antigen Binding") et, bien qu'isolés, conservent leur activité vis à vis des antigènes (Cf figure D.3). Le troisième fragment, nommé Fc, est lui incapable de se lier à l'antigène.

¹Dalton : 1 Da = 1,67.10⁻²⁴ g, soit la masse d'un atome d'hydrogène

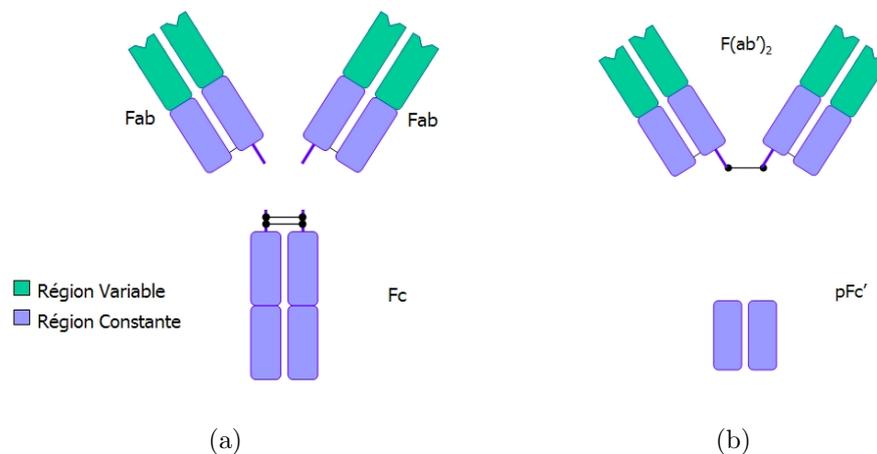


FIG. D.3 – Représentation schématique des notions de fragments *Fab*, *Fc* et *F(ab')*₂ obtenus à partir d'un anticorps après clivage par un enzyme

Comme nous l'avons vu, il est à l'origine des interactions avec les molécules et les cellules effectrices.

Certaines enzymes permettent également de cliver uniquement la partie constante de l'anticorps pour obtenir un fragment et conserver intacte la partie supérieure de l'anticorps. Le fragment généré est appelé $F(ab')_2$.

D.2.3 Anticorps polyclonaux-monoclonaux

Comme nous l'avons dit précédemment, les anticorps sont produits par les lymphocytes B après une étape de différenciation. Chaque lymphocyte porte des récepteurs antigéniques de spécificité unique. Lorsqu'un antigène est reconnu par un lymphocyte, une phase d'activation puis de clonage des lymphocytes a lieu. Celle-ci conduit à une multiplication du lymphocyte initial ou expansion clonale.

Un antigène comporte généralement plusieurs régions appelées épitopes qui vont chacune être reconnue par un lymphocyte. Lors de la réponse adaptative, il y aura donc production de plusieurs clones et donc d'anticorps différents chacun étant spécifique d'un épitope donné mais reconnaissant tous l'élément pathogène initial. Ces anticorps seront qualifiés de polyclonaux. Au contraire, on parlera d'anticorps monoclonaux lorsque ces derniers seront obtenus à partir de la division d'un seul lymphocyte et donc par des clones tous identiques.

D'un point de vue pratique, les anticorps monoclonaux sont moins sensibles que les anticorps polyclonaux vis à vis d'un antigène. En effet, ils ne reconnaissent qu'un seul épitope de celui-ci. Toutefois, ils sont aussi beaucoup plus précis, sélectifs et sont par conséquent largement utilisés dans les expériences de diagnostics.

D.2.4 Anticorps Anti-Immunoglobuline

Il s'agit d'anticorps spécifiques des immunoglobulines elles-mêmes. Ces immunoglobulines sont des éléments immunogènes (qui déclenchent une réponse immunitaire) pour les autres espèces qui synthétisent des anticorps en réponse. La majorité des anticorps

anti-immunoglobulines reconnaissent les régions constantes communes à toutes les molécules d'immunoglobulines d'une espèce animale donnée.

D.2.5 Anticorps primaires / secondaires

On parle en général d'anticorps "secondaire" pour des anticorps dirigés contre un premier anticorps dit "primaire". Ces anticorps peuvent être générés par le système immunitaire d'une espèce animale en réponse à l'introduction d'un premier anticorps provenant d'une espèce différente. Ce premier anticorps a déclenché une réponse immunitaire et constitue donc l'antigène de l'anticorps secondaire généré. Par exemple, un anticorps de type anti-lapin du singe (que nous avons noté IgG(A) dans nos expériences) a été obtenu du système immunitaire du singe en réaction à un anticorps provenant du lapin

D.2.6 La liaison Antigène-Anticorps

La variabilité des séquences aux sein des régions variables n'est pas également répartie sur l'ensemble de la région. Elle se concentre en particulier dans des régions situées à la surface de la molécule plus particulièrement aux sommet de chaque bras de la molécule : c'est le site de liaison antigénique (Cf. figure D.4).

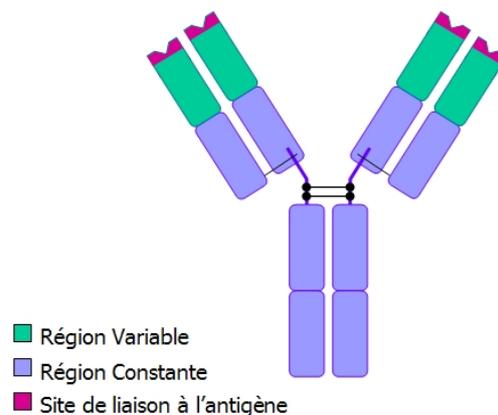


FIG. D.4 – Représentation schématique des sites de liaisons d'un anticorps à un antigène

La fonction biologique des anticorps est de se fixer aux pathogènes et à leurs produits. La structure reconnue par l'anticorps ne représente en général qu'une petite région de la surface de l'antigène et est nommée déterminant antigénique ou épitope. Un déterminant peut être soit conformationnel (ou épitope discontinu) s'il est composé de fragments de chaînes polypeptidiques soit continu (ou linéaire) s'il est composé d'une seule séquence polypeptidique. Dans tous les cas, la liaison antigène-anticorps nécessite une complémentarité structurelle des deux surfaces en interaction. La figure D.5 nous donne trois représentations schématiques de la complémentarité entre sites de liaisons [160].

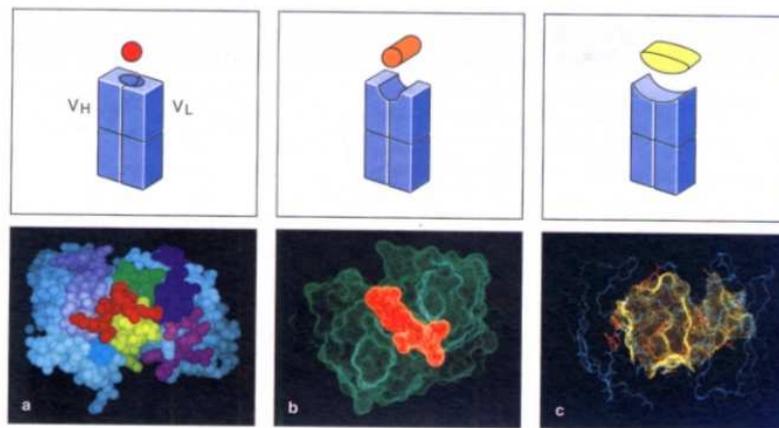


FIG. D.5 – Représentations schématiques de trois exemples d'interaction entre épitope et paratope. Les sites de fixation peuvent être localisés (a) ou bien mettre en jeu une large surface de la partie variable de l'anticorps (b), (c).

La réaction permettant la fixation de l'antigène sur l'anticorps n'est pas de nature covalente et est réversible. En effet, les complexes antigènes-anticorps peuvent être dissociés par de fortes concentrations en sel, des pH élevés ou par la présence d'une quantité importante d'épitope qui agit alors par compétition.

Plusieurs types d'interactions sont à considérer. Bien que leur participation à l'interaction entre les deux partenaires varie d'un complexe à l'autre, les forces impliquées sont des forces électrostatiques, des forces de Van der Waals, des liaisons hydrogènes et des interactions de type hydrophobe [129] qui sont particulièrement présentes dans le cas des anticorps.

Les interactions de Van der Waals et les interactions hydrophobes sont en général de très courte portée et nécessitent par conséquent une très bonne complémentarité entre les structures présentes sur l'antigène et sur l'anticorps. Les forces électrostatiques et les liaisons hydrogène sont, quant à elles, liées aux groupements fonctionnels situés sur l'anticorps.

La reconnaissance entre un anticorps et son antigène peut être caractérisée par son affinité. Elle mesure la force avec laquelle un site anticorps unique se lie à l'antigène. L'affinité entre antigène et anticorps peut être caractérisée par une constante appelée constante d'affinité K_a qui caractérise l'équilibre de formation du complexe antigène-anticorps. La détermination de cette constante est très importante en immunologie : en effet, plus l'affinité est grande moins il faut d'anticorps pour éliminer l'antigène.

Remarque : On utilise généralement le terme d'affinité lorsque l'anticorps ne se lie qu'à un seul site de fixation sur l'antigène. La notion de valence permet de définir le nombre de sites de liaisons disponibles pour un anticorps (ou un antigène). Sa valeur correspond au nombre de sites de liaisons disponibles sur un anticorps (ou, dans le cas de l'antigène, au nombre d'anticorps pouvant se lier à l'antigène). Dans le cas où plusieurs sites de liaison interviennent dans la formation du complexe antigène anticorps, on ne parlera plus d'affinité mais d'avidité qui caractérise la force totale d'interaction.

La constante d'association (ou constante d'affinité) K_a définit l'état d'équilibre de

la réaction entre un anticorps Ab et son antigène Ag. Elle est définie par la relation :

$$K_a = \frac{[Ab:Ag]}{[Ab][Ag]}$$

ou $[Ab : Ag]$, $[Ab]$ et $[Ag]$ définissent respectivement les concentrations du complexe anticorps-antigène, de l'anticorps et de l'antigène. La constante de dissociation est $K_d = 1/K_a$.

Dans le cas de l'interaction antigène anticorps, cette constante varie généralement entre 10^4 à $10^{12} \text{L.mol}^{-1}$.

D.3 Glossaire

Note : La plupart des définitions qui sont présentées dans ce glossaire sont extraites du livre Immunobiologie (de Boeck) [160].

Anticorps : "Un anticorps est une protéine qui se fixe spécifiquement à une substance particulière, son antigène. Chaque molécule d'anticorps a une structure unique qui lui permet de se lier spécifiquement à son antigène. Tous les anticorps partagent cependant la même structure générale et sont classés dans la famille des Immunoglobulines ou IgG."

Anticorps Anti-IgG : "Ces anticorps sont dirigés contre les domaines constants des immunoglobulines."

Antigène : "On appelle antigène toute molécule qui se fixe spécifiquement à un anticorps. Leur nom provient de leur capacité à générer des anticorps."

Épitope : "Site d'un antigène reconnu par un anticorps ou un récepteur à l'antigène. Les épitopes sont aussi appelés déterminants antigéniques."

Immunité : "Capacité à résister à une infection."

Immunoglobuline (Ig) : "Famille de protéines à laquelle appartiennent les molécules d'anticorps. Les immunoglobulines de membrane servent de récepteur à l'antigène à la surface des cellules B."

IgG : "Classe d'immunoglobulines caractérisée par une chaîne lourde. C'est la classe la plus abondante des immunoglobulines présentes dans le plasma."

Immunologie : "Étude de tous les aspects de la défense de l'hôte contre l'infection et des conséquences nocives des réactions immunitaires."

Lymphocytes : "Toutes les réponses immunes adaptatives dépendent des lymphocytes. Les lymphocytes forment une classe de leucocytes qui portent différents récepteurs de surface à l'antigène. Ces récepteurs sont codés par des segments de gènes réarrangés. On distingue deux types principaux de lymphocytes : les lymphocytes B (cellules B) et les lymphocytes T (cellules T), qui assurent respectivement l'immunité humorale (humeur \equiv liquide de l'organisme) et l'immunité cellulaire. Lors de la reconnaissance de l'antigène, le lymphocyte grossit pour devenir un lymphoblaste, il prolifère puis se différencie en une cellule effectrice spécifique de l'antigène. Dans le cas des cellules B, les cellules se différencient en cellules productrices d'anticorps de la même spécificité antigénique que son récepteur de surface."

Mécanismes effecteurs : processus par lesquels les éléments pathogènes sont détruits et éliminés de l'organisme.

Micro-organismes Pathogènes : Organismes microscopiques généralement unicellulaires, qui peuvent causer des maladies lorsqu'elles infectent un hôte.

Paratope : Partie de l'anticorps qui se lie à l'épitope.

Protéine : Les protéines sont les produits de l'expression des gènes. Elles constituent les agents d'exécution de la cellule. Ce sont des polymères d'acides aminés, donc des macromolécules.

Réponse immune adaptative ou immunité adaptative : "Réponse des lymphocytes spécifiques à un antigène y compris le développement de la mémoire immunitaire. Les réponses immunes adaptatives sont générées par sélection clonale des lymphocytes."

Annexe E

Utilisation du PDMS pour la NanoImpression

Dans cette annexe, nous nous proposons de donner une description synthétique des principaux développements et résultats menés dans le cadre de cette thèse autour de la technique de NanoImpression et de son utilisation pour la fabrication de nanoélectrodes. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication [175] et principalement d'un chapitre d'ouvrage [165] auquel le lecteur pourra se référer pour trouver des informations techniques plus détaillées (nature des polymères utilisés, les conditions opératoires, les divers traitements chimiques mis en oeuvre,...).

E.1 Utilisation du PDMS pour la NanoImpression

E.1.1 Présentation du procédé

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II de ce manuscrit, l'utilisation de la lithographie électronique reste, bien que très performante en terme de résolution, très limitée pour la fabrication de dispositifs à haut rendement et à bas coût. Dans un cadre plus général, le développement de techniques de nanostructuration combinant haute résolution, bas coût et haut rendement constitue un des verrous technologiques majeurs dans le développement des nanosciences.

Dans ce contexte, de nombreuses recherches ont été dédiées à la mise au point de techniques alternatives aux techniques lourdes existantes (lithographie électronique, lithographie EUV, ...). Parmi elles, la technique appelée NanoImpression (Nano Imprint Lithography - NIL) semble particulièrement bien adaptée à la nanostructuration. Cette technique a été proposée en 1995 par S. Chou [176]. Son principe repose sur la réplique des structures présentes à la surface d'un moule dans une couche de polymère déposée sur un substrat. Le moule est en général fabriqué en silicium et structuré par lithographie et gravure. Le paramètre critique de la technique réside principalement dans le choix du polymère. En effet, la réplique des structures par moulage implique un écoulement du polymère entre les structures présentes sur le moule et le substrat. Les propriétés rhéologiques du polymère conditionnent donc en grande partie la réplique. Les premiers développements de la technique de NanoImpression se sont faits autour de matériaux de type thermoplastiques dont le PMMA est l'exemple le plus représentatif. Toutefois, même si ces matériaux ont permis de démontrer la réplique de structures avec une très forte résolution ($\simeq 10\text{nm}$), leur utilisation dans la technique de NanoImpression reste problématique. Premièrement, ces matériaux nécessitent, pour être moulés, d'être chauffés à des températures supérieures à leur température de transition vitreuse T_g ($T_g \simeq 140^\circ\text{C}$ pour le PMMA). Deuxièmement, même chauffés bien au delà de leur T_g , ces matériaux restent très visqueux et leur moulage requiert généralement des temps d'impression longs ($> 1\text{H}$) et des pressions élevées (50 à 100 bars).

L'approche que nous avons développée permet de réduire les contraintes technologiques de pression et de température lors du moulage. Son principe repose non plus sur l'utilisation de matériaux thermoplastiques mais sur l'emploi de matériaux réticulables. Ces matériaux sont obtenus à partir de solutions de prépolymère fluides qui peuvent ensuite être réticulées par exemple par une augmentation de température ou une irradiation UV. Nous nous sommes appuyés sur l'expérience acquise autour d'un matériau particulier, désormais bien connu dans le domaine du Microcontact Printing ou de la Microfluidique : le PolyDiméthylSiloxane (PDMS). Nos premières expériences ont été

menées en utilisant une formulation commerciale du PDMS connue sous la référence Sylgard 184 et distribuée par la société Dow Corning. Plusieurs reformulations de la solution de prépolymère (modifications des poids moléculaires, du taux de réticulation, ...) ont ensuite été mises au point en particulier pour modifier les propriétés mécaniques du matériau réticulé.

D'un point de vue général les avantages du PDMS pour des applications de moulage sont nombreux. Ils reposent en partie sur la très faible tension de surface du prépolymère ($\simeq 21\text{mN/m}$) qui permet un très bon mouillage des surfaces et donc, après réticulation, une réplique fidèle des structures du moule. Par ailleurs, la solution de prépolymère est très fluide (5.5 Pa.s contre 400 Pa.s pour le PMMA à 230°C) et permet donc de réduire les pressions nécessaires à la réplique. Enfin, la réaction de réticulation peut être facilement contrôlée pour modifier la température et le temps nécessaires au moulage.

Le protocole expérimental développé autour du PDMS est décrit dans le schéma de la figure E.1.

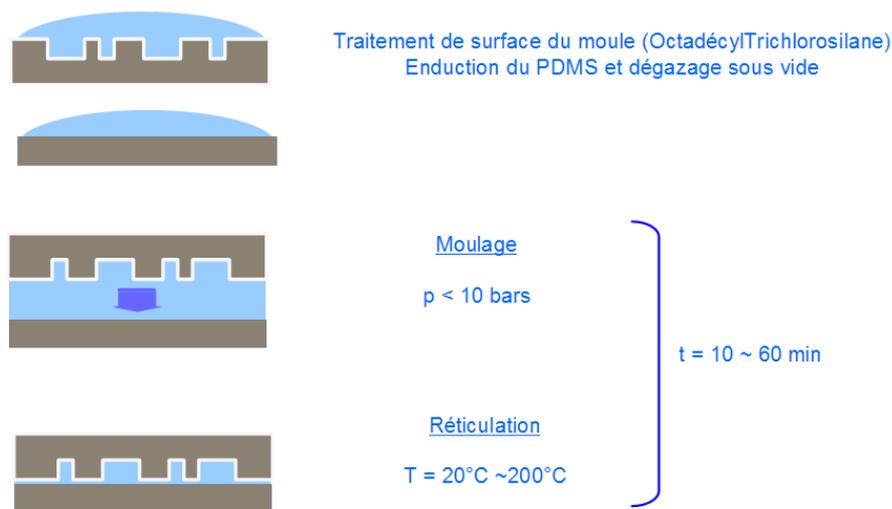


FIG. E.1 – Schéma de description du procédé de NanoImpression basé sur l'utilisation du PDMS (PolyDiMéthylSiloxane)

La première étape du procédé que nous avons utilisé consiste en la fabrication d'un moule rigide, en silicium, par lithographie et gravure ionique réactive. Ce moule subit ensuite un traitement chimique de surface anti-adhésif (formation d'une monocouche auto-assemblée d'octadécyltrichlorosilane). Ce traitement permet de passiver la surface du moule et d'éviter toute réaction de greffage du PDMS sur le moule qui compromettrait le démoulage. Le moule est ensuite mis en contact avec une couche de prépolymère déposée sur un substrat de silicium. Une pression faible (< 10 bars) est exercée alors sur le moule. L'ensemble est ensuite placé à des températures comprises entre 20 et 200°C pour réticuler le matériau. Le démoulage est effectué à température ambiante.

E.1.2 Résultats expérimentaux

Les premières expériences ont concerné la réplcation de structures de dimensions micrométriques. Ces premiers essais nous ont permis de mettre en évidence les capacités de moulage du PDMS et la possibilité de développer des protocoles de transfert autour de ce matériau. Dans un deuxième temps, la réalisation de moules nanométriques par lithographie électronique nous a permis de déterminer de la résolution offerte par le PDMS et de procéder aux premiers tests de réplcation de nanoélectrodes.

E.1.2.1 Versatilité du procédé

Quelques exemples de résultats de moulage de structures micrométriques sont reportées à la figure E.2.

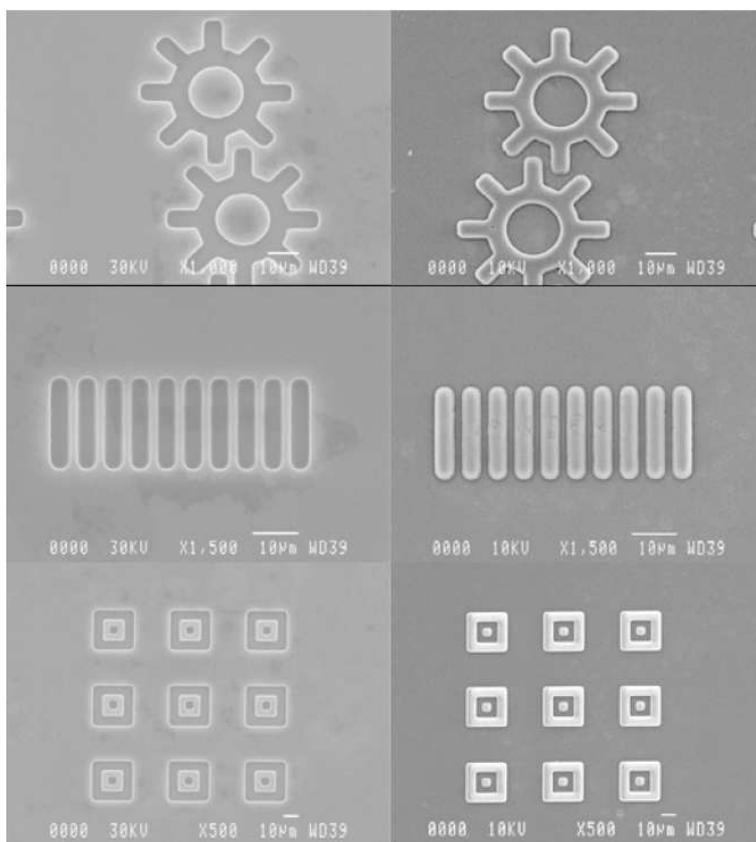


FIG. E.2 – *Colonne de gauche : Images MEB de moules en silicium réalisés par lithographie optique et gravure ionique réactive (profondeur $2.2\mu\text{m}$). Colonne de droite : Images MEB des structures en PDMS réplquée sur le substrat.*

Comme nous pouvons le voir, les structures réplquées ne présentent pas de défauts et reproduisent très fidèlement les structures du moule. Les mesures des dimensions des structures indiquent que les écarts relatifs par rapport aux dimensions du moule sont généralement inférieurs à 1%. Par ailleurs, les images MEB témoignent du très bon état de surface après moulage et ce de façon homogène sur la totalité de la surface imprimée. A l'échelle de structures micrométriques, nous n'avons observé aucune limitation due

aux dimensions et aux formes des structures répliquées ce qui corrobore l'intérêt d'un prépolymère de faible viscosité.

Un paramètre technologique important dans la procédure de NanoImpression, en particulier en ce qui concerne les étapes de transfert, concerne l'épaisseur résiduelle de polymère présente dans le fond des motifs après moulage. En effet, il reste très difficile, même en appliquant des pressions très élevées, de chasser la totalité du polymère entre le moule et le substrat. Cette épaisseur "résiduelle" limite les étapes de transfert en particulier dans le cas du lift-off. La faible viscosité du prépolymère utilisé dans notre cas est un avantage très important car elle permet d'obtenir des couches résiduelles de très faible épaisseur ($<50\text{nm}$). Une étape de gravure chimique (acide sulfurique) ou RIE permet de supprimer cette couche en minimisant les dommages sur les structures moulées.

E.1.2.2 Utilisation en tant que résine épaisse

Les bonnes propriétés de moulage du PDMS (faible viscosité du prépolymère, propriétés de mouillage) nous ont également permis de mettre en évidence les capacités de ce matériau pour une utilisation en tant que résine épaisse.

La figure E.3 présente quelques résultats de moulages obtenus avec des moules micrométriques profonds présentant des structures gravées de $100\mu\text{m}$ de hauteurs.

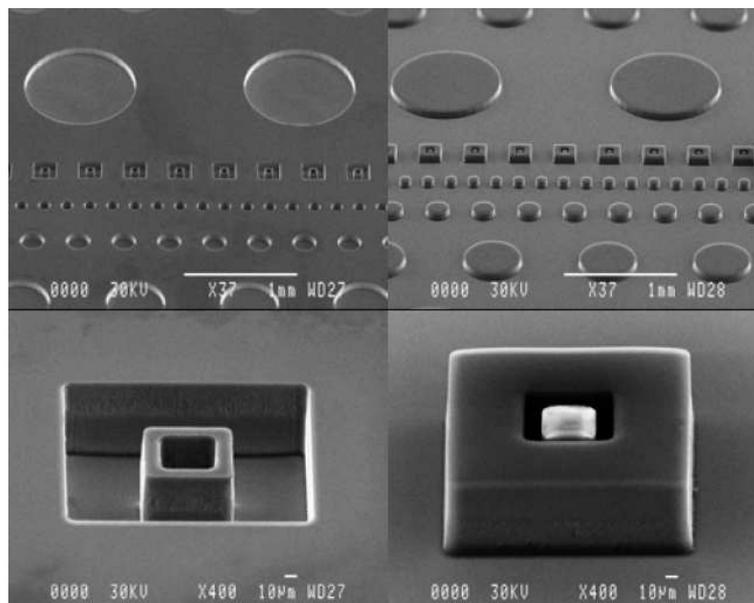


FIG. E.3 – Images MEB de structures moulées (colonne de droite) à partir de moules en silicium profonds de $100\mu\text{m}$ (colonne de gauche).

Des tests complémentaires ont également été réalisés en utilisant des structures micrométriques de plus faibles dimension reproduites en utilisant un moule de $30\mu\text{m}$ de profondeur (Cf. Figure E.4). Ces expériences nous ont permis de montrer la réplique de structures micrométriques présentant des rapports de formes (rapport hauteur/largeur) pouvant atteindre un facteur 15.

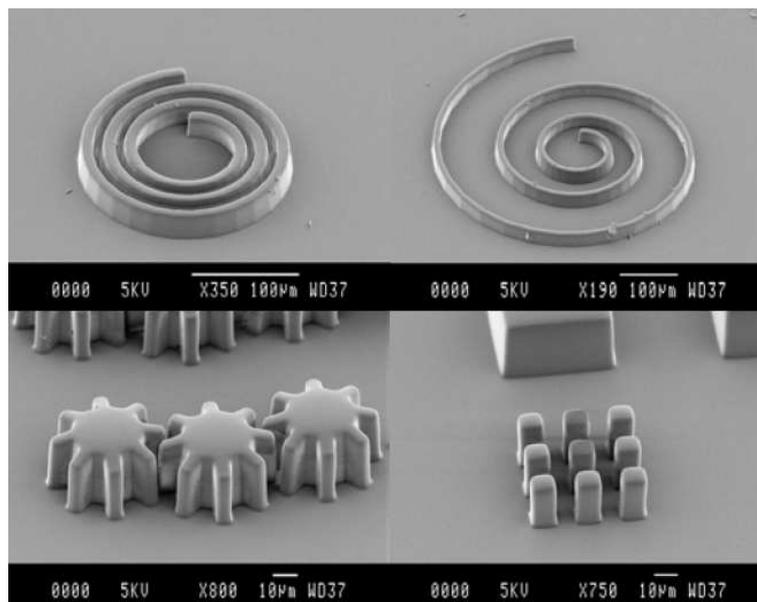


FIG. E.4 – Images MEB de structures en PDMS obtenues en utilisant un moule en silicium profond de $30\ \mu\text{m}$.

E.1.2.3 Transfert par Lift-Off

Dans un premier temps, nous avons souhaité tester les capacités de transfert offertes par le PDMS au travers de la technique de Lift-Off qui constitue une étape clef de la fabrication des nanoélectrodes planaires. La réussite du procédé repose principalement sur l'étape de dissolution de la résine après le dépôt d'un film métallique sur les structures moulées. Dans notre cas, le PDMS est un matériau réticulé. Même si ses propriétés mécaniques restent très sensibles à l'absorption de solvants tels que l'acétone, le toluène, l'hexane, il n'est pas possible de procéder au lift-off par dissolution. Nous avons donc utilisé un procédé d'attaque chimique du PDMS par une solution acide. Plus exactement, nous avons employé un mélange d'acide sulfurique à 50%. Les échantillons sont placés pendant 10 minutes dans la solution acide en utilisant une agitation par sous ultrasons qui permet de favoriser le transfert des structures.

La figure E.5 donne deux exemples de structures obtenues après moulage dans du PDMS et lift-off.

Nous voyons sur les images que le transfert des structures reste très fidèle au moule et que les contours des structures ne présentent que très peu de défauts. L'état de surface après le lift-off reste très bon lui aussi.

E.1.2.4 Transfert par Gravure Ionique Réactive

Nous avons également procédé à des tests de transfert des structures moulées dans un substrat de silicium par gravure ionique réactive. La figure E.6, nous donne quelques exemples de structures transférées dans un substrat de silicium en utilisant un procédé de gravure de type BOSCH.

Ces résultats ont permis de démontrer la versatilité du procédé de transfert qui permet de produire des structures de formes et de dimensions à partir de moules positifs

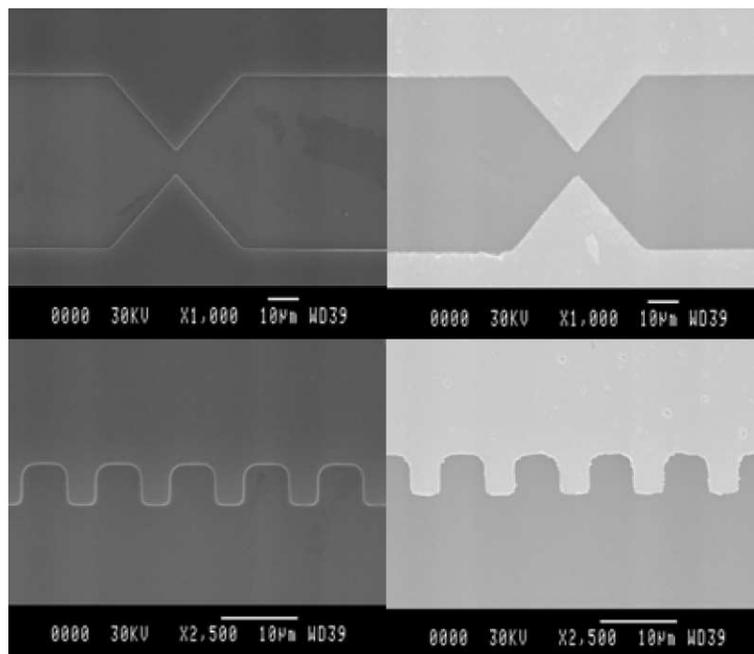


FIG. E.5 – Images SEM de deux structures obtenues après dépôt métallique (Ti/Au 50/150nm) et lift-off dans une solution d'acide sulfurique diluée (à droite). Les images de la colonne de gauche correspondent aux moules utilisés (hauteur des structures : 2.2µm).

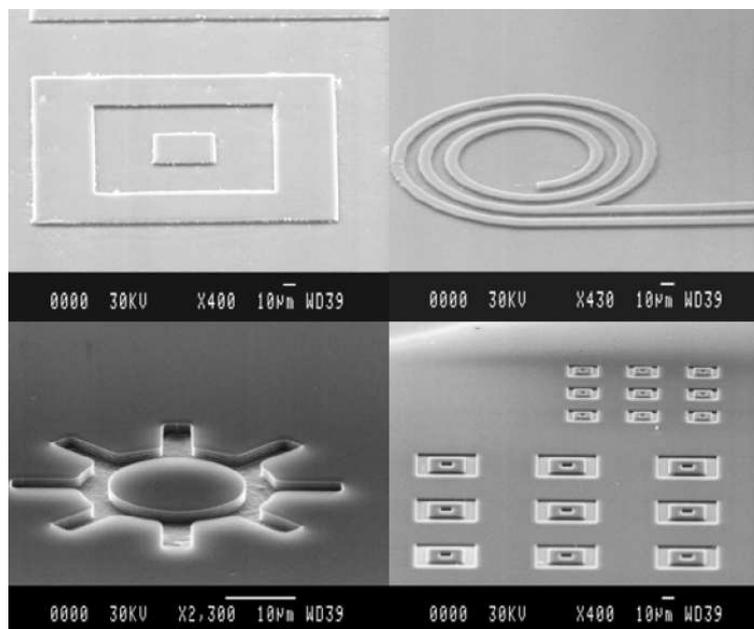


FIG. E.6 – Images MEB de structures micrométriques transférées dans un substrat de Silicium par une gravure ionique réactive (Process BOSCH) de 3µm de profondeur.

(pour lesquels la majorité de la surface du moule est en creux) ou négatifs (inversement). Nous avons pu mettre également en évidence la très grande sélectivité du procédé de gravure du substrat par rapport au PDMS qui présente des vitesses de gravures 6 fois

inférieures à celle du silicium.

E.1.2.5 Réplication de nanostructures

Bien que le PDMS semble très bien adapté à la réplication de structures micrométriques et à leur transfert, l'utilisation de ce matériau pour la réplication de structures nanométriques semblent par contre plus difficile. En effet, les résultats de moulage nous ont montré que les structures nanométriques répliquées présentent des flancs arrondis. Pour tenter d'améliorer les propriétés de moulage du PDMS, en particulier sa dureté, nous avons mis au point plusieurs reformulations du matériau (diminution des poids moléculaires des chaînes, modification du taux de réticulation). Les meilleurs résultats que nous avons obtenus en utilisant ces reformulations concernent des réseaux de lignes de 400nm de période et de 200nm de pas [165].

E.2 Vers de nouveaux matériaux polymères

Bien que les propriétés de moulage offertes par le PDMS nous soient apparues comme insuffisantes pour la réplication de nanostructures, les avantages procurés par l'utilisation de matériaux fluides réticulables semblent être particulièrement avantageuse car elle permet de minimiser les problèmes d'écoulements lors du moulage et par conséquent de diminuer les contraintes technologiques (faible pression, faible température, ...).

Cette voie est toujours en développement au laboratoire et est appliquée actuellement à la réplication des dispositifs à base de nanoélectrodes développées dans le cadre de ces travaux de thèse. Depuis les premiers résultats obtenus avec le PDMS, de nouveaux matériaux ont été développés au laboratoire. Ces matériaux polymères présentent des similitudes avec le PDMS puisqu'ils conservent une chaîne polysiloxane mais intègrent désormais des groupements époxy qui permettent la réticulation des chaînes[177].

La figure E.7 rassemble deux exemples de résultats de réplication de structures correspondant à des réseaux d'électrodes interdigitées.

La dernière étape vers le fabrication de dispositifs de nano-adressage électrique fonctionnels reste l'étape de lift-off. Les derniers résultats menés au laboratoire confirment cette possibilité et ont permis la fabrication de réseaux de lignes métalliques au pas de 300nm. Des travaux sont en cours pour démontrer la réplication de réseaux de nanoélectrodes métalliques fonctionnels.

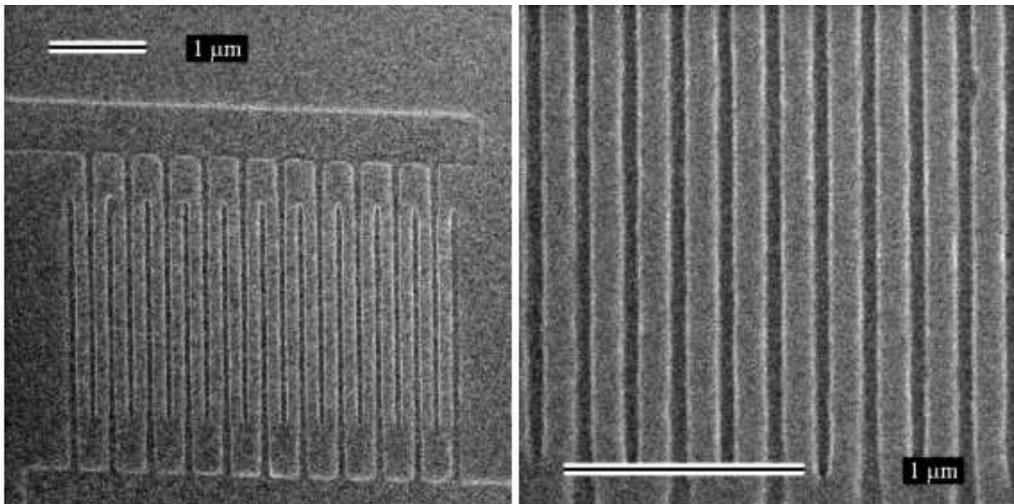


FIG. E.7 – Exemples de structures correspondant à des réseaux d'électrodes interdigitées au pas de 200nm et de 60nm de large répliquées dans un matériau polymère de type epoxy-siloxane [177]. Dans ces expériences, les moules ont été réalisés par lithographie électronique et gravure RIE du substrat. La hauteur des structures fabriquée est d'environ 100nm.

Bibliographie

- [1] S. Fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 :10051–10054, 2001.
- [2] S.P. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, and D. Solas. *Science*, 251 :767, 1991.
- [3] A.C. Pease, D. Solas, E.J. Sullivan, M.T. Cronin, C.P. Holmes, and S.P. Fodor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91 :5022, 1991.
- [4] E.M. Southern, U. Maskos, and J.K. Elder. *Genomics*, 13 :1008, 1992.
- [5] H.Zhu and M. Snyder. *Current Opinion in chemical biology*, 7 :55–63, 2003.
- [6] P. Lippa, L. Sikoll, and D. Chan. *Clinica Chimica Acta*, 314 :1–26, 2001.
- [7] J. Homola, S.S. Yee, and G. Gauglitz. *Sensors and Actuators B*, 54 :3–15, 1999.
- [8] L.S. Jung, C.T. Campbell, T.M. Chinowsky, M.N. Mar, and S.S. Yee. *Langmuir*, 14 :5636–5648, 1998.
- [9] W. Knoll, M. Zizlseperger, T. Liebermann, S. Arnold, A. Badia, M. Liley, D. Piscevic, F-J. Schmitt, and J. Spinke. *Colloids and Surfaces A*, 161 :115–137, 2000.
- [10] U. Kunz, A. Katerkamp, R. Renneberg, F. Spener, and K. Cammann. *Sensors and Actuators B*, 32 :149–155, 1996.
- [11] R.L. Edelstein, C.R. tamanaha, P.E. Sheehan, M.M. Miller, D.R. Baselt, L.J. Whitman, and R.J. Colton. *Biosensors and Bioelectronics*, 14 :805–813, 2000.
- [12] M.M. Miller, P.E. Sheehan, R.L. Edelstein, C.R. tamanaha, L. Zhong, L.J. Bounak, L.J. Whitman, and R.J. Colton. *J. Magn. Mag. Mater.*, 225 :138–144, 2001.
- [13] D.L. Graham, H.A. Ferreira, J. Bernardo, P.P. Freitas, and J.M.S. cabral. *Journal of Applied Physics*, 91(10) :7786–7788, 2002.
- [14] H.A. Ferreira. *Journal of Applied Physics*, 9(3) :7281, 2003.
- [15] D.L. Graham, H.A. Ferreira, P.P. Freitas, and J.M.S. Cabral. *Biosensors and Bioelectronics*, 18 :483–488, 2003.
- [16] A.A. Suleiman and G.G. Guibault. *Analyst*, 119 :2279, 1994.
- [17] G. Bidan, M. Billon, K. Galasso, T. Livache, G. Mathis, A. Roget, L.M. Torres-Rodriguez, and E. Vieil. *Applied Biochem. Biotechnol.*, 89 :183, 2000.
- [18] W. Welsch, C. Klein, M. von Schickfus, and S. Hunklinger. *Analytical Chemistry*, 68 :2000, 1996.
- [19] N. Barié and M. Rapp. *Biosensors and Bioelectronics*, 16 :979, 2001.
- [20] J. Fritz, M.K. Baller, H.P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H.-J. Güntherodt, C. Gerber, and J.K. Gimzewski. *Science*, 288 :316–318, 2000.

- [21] K. Hansen, H.-F. Ji, G. Wu, R. Datar, R. Cote, A. Majumdar, and et T. Thundat. *Analytical Chemistry*, 73, 2001.
- [22] G. Wu, R.H. Datar, K.M. Hansen, T. Thundat, R.J. Cote, and A. Majumdar. *Nature biotechnology*, 19(9) :856–860, 2001.
- [23] J.E. Sader. *Journal of Applied Physics*, 81(1) :64–76, 1998.
- [24] M. Guirardel. *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré : détection de l'adsorption de nanoparticules d'or*. PhD thesis, Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2003.
- [25] S. G. Nilsson, E.-L. Sarwe, and L. Montelius. *Applied Physics Letters*, 83(5) :990–992, 2003.
- [26] D.R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, and G.S. Wilson. *Biosensors and Bioelectronics*, 16 :121–131, 2001.
- [27] P. Bergveld. *Sensors and Actuators B*, 88 :1–20, 2003.
- [28] P.-C. Pandey, S. Upadhyay, and B. Upadhyay. *Analytical Biochemistry*, 252 :136–142, 1997.
- [29] K. Yagiuda, A. Hemmi, S. Ito, and al. *Biosensors and Bioelectronics*, 11 :703–7, 1996.
- [30] M. Lambert. *Etude des propriétés électroniques de molécules organiques au sein d'un jonction métal-molécule-métal*. PhD thesis, 2003.
- [31] T.Heim. *Transport électronique dans l'ADN*. PhD thesis, Université des sciences et techniques de Lille, 2002.
- [32] C. Joachim, J.K. Gimzewski, R. Schittler, and C. Chavy. *Physical Review Letters*, 74(11) :2012–2015, 1995.
- [33] C.Vieu, F.Carcenac, A.Pépin, Y.Chen, M.Mejias, A.Lebib, L.Manin-Ferlazzo, L.Couraud, and H.Launois. *Applied Surface Science*, 164 :111–117, 2000.
- [34] F. Carcenac, C. Vieu, A. Lebib, Y. Chen, L. Manin-Ferlazzo, and H. Launois. *Microelectronic Engineering*, 53 :163–166, 2000.
- [35] F. Carcenac, L. Malaquin, and C. Vieu. *Microelectronic Engineering*, 61-62 :657–663, 2002.
- [36] I. Amlani, A. rawlett, L. nagahara, and R. Tsui. *Journal of Vacuum Science and Technology B*, 20(6) :2802–2805, 2002.
- [37] I. Amlani, A. rawlett, L. Nagahara, and R. tsui. *Applied Physics Letters*, 80(15) :2761–2763, 2002.
- [38] G. Schmid and Y.P. liu. *Nano Letters*, 1(8) :405–407, 2001.
- [39] C.S. Wu, C.D. Chen, S.M. Shih, and W.F. Su. *Applied Physics Letters*, 81(24) :4595–4597, 2002.
- [40] A. Bezryadin, C. Dekker, and G. schmid. *Applied Physics Letters*, 71(9) :1273–1275, 1997.
- [41] Y. Kergueris, H.D. Van der Zant, A. Morpurgo, L. Gurevich, and L. Kouwenhoven. *Applied Physics Letters*, 80(2) :321–323, 2002.

- [42] C. Zhou, C. Muller, M. Deshpande, J. Sleight, and M. Reed. *Applied Physics Letters*, 67(8) :1160–1162, 1995.
- [43] M.A. Reed, C. Zhou, C. Muller, T.P. Burgin, and J.M. Tour. *Science*, 278(5336) :252–254, 1997.
- [44] J. Reichert, R. Ochis, D. Beskmann, H. Weber, M. Mayor, and H. von Lohneysen. *Physical Review Letters*, 88, 2002.
- [45] C. Kergueris, J.P. Bourgoin, S. Palacin, D. Esteve, C. Urbina, M. Magoga, and C. Joachim. *Physical Review B*, 59(19) :12505–12513, 1999.
- [46] H.Park, A.K.L. Lim, A.P. Alivisatos, J. Park, and P.L. McEuen. *Applied Physics Letters*, 75(2) :301–303, 1999.
- [47] J. Park, A.N. Pasupathy, J.I. Goldsmith, C. Chang, Y. Yaish, J.R. Petta, M. Rinkosy, J.P. Sethna, H.D. abrana, P.L. Mc Euen, and D.C. Ralph. *Nature*, 417(6890) :722–725, 6890.
- [48] M. Austin and S.Y. Chou. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 20(2) :665–667, 2002.
- [49] S. Khondaker and Z. Yao. *Applied Physics Letters*, 81(24) :4613–4615, 2002.
- [50] D.D. Eley and D.I. Spivey. *Trans. Faraday. Soc.*, 58 :411, 1962.
- [51] A.Y. Kasumov, M. Kociak, S. Guéron, B. Reulet, V.T. Volkov, D.V. Klinov, and H. Bouchiat. *Science*, 291(5502) :280–282, 2001.
- [52] D. Porath, A.Bezyadin, Simon de Vries, and C. Dekker. *Nature*, 403 :635–638, 2000.
- [53] K.-H. Yoo, D.H. Ha, J.-O. Lee, J.W. Park, J. Kim, J.J. Kim, H.-Y. Lee, T. Kawai, and H.Y. Choi. *Phys. Rev. Lett.*, 87(19) :198102, 2001.
- [54] H.-Y. Lee, H. Tanaka, Y. Otsuka, K.-H. Yoo, J.-O. Lee, and T. Kawai. *Applied Physics Letters*, 80(9) :1670–1672, 2002.
- [55] H.-W. Fink and C. Schönenberger. *Nature*, 398 :407–410, 1999.
- [56] P.J. Depablo, F. Moreno-Herrero, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, P. Herrero, A.M. Baro, P. Ordejon, J.M. Soler, and E. Artacho. *Phys. Rev. Lett.*, 85(23) :4992–4995, 2000.
- [57] A.J. Storm, J. van Noort, S. de Vries, and C. Dekker. *App. Phys. Lett.*, 79(23) :3881–3883, 2001.
- [58] C. Gomez-Navarro, F. Moeno-Herrero, P.J. de Pablo, A. Gil, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, and A.M. Baro. *Phantoms Newsletter*, 4 :4–6, 2002.
- [59] C. Gomez-Navarro, F. Moeno-Herrero, P.J. de Pablo, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, and A.M. Baro. *PNAS*, 99(13) :8484–8487, 2002.
- [60] Phantoms Newsletter. 10/11 :4–6, Janvier-Mars 2003.
- [61] D. Ha, H. Nham, K.-H. Yoo, H mi So, H.-Y. Lee, and T. Kawai. *Chemical Physics Letters*, 355 :405–409, 2002.
- [62] Y. Otsuka, H.Y. Lee, J.-H. Gu, J.-O. Lee, K.-H. Yoo, H. tanaka, H. Tabata, and T. Kawai. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 41 :891–894, 2002.
- [63] Y. Cui, Q. Wei, H. Park, and C.M. Lieber. *Science*, 293 :1289–1292, 2001.
- [64] Y. Huang, X. Duan, Q. Wei, and M. lieber. *Science*, 291 :891, 2001.

- [65] J. Kong, N.R. Franklin, C. Zhou, M.G. Chapline, S. Peng, K. Cho, and H. Dai. *Science*, 287 :622–625, 2000.
- [66] R.J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, and H.J. Dai. *J. Am. Chem. Soc.*, 123 :3838, 2001.
- [67] A. Star, J.-C. Gabriel, K. Bradley, and G. Grüner. *Nano Letters*, 3(4) :459–463, 2003.
- [68] K. Besteman, J.-O. Lee, F. Wiertz, H. Heering, and C. Dekker. *Nano Letters*, —.
- [69] O.A. Saleh and L.L. Sohn. *Nano Letters*, 3(1) :37–38, 2003.
- [70] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, and G. Ben-Yoseph. *Nature*, 391(6669) :775–778, 1998.
- [71] A.N. Shipway, E. Katz, and I. Willner. *Chemical and Physical Chemistry*, 1 :19–52, 2000.
- [72] A.P. Alivisatos. *Science*, 271 :933–937, 1996.
- [73] C. Yee, M. Scotti, A. Ulman, H. White, M. Rafailovich, and J. Sokolov. *Langmuir*, 15 :4314–4316, 1999.
- [74] M.J. Hosteler, J.E. Wingate, C.-J. Zhong, J.E. Harris, R.W. Zashet, M.R. Clark, L.D. Londono, S.J. Green, J.J. Stokes, G.D. Wignall, G.L. Glish, M.D. Porter, N.D. Evans, and R.W. Murray. *Langmuir*, 14 :17–30, 1998.
- [75] P. Buining, B. Humbel, A. Philipse, and A. Verkleij. *Langmuir*, 13 :3921–3926, 1997.
- [76] K. Esumi, A. Suzuki, N. Aihara, K. Usui, and K. Torigoe. *Langmuir*, 14 :3157–3159, 1998.
- [77] M. Garcia, L. Baker, and R. Crooks. *Analytical Chemistry*, 71 :256–258, 1999.
- [78] T. Teranishi, I. Kyosaka, and M. Miyake. *Advanced Materials*, 10 :596–599, 1998.
- [79] C.M. Niemeyer. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 :4128–4158, 2001.
- [80] W. Fritzche and T.A. Taton. *Nanotechnology*, 14 :63–73, 2003.
- [81] L.A. Lyon, M.D. Musick, and M.J. Natan. *Analytical Chemistry*, 70 :5177–5183, 1998.
- [82] L. He, M.D. Muick, S.R. Nicewarner, F.G. Salinas, S.J. Benkovix, M.J. Natan, and C.D. Keating. *Journal of the American Chemical Society*, 122 :9071–9077, 2000.
- [83] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A.P. Alivisatos. *Science*, 281 :2013–2015, 1998.
- [84] W.C. W. Chan and S.M. Nie. *Science*, 281 :2016–2018, 1998.
- [85] I. Alexandre, S. Hamels, S. Dufour, J. Collet, N. Zammattéo, F.D. Longueville, and J.-L. Gala. *Analytical Biochemistry*, 295 :1, 2001.
- [86] J.C. Riboh, A.J. Haes and A.D. McFarland, C. Ranjit Yonzon, and R.P. van Duyne. *Journal of Physical Chemistry B*, 107 :1772–1780, 2003.
- [87] P. Bao, A.G. Frutos, C. Greef, J. Lahiri, U. Muller, T.C. Peterson, L. Warden, and X. Xie. *Analytical Chemistry*, 74(8) :1792–7, 2002.

- [88] O.D. Vlev and E.W. Kaler. *Langmuir*, 15(11) :3693–3698, 1999.
- [89] S.-J. Park, T.T. Andrew, and C.A. Mirkin. *Science*, 295(5559) :1503–1506, 2002.
- [90] S.-J. Park, T.A. Taton, and C.A. Mirkin. *Science*, 295 :1503, 2002.
- [91] V. Haguët. *Détection électronique d'une interaction biomoléculaire entre des électrodes nanostructurées*. PhD thesis, Université des Sciences et Techniques de Lille 1, 2002.
- [92] A.N.Broers, W.W.Molzen, J.J.Cuomo, and N.D. Wittels. *App. Phys. Lett.*, 29(9) :596, 1976.
- [93] W.Chen and H.Ahmed. *Appl. Phys. Lett.*, 62(13) :1499, 1993.
- [94] E.Kratschmer and M.Isaacson. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 4(1) :361, 1986.
- [95] A.M. Haghiri-Gosnet, C. Vieu, G. Simon, M. Mejias, F. Carcenac, and H. Launois. *Journal de Physique IV*, 9 :Pr2–133, 1999.
- [96] C.Vieu, M. Mejias, F. Carcenac, G.C. faini, and H. Launois. *Microelectronic Engineering*, 30 :403, 1996.
- [97] H.Hiraoka. *IBM J. Res. Dev.*, 21 :121, 1977.
- [98] J.O. Choi, J.A. Moore, J.C. Corelli, J.P. Silverman, and H. Bakrhu. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 6(6) :2286, 1988.
- [99] A.N.Broers. *IBM J. Res. Dev.*, 32(4) :502, 1988.
- [100] W. Chen. *Nanotechnology Resolution limits and ultimate resolution*. PhD thesis, Université de Cambridge, 1994.
- [101] A.N.Broers. *J. Electrochem. Soc.*, 128 :166, 1981.
- [102] H.G.Craighaed, R.E.Howard, L.D.Jackel, and P.M.Mankiewich. *Appl. Phys. Lett.*, 42 :40, 1983.
- [103] Copyright (c) 1996-2004 JC Nability Lithography Systems (www.jcnability.com).
- [104] M.G.R. Thomson. *J. Vac. Sci. Technol.*, B 11(6) :2768–2772, 1993.
- [105] M.Gentili, L.Grella, A.Lucchesini, L.Luciani, L.Maestrogiacomo, and P.Musumeci. *J. Vac. Sci. Technol.*, B 8(6) :1867–1871, 1990.
- [106] Y. Xia and G.M. Whitesides. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 28 :153–184, 1998.
- [107] J.W. Bressick and J.M. Calvert. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 32 :5829–5839, 1993.
- [108] W.J.Albery and A.J.Hillman. *Annu.Rep.Prog.Chem.Sect.C*, 78 :377–437, 1981.
- [109] J.M. Di Meglio. *Techniques de l'ingénieur*, AF4(A-1195) :1–9.
- [110] M.J.Hostetler, J.E.Wingate, C-J.Zhong, J.E.Harris, R.W.Zashet, M.R.Clark, J.D.Londono, S.J.Green, J.J.Stockes, G.D.Wignall, G.L.Glish, M.D.Porter, N.D.Evans, and R.W.Murray. *Langmuir*, 14 :17–30, 1998.
- [111] T.Sato, D.G.Hasko, and H.Ahmed. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 15(1) :4548, 1997.
- [112] A.Doron, E.Kats, and I.Willner. *Langmuir*, 11 :1313–1317, 1995.
- [113] M.A.Wood, M.Riehle, and C.D.W.Wilkinson. *Nanotechnology*, 13 :605–609, 2002.
- [114] K.C.Vrancken, K.Possemiers, P. Van Der Voort, and E.F.Vansant. *Colloids and Surfaces A*, 98 :235–241, 1995.

- [115] E.T.Vandenberg, L.Bertilsson, B.Liedberg, K.Uvdal, R.Erlandsson, H.Elwing, and I.Lundström. *J. Colloid Interface Sci.*, 147 :103, 1991.
- [116] B. Martel. *Textiles et matériaux polymères porteurs de cyclodextrines : nouvelles voies d'obtention et d'application*. PhD thesis, Université de Lille 1, 2000.
- [117] T. Heim. *Transport électronique dans l'ADN*. PhD thesis, Université des Sciences et Techniques de LILLE 1, 2002.
- [118] V.Haguet. *Détection électronique d'une interaction biomoléculaire entre des électrodes nanostructurées*. PhD thesis, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 2002.
- [119] I.I. Tarhan and G.H. Watson. *Phys. Rev. Lett.*, 76 :315, 1996.
- [120] Z.Y.Li and Z.Q. Zhang. *Adv. Mater.*, 13 :433, 2001.
- [121] J.H. Holtz and S.A. Asher. *Nature*, 389 :829, 1997.
- [122] J.M. Weissman, H.B. Sunkara, A.S. Tse, and S.A. Asher. *Science*, 274 :959, 1996.
- [123] M.A Wood, M. Riehle, and C.D. Wilkinson. *Nanotechnology*, 13 :605–609, 2002.
- [124] D.K. Yi, M.J. Kim, and D.-Y. Kim. *Langmuir*, 18 :2019–2023, 2002.
- [125] A. van Blaaderen, R. Ruel, and P. Wiltzius. *Nature*, 385(6614) :321–324, 1997.
- [126] S.H. Park, D. Qin, and Y. Xia. *Adv. Mater*, 10(13) :1028–1032, 1998.
- [127] B.V. Derjaguin and L. Landau. *Acta Physicocim.*, 14 :633–662, 1941.
- [128] E.J.W. Verwey and J.Th.G. Overbeek. *Theory of Stability of Lyophobic Colloids*. Amsterdam, 1948.
- [129] J.N. Israelachvili. *Intermolecular et Surface Forces*, volume Second Edition. Academic Press, 1991.
- [130] S. Bhattacharjee, M. Elimelech, and M. Borkovec. *Croatia Chemica Acta*, 71(4) :883–903, 1998.
- [131] E.M.V. Hoeck, S. Bhattacharjee, and M. Elimelech. *Langmuir*, 19 :4836–4847, 2003.
- [132] R.H. French. *J. Am. Ceram. Soc.*, 83(9) :2117–2146, 2000.
- [133] S.H. Park, D. Qin, and Y. Xia. *Advanced Materials*, 10(13) :1028–1032, 1998.
- [134] E. Kumacheva, R.K. Golding, M. Allard, and E.H. Sargent. *Advanced Materials*, 14(3) :221–224, 2002.
- [135] I. Amlani, A.M. Rawlett, L.A. Nagahara, and R.K. Tsui. *Applied Physics Letters*, 80(15) :2761–2763, 2002.
- [136] D.L. Klein, P.L.McEuen, J.E. Bowen Katari, R. Roth, and A.P. Alivisatos. *Applied Physics Letters*, 68 :2574, 1996.
- [137] R. Stratton. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 23(1) :1177–1190, 1962.
- [138] R.H. Fowler and L.W. Nordheim. Electron emission in intense electric field. *Proceedings of the Royal Society, A* 119(1) :173–181, 1928.
- [139] D.K.Yi, M.J.Kim, and D.Y.Kim. *Langmuir*, 18 :2019–2023, 2000.
- [140] Q.H.Wei, D.M. Cupid, and X.L. Xu. *Applied Physics Letters*, 77 :1641, 2000.

- [141] J.M.K Ng, I. Gitlin, and A.D. Stroock and G.M. Whitesides. *Electrophoresis*, 23 :3461–3473, 2002.
- [142] J.C. McDonald, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H. Wu, O.J.A Schueller, and G.M. Whitesides. 21 :27–40, 2000.
- [143] C.VIEU pp L.MALAQUIN. *Alternative Lithography*. Kluwer Academic Publishers, 2003.
- [144] D. Juncker, H. Schmid, A. Bernard, I. Caelen, B. Michel, N. de Rooij, and E. Delamarche. *J. Micromech. Microeng.*, 11 :532–541, 2001.
- [145] Fethi BEDIOUI. Voltampérométrie. théorie et mise en oeuvre expérimentale. Technical Report P 2 126, Techniques de l'ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, P 2 126.
- [146] K.C. Grabar, P.C. Smith, M.D. Musick, J.A. Davis, D.G. Walter, M.A. Jackson, A.P. Guthrie, and M.J. Natan. *J. Am. Chem. Soc.*, 118 :1148–1153, 1996.
- [147] J.P. Renault, A. Bernard, A. Bietsch, B. Michel, H.R. Bosshard, E. Delamarche, M. Kreiter, B. Hecht, and U.P. Wild. *J. Phys. Chem. B*, 107 :703–711, 2003.
- [148] R.S. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, D.E. Ingber, and G.M. Whitesides. *Biomaterials*, 20 :2363–2376, 1999.
- [149] I. Caelen, A. Bernard, D. Juncker, B. Michel, H. Heinzlmann, and E. Delamarche. *Langmuir*, 16 :9125–9130, 2000.
- [150] I. Vikholm and W.M. Albers. *Langmuir*, 14 :3865–3872, 1998.
- [151] R.G. Chapman, E. Ostuni, L. Yan, and G.M. Whitesides. *Langmuir*, 16 :6927–6936, 2000.
- [152] E. Ostuni, R.G. Chapman, M.N. Liang, G. Meluleni, G. Pier, D.E. Ingber, and G.M. Whitesides. *Langmuir*, 17, 2001.
- [153] Y.-M. Zhou, Z.-Y. Wu, G.-L. Shen, and R.-Q. Yu. *Sensors and Actuators*, B 89 :292–298, 2003.
- [154] J.L. Tan, J. Tien, and C.S. CHen. *Langmuir*, 18 :519–523, 2002.
- [155] A. Bernard, E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H.R. Bosshard, and H. Biebuyck. *Langmuir*, 14 :2225–2229, 1998.
- [156] P.M. John, R. Davis, N. Cady, J. Czajka, C.A. Batt, and H.G. Craighead. *Anal. Chem.*, 70 :1108–1111, 1998.
- [157] K. Gasperi. Micro et nano tamponnage de biomolécules. Stage de dea, LAAS-CNRS, 2003.
- [158] L. MALAQUIN. Développement d'une nouvelle technique de lithographie douce : le micro/nano tamponnage moléculaire. Stage de dea, LAAS-CNRS, 2000.
- [159] QIAGEN Hilight Array Handbook <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/INT/arrayli>.
- [160] C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, and M.J. Shlomchik. *Immunobiologie*. Garland Publishing, 2ème édition, 2001.
- [161] J.P. Renault, A. Bernard, A. Bietsch, B. Michel, H.R. Bosshard, E. Delamarche, M. Kreiter, B. Hecht, and U.P. Wild. *J. Phys. Chem. B*, 107 :703–711, 2003.

- [162] KEITHLEY. Low level measurements handbook. Technical Report 5ème édition, www.keithley.com.
- [163] J. L. Tucker. Improving low current measurements on nanoelectronic and molecular electronic devices. White paper, KEITHLEY, www.keithley.com, 2002.
- [164] J.M.K. Ngand I. Gitlin, A.D. Stroock, and G.M. Whitesides. *Electrophoresis*, 23 :3461–3473, 2002.
- [165] C.Vieu L.Malaquin. *Using PDMS as thermocurable resist for mold assisted imprint process*, chapter 8, pages 164–199. Kluwer Academic publishers Boston/Dordrecht/London, c.m. sotomayor-torres edition, 2003.
- [166] D. Juncker, H. Schmid, A. Bernard, I Caelen, B. Michel, N. de Rooij, and E. Delamarche. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 11 :532–541, 2001.
- [167] J.C. McDonal, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H. Wu, O.J.A Schueller, and G.M. Whitesides. *Electrophoresis*, 21 :27–40, 2000.
- [168] M.K. Chaudhury and G.M. Whitesides. *Langmuir*, 7 :1013–1025, 1991.
- [169] K. Hosokawa, K. Hanada, and R. Maeda. *Journal of Micromechanical and Microengineering*, 12 :1–6, 2002.
- [170] J.S. Kim and D.R. Knapp. *Electrophoresis*, 22 :3993–3999, 2001.
- [171] B.H. Jo, L.M. Van Lerberghe, K.M. Motsegood, and D.J. Beebe. *Microelectromechanical Systems*, 9 :76–81, 2000.
- [172] N. Lion, T.C. Rohner, L. Dayon, I.L. Arnaud, E. Damoc, N. Youhnovski, Z.-Y. Wu, C. Roussel, J. Josserand, H. Jensen, J.S. Rossier, M. Przybylski, and H.H. Girault. *Electrophoresis*, 24 :3533–3562, 2003.
- [173] M.L. Pourciel-Gouzy, W. Sant, I. Humenyuk, L. Malaquin, X. Dollat, and P. Temple-Boyer. pages 46–47, Portugal, 21 -24 septembre 2003.
- [174] A. Foulani. *Applied Surface Science*, 206 :294–299, 2003.
- [175] L. Malaquin, C. Vieu, F. Carcenac, and M. Mauzac. *MicroElectronic Engineering*, 61-62 :379–384, 2002.
- [176] S.Y. Chou, P.R. Krauss, and P.J. Renstrom. *Applied Physics Letters*, 67 :3114, 1995.
- [177] B.Viallet, P. Gallo, and E. Daran. *publication soumise à Applied Physics Letters*, 2004.

Dispositifs ultra-sensibles pour le Nano-adressage électrique. Application à la détection de biomolécules

” Because technology provides the tools and biology the problems, the two should enjoy a happy marriage! ”¹. Cette phrase résume parfaitement l’esprit du projet qui a motivé ces travaux de thèse. En effet, le couplage des biotechnologies et des micro et nano technologies, résumé sous le vocable ” Nanobiotechnologies ” est une activité en plein essor qui laisse présager de nombreuses applications en particulier dans le domaine de la biodétection.

L’objectif principal de ces travaux est dédié au développement de stratégies d’adressage de biomolécules à l’échelle nanométrique pour des applications de biodétection. Le premier aspect de ce travail est d’ordre technologique. Il concerne la fabrication de dispositifs d’adressage basés sur des réseaux de nanoélectrodes planaires. En utilisant un procédé reposant sur l’utilisation de la lithographie électronique haute résolution sur un microscope TEM/STEM, nous avons pu démontrer la fabrication de dispositifs à base de nanoélectrodes présentant des espaces inter-électrodes contrôlables entre 100 et 15nm. Une technique de lithographie alternative, la Nano-Impression est également présentée comme une solution possible à la réplication de nanodispositifs fabriqués par lithographie électronique.

La deuxième partie des travaux est dédiée à la mise en place d’un schéma de détection de nanoparticules que nous avons développé autour de dispositifs basés sur des réseaux d’électrodes inter-digitées. Avant de nous intéresser à l’utilisation de ces dispositifs pour une application biologique, nous avons étudié leur réponse électrique vis-à-vis de l’adsorption de nanoparticules d’Or par interaction électrostatique. Les premiers résultats obtenus montrent que le schéma de détection permet d’atteindre un niveau de sensibilité ultime au travers d’une mesure directe de la conductance des dispositifs. Certaines expériences montrent en effet la possibilité de mesurer électriquement l’adsorption d’une seule nanoparticule.

Enfin, la dernière partie de ces travaux est dédiée à l’adaptation de ce protocole pour la détection de biomolécules fonctionnalisées par des nanoparticules d’Or. Pour cela, nous avons employé une approche simple basée sur un système de reconnaissance entre une molécule cible et une molécule sonde. Ce schéma a été appliqué à la détection d’interaction antigène/anticorps et nous a permis de transcrire la sélectivité de la reconnaissance entre les anticorps dans le dépôt des nanoparticules qui se traduit par une modification importante de la conductance du dispositif.

Les possibilités d’intégration ainsi que la compatibilité des dispositifs avec des systèmes de microfluidique rendent ce schéma de détection particulièrement adapté pour le développement d’un système intégré de biodétection à très haute sensibilité.

¹ S. Fields, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 98, pp 10051-10054 (2001)

Mots-clés : Nanobiotechnologies, nanoélectrodes, détection électrique, biocapteur, nanoparticules, immunodétection, Lithographie électronique, Nano-Impression

High Sensitivity Electrical Biodetection using NanoElectrodes based devices. Towards the detection of biomolecules

” Because technology provides the tools and biology the problems, the two should enjoy a happy marriage! ”¹. This sentence perfectly summarizes the spirit of the project underling this thesis. Indeed, the so-called ”Nanobiotechnologies”, that couple Micro and Nanotechnologies with biotechnologies, is an emerging domain, potentially vector of many applications as for example in the field of biodetection.

The main objective of this work is dedicated to the development of new strategies for addressing biomolecules at the nanometer scale for the development of biodetection applications. The first aspect of this work is technological. Using a planar process on silicon involving high-resolution electron beam lithography and lift-off, we have demonstrated the possible fabrication of nanoelectrodes based devices presenting gaps with controlled dimensions ranging from 100nm down to 15nm. An alternative method to electron beam lithography called NanoImprint Lithography is also presented as a possible way to replicate these devices.

The second part is dedicated to the implementation of a nanosystem capable to detect metallic nanoparticles using interdigitated nanoelectrodes array based device. Before applying this procedure to a biodetection application, we have studied the electrical response of these devices versus the immobilization of gold nanoparticles on their active surface. The results indicate that the response is highly sensitive and that the detection of a single nanoparticle is possible using a direct conductance measurement.

Finally, these devices were used to achieve the electrical detection of biomolecules labeled with gold nanoparticles. This approach was successfully applied to the electrical detection of antigene/antibody interactions. Combining this method with a conventional detection scheme based on the interaction between a target and a probe molecules, we have demonstrated that the selectivity of the biomolecular recognition can be revealed by the immobilization of nanoparticles on the surface and finally translated into a drastic modification of the electrical transport through the device.

The integration capacities and the compatibility of this detection schema with microfluidics open very interesting perspectives for the development of high sensitive integrated biochips.

¹ S. Fields, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 98, pp 10051-10054 (2001)

Keywords : Nanobiotechnologies, nanoelectrodes, electrical biodetection, biosensor, nanoparticles, immunoassays, Electron Beam Lithography, Nano-Impress Lithography