

Architecture de puces à ADN fluorescentes ultrasensibles

Introduction	59
A. Détection par fluorescence	60
1. Mécanisme de la fluorescence.....	60
2. Mesure de la fluorescence	61
3. Limite d'utilisation du silicium cristallin	63
B. Propriétés des couches minces de silicium amorphe carboné.....	65
1. Silicium amorphe hydrogéné	65
2. Modélisation de la fluorescence	67
a) Le silicium amorphe.....	67
b) Utilisation d'un réflecteur	69
c) Utilisation de couches minces de silicium amorphe carboné.....	71
C. Modes opératoires : Dépôt et fonctionnalisation de a-Si _{1-x} C _x :H.....	75
1. Evaporation du réflecteur	75
2. Dépôt par PECVD	75
3. Fonctionnalisation des couches minces.....	76
4. Protocole d'immobilisation des sondes.....	77
D. Transfert de la chimie et mesure de la fluorescence	78
1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge	78
2. Mesure de la fluorescence	79
E. Mise au point de l'architecture.....	81
1. Séparation de l'effet de la chimie de surface et de l'amplification optique.....	81
a) Protocole d'hybridation.....	81
b) Choix des architectures	81
c) Mesure de l'effet de la chimie et de l'optique.....	83
d) Hybridation in situ et réutilisabilité.....	86
2. Choix du taux de carbone.....	87
3. Utilisation d'un miroir de Bragg	88
a) Choix du substrat.....	88
b) Protocole d'immobilisation des sondes et hybridation	90
c) Amplification de la fluorescence et limite de détection.....	91
F. Différentes utilisations du biocapteur	93
1. Hybridation in situ.....	93
2. Détermination de la température de fusion	95
3. Etude cinétique.....	97
4. Fluorescence en fonction de la dilution des sondes	100
Conclusion.....	102
Bibliographie.....	103

« La société peut prédire mon avenir, moi seul peux l'influencer »

A. Robbins

Introduction

Les biopuces sont des outils d'analyse et de diagnostic utilisés essentiellement dans le domaine de la génétique et de la pharmacie et qui ont pour objet d'identifier un grand nombre de gènes ou de protéines et d'étudier leurs fonctions.¹ Pour ce qui concerne les puces à ADN, la technique de détection utilisée est généralement la fluorescence, en raison de sa sensibilité.²⁻⁴

Grâce à des techniques d'amplification de la fluorescence, les biopuces les plus performantes permettent d'approcher la détection d'une molécule unique. La société Genewave a démontré que le signal de fluorescence peut être amplifié par un facteur 15 par rapport aux lames standard en déposant un miroir de Bragg adapté sur les lames de verre.⁵ Ces caractéristiques permettent de suivre *in situ* et en temps réel la reconnaissance sonde – cible avec une instrumentation adaptée.^{6,7} Comme la plupart des biopuces, les lames de Genewave sont fonctionnalisées par silanisation en phase vapeur pour éviter la polymérisation de surface et abaisser les coûts.⁸⁻¹¹ Cette technique souffre cependant de limitations sérieuses pour passiver efficacement la surface et optimiser les propriétés physico-chimiques des couches fonctionnalisées vis-à-vis de l'immobilisation des sondes, des adsorptions non spécifiques et de la réutilisation des lames. Ces facteurs sont particulièrement critiques dans le cas des lames amplificatrices.

L'objectif de ce chapitre est le développement d'une nouvelle architecture de biopuces ultrasensibles à base de silicium amorphe pour un meilleur contrôle de la chimie de surface.¹²

Nous nous intéresserons à l'utilisation de couches minces de silicium amorphe carboné et à l'ajustement des propriétés optiques pour étudier l'exaltation de la fluorescence d'un point de vue théorique et expérimental. Nous montrerons aussi l'intérêt de tels biocapteurs pour des études de la réaction d'hybridation.

A. Détection par fluorescence

1. Mécanisme de la fluorescence

La fluorescence est un processus de luminescence permettant à une molécule de passer d'un état électronique excité à un état d'énergie plus basse, par émission de lumière. Plus précisément, la photoluminescence (luminescence induite par absorption de la lumière) est appelée fluorescence ou phosphorescence suivant la nature de l'état excité et la voie de désexcitation (figure 30).

Le processus de fluorescence peut être décrit à partir du diagramme de Jablonski (figure 30).¹³ Pour une molécule donnée, il existe différents états électroniques (état fondamental et états excités) notés S_0 , S_1 et S_2 sur le diagramme ci-dessous. Chaque niveau d'énergie d'une molécule est subdivisé en niveaux correspondant aux différentes excitations vibrationnelles et rotationnelles. L'état électronique est dit singulet lorsque le spin total est nul ou triplet lorsque le spin est égal à 1. Dans la très grande majorité des cas, les molécules susceptibles de fluorescer dans le visible possèdent un système d'électrons appariés dans un état singulet où seul l'état vibrationnel v_0 est peuplé. Lors de l'absorption d'un photon suffisamment énergétique (dans la bande d'absorption des molécules), les électrons accèdent alors à un niveau d'énergie plus élevé : la molécule se trouve dans un état "excité". Les niveaux excités atteints sont par nature instables, la durée de vie de l'état excité est souvent de l'ordre de quelques nanosecondes.

Deux types de processus photophysiques permettent à la molécule excitée de dissiper son énergie excédentaire : les processus de désactivation non radiative et les processus de désactivation radiative ou luminescence. Si l'émission radiative se produit entre deux états singulets, le phénomène est appelé fluorescence. Si l'émission se produit entre deux états de multiplicité différente (triplet – singulet), le phénomène est appelé phosphorescence et la durée de vie de l'état excité est généralement plus longue que pour la fluorescence. Le spectre d'émission de fluorescence est en général décalé vers des longueurs d'onde plus grandes que la longueur d'onde d'excitation (les photons émis par fluorescence ayant une énergie plus faible que celle des photons absorbés).

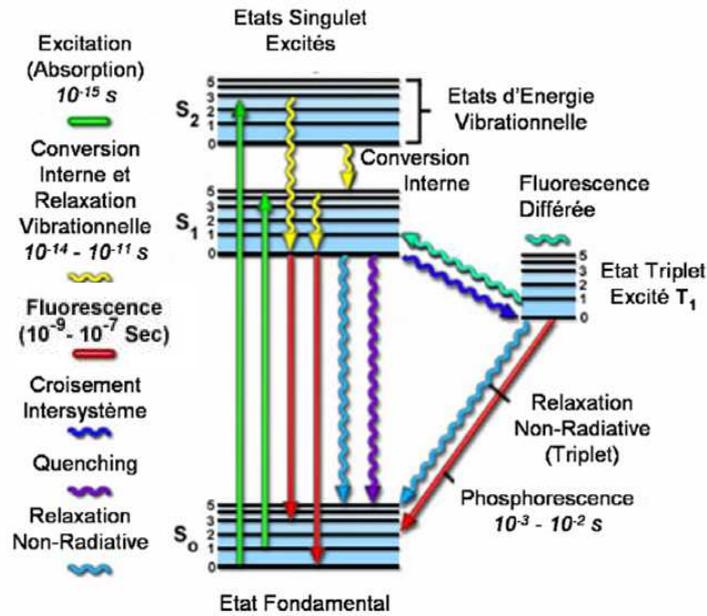


Figure 30 : Diagramme de Jablonski.

Il est possible d'exciter une molécule fluorescente revenue à l'état fondamental plusieurs fois ; ainsi un fluorophore peut émettre des milliers de photons. Ceci explique la très bonne sensibilité des puces à ADN fluorescentes. Il faut cependant éviter d'exposer le fluorophore à une excitation trop longue ou trop intense pour éviter le photoblanchiment, souvent associé à une réaction de l'oxygène avec la molécule dans l'état excité et qui aboutit à une diminution de la fluorescence. La fluorescence peut aussi être affectée par des processus d'extinction lorsque de nouveaux canaux de recombinaison deviennent efficaces, par exemple au voisinage de métaux ou dans certaines configurations où les fluorophores forment des dimères.

2. Mesure de la fluorescence

Il existe de nombreux fluorophores organiques permettant de travailler à n'importe quelle longueur d'onde dans le visible. Parmi les fluorophores organiques, les cyanines sont couramment utilisées dans le domaine des puces à ADN. Aussi choisirons-nous de travailler avec les carbocyanines (Cy) Cy3 ($\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$) et Cy5 ($\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$) dont les structures sont données figure 31. Chaque fluorophore est caractérisé par son rendement quantique Φ (nombre de photons émis/ nombre de photons absorbés). Les carbocyanines 3 et 5 ne présentent pas des rendements très élevés (Cy3 = 0,04 et Cy5 = 0,28)

mais ont l'avantage de pouvoir être intégrées de façon très contrôlée lors de la synthèse de séquences d'oligonucléotides marqués.¹⁴

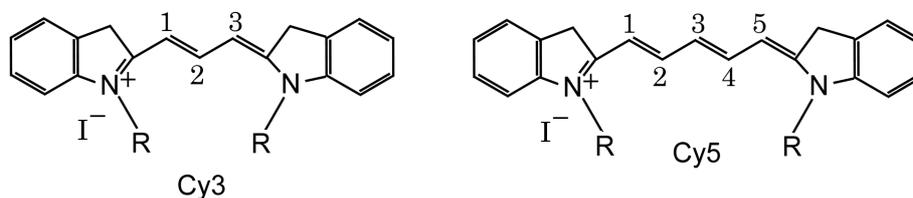


Figure 31: Structure des carbocyanines 3 et 5.

Pour les mesures de fluorescence, nous utilisons deux types de système :

- Un scanner commercial Axon instrumentation Personal 4100A (figure 32a). Dans ce cas, les fluorophores sont excités par un laser à la longueur d'onde d'absorption (532 nm pour Cy3 et 635 nm pour Cy5) et l'émission est filtrée par un filtre d'excitation. La fluorescence est détectée en géométrie confocale par un photomultiplicateur (PMT), auquel est appliquée une tension de 350 ou 450 V qui permet d'ajuster le gain pour la mesure de l'intensité du signal.
- Un imageur Hyblive, commercialisé par Genewave (figure 32b). Cette machine permet de mesurer des images de fluorescence au cours de la réaction d'hybridation.^{6,7} Dans ce cas, les fluorophores sont excités par des diodes électroluminescentes et la fluorescence est collectée par un capteur CCD (Charge Coupled Device).

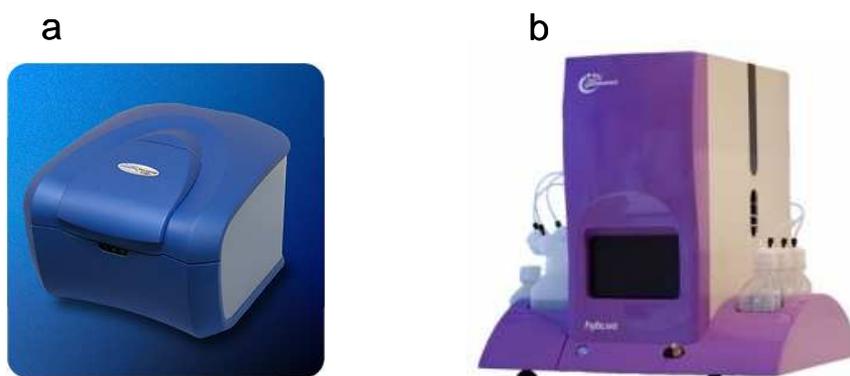


Figure 32 : (a) scanner confocal Axon instrumentation Personal 4100 A ; (b) machine Hyblive permettant des mesures de fluorescence in situ en temps réel.

3. Limite d'utilisation du silicium cristallin

Une première idée pour s'affranchir des limites liées aux procédés d'immobilisation des sondes à la surface est de travailler sur substrat de silicium cristallin, pour lequel des procédés robustes et bien contrôlés de greffage de molécules organiques ont été mis au point. Toutefois, le calcul de l'intensité du champ d'excitation et d'émission pour un fluorophore placé à une distance d (~ 5 nm) d'un substrat de silicium cristallin (figure 33) révèle certaines limites. Dans le cadre de cette étude nous choisirons d'optimiser les architectures pour la cyanine 5 : nous ferons donc les calculs avec les longueurs d'onde dans le rouge, en utilisant les longueurs d'onde d'excitation (635 nm) et d'émission (670 nm) de la cyanine 5. Le rendement de fluorescence d'une molécule accrochée à une surface dépend de façon critique des indices de réfraction des différents substrats. L'intensité du champ d'excitation est gouvernée par le champ électrique local E du faisceau d'excitation, qui diffère généralement de celui dans l'air en l'absence d'interface E_0 . En considérant la superposition de l'onde incidente et de l'onde réfléchie, il est possible de déterminer l'intensité du champ d'excitation en incidence quasi-normale (équation 1). Nous pouvons en déduire que pour le silicium ($n=3,4$; $kd \ll 1$) $E^2 \sim 0,2 E_0^2$ alors que pour le verre nous avons $E^2 \sim 0,64 E_0^2$.

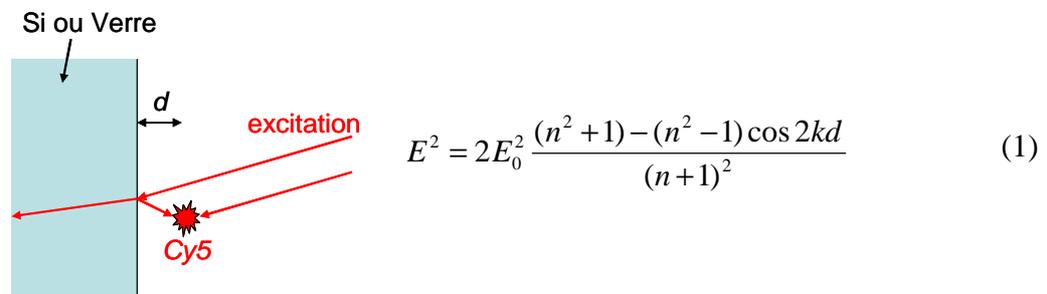


Figure 33 : Représentation schématique pour le calcul de l'intensité du champ d'excitation pour un fluorophore placé à une distance (d) d'un substrat de verre ou de silicium.

Ces résultats sont valables autant pour l'excitation que pour l'émission. Ainsi en définissant la fluorescence F comme le produit de l'intensité du signal émis par l'intensité du signal excité, nous avons $F \sim 0,04$ pour le silicium cristallin et $F \sim 0,4$ pour le verre. Il y a donc un facteur de perte d'un ordre de grandeur en utilisant un substrat de silicium à cause de son indice de réfraction élevé. Ceci peut difficilement être compensé même si la chimie de surface est plus robuste. Toutefois, pour pouvoir bénéficier d'une chimie de surface contrôlée,

nous pouvons utiliser une couche mince de silicium amorphe hydrogéné ou un alliage silicium-carbone amorphe.^{15,16} Ceci permettra d'optimiser l'optique assurant que l'onde incidente et l'onde réfléchie sont en phase au niveau de la molécule fluorescente (figure 34).^{17,18}

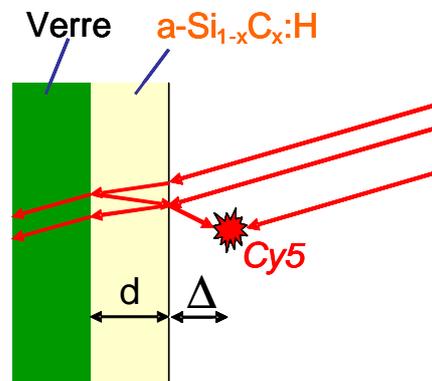


Figure 34 : Représentation schématique d'une lame de verre recouverte d'une couche mince de silicium amorphe carboné.

Nous développerons cette approche dans la suite de ce chapitre en nous intéressant aux propriétés des couches minces de silicium amorphe et des alliages silicium-carbone amorphes.

B. Propriétés des couches minces de silicium amorphe carboné

1. Silicium amorphe hydrogéné

Depuis la fin des années 60, le silicium amorphe a connu un réel essor.^{12,19,20} Les premières couches de silicium amorphe hydrogéné ont été fabriquées par le groupe de Chittik.²¹ De nombreuses études ont permis de développer l'utilisation de ce matériau pour diverses applications dans le domaine de la microélectronique, telles que les cellules photovoltaïques ou les transistors TFT (Thin Film Transistors) pour le contrôle des écrans plats,^{22,23} ou depuis peu dans le domaine des biocapteurs.^{16,24,25}

Comme décrit au chapitre 1, le silicium cristallin est parfaitement ordonné. La distance interatomique est de 0,235 nm et l'angle tétraédrique de 109°C. Même si le silicium amorphe ne présente pas une structure ordonnée à grande échelle, celle-ci est tout de même plus ou moins préservée à l'échelle atomique. La distance interatomique est de 0,235 nm \pm 2% et les angles de 109° \pm 10% (figure 35).²⁶ Il existe dans ce matériau un grand nombre de défauts, liés aux distorsions du réseau amorphe et aux liaisons pendantes dans le matériau. Les défauts impliquent l'apparition d'états électroniques à l'intérieur de la bande interdite. Ainsi la figure 36 représente schématiquement la densité d'états électronique du silicium amorphe (trait plein) et celle du cristallin (tiretés) où l'on peut distinguer les queues de bandes liées aux déformations de liaisons et les niveaux proches du milieu de gap, associés aux liaisons pendantes dans le cas du silicium amorphe (densité d'états profonds).²²

Dans le matériau amorphe les défauts profonds forment des centres de recombinaison pour les photoporteurs. Une grande partie des liaisons pendantes est saturée avec un atome d'hydrogène. En effet, l'introduction de l'hydrogène dans la structure amorphe permet de diminuer considérablement le nombre de liaisons pendantes au profit de liaisons Si-H et donc de diminuer la densité d'états profonds.²⁷ Nos couches minces de a-Si:H sont déposées par décomposition chimique en phase vapeur assistée par plasma (PECVD) et contiennent ~10% d'atomes d'hydrogène.^{28,29} Ceci permet de saturer plus de 99,9% des liaisons pendantes. La faible densité d'états localisés pour le silicium amorphe hydrogéné ($\sim 10^{15}$ cm⁻³) a ainsi permis son utilisation en électronique et pour la conversion photovoltaïque de l'énergie.²²

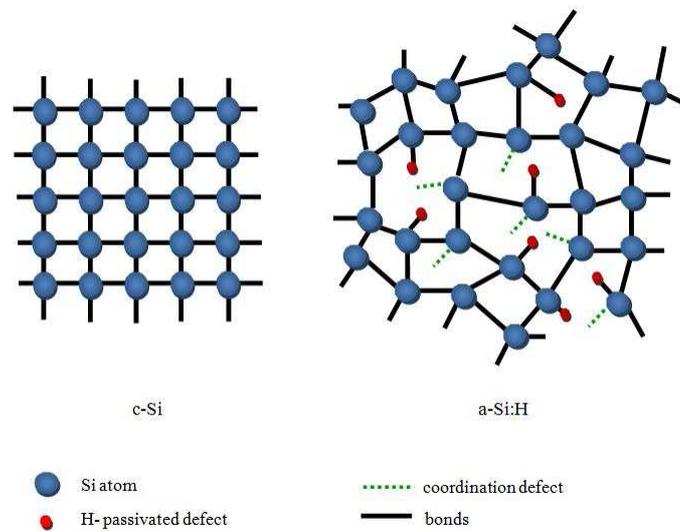


Figure 35 : Représentation schématique de la structure du silicium cristallin et du silicium amorphe.

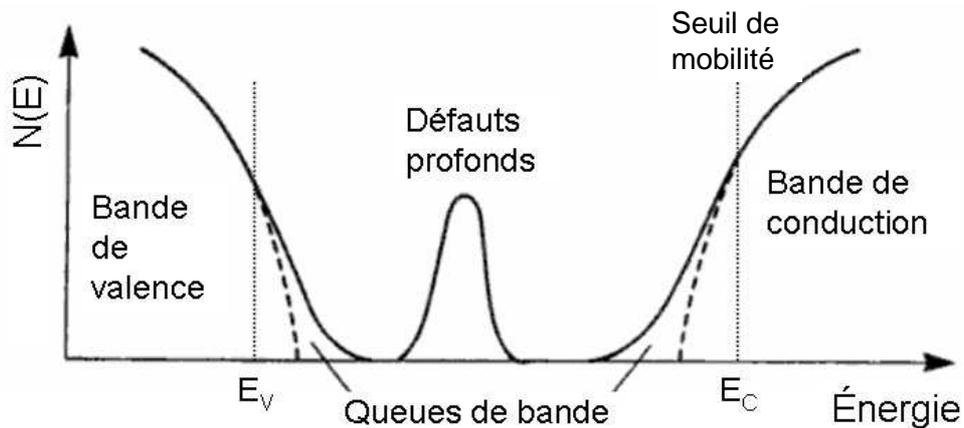


Figure 36 : Distribution de la densité d'états dans la structure cristalline (tiretés) et dans la structure amorphe (trait plein).

Le silicium amorphe est un matériau souvent comparé au silicium cristallin. Il est considéré lui aussi comme semi-conducteur, mais il se différencie du silicium cristallin assez distinctement pour différentes raisons : les propriétés optiques sont différentes, le gap optique du silicium amorphe est plus élevé (1,7 eV) et moins nettement marqué en termes de seuil d'absorption que celui du silicium cristallin (1,1 eV). C'est aussi un matériau plus absorbant ($\alpha_{\text{silicium amorphe}}=1,17 \mu\text{m}^{-1}$ et $\alpha_{\text{silicium}}= 0,38 \mu\text{m}^{-1}$ à 635 nm). Il peut être déposé sur de grandes surfaces (verre, métal, silicium, inox...). Le procédé de fabrication (PECVD) est assez simple

et présente l'avantage de se faire à basse température ($< 300^{\circ}\text{C}$).²² Le silicium amorphe est donc particulièrement intéressant pour l'élaboration de biocapteurs à fluorescence.

2. Modélisation de la fluorescence

a) Le silicium amorphe

Afin de déposer l'épaisseur pour laquelle la fluorescence sera la plus élevée, il convient de calculer le facteur $F(d)$, qui affecte l'intensité de la fluorescence en fonction de l'épaisseur d de a-Si:H. $F(d)$, calculé à partir des équations d'optique classique,³⁰ est le produit de deux fonctions périodiques $f_{exc}(d)$ (facteur à l'excitation) et $f_{em}(d)$ (facteur à l'émission (collection)) avec des périodes légèrement différentes, ce qui contribue à l'amortissement de $F(d)$.

Le comportement oscillatoire (figure 37) est de toute évidence un effet dû à l'interférence entre le rayon réfléchi directement à la surface et un rayon ayant traversé la couche a-Si:H et qui a été réfléchi à l'interface verre / couche mince de a-Si :H.

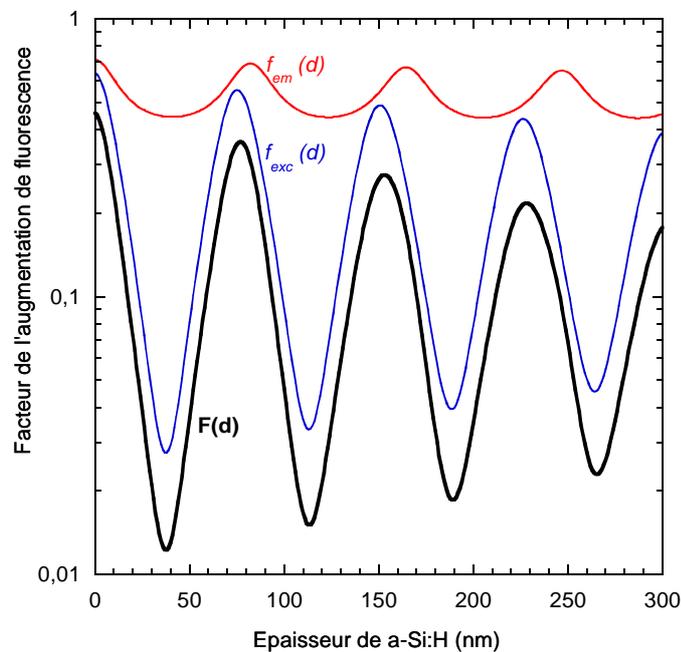


Figure 37 : Calcul théorique des facteurs affectant l'intensité du champ exciteur $f_{exc}(d)$, du champ émis $f_{em}(d)$ et de la fluorescence $F(d)$ en fonction de l'épaisseur de la couche de a-Si:H.

Dans le cas simple d'interférences entre 2 rayons lumineux cohérents de même intensité I_0 et déphasés de $\Delta\phi$ l'intensité résultante est égale à :

$$I_0 (1+\cos (\Delta\phi)) \quad (2)$$

Les interférences constructives se produisent quand la différence du chemin optique entre ces deux rayons est un multiple entier de la longueur d'onde. Cependant, cette condition précise ne peut pas être remplie simultanément pour l'excitation (longueur d'onde 635 nm) et pour l'émission (longueur d'onde 670 nm). Il convient donc de faire un calcul plus détaillé.

Naïvement l'expression de l'intensité récupérée par le capteur est de la forme :

$$I=K\times|E|^2 \quad (3)$$

avec E l'amplitude du champ électrique exciteur au niveau des fluorophores. En effet, l'amplitude du champ électrique $\vec{E}_{\text{émis}}$ réémis par les fluorophores est proportionnelle à celle du champ électrique exciteur au niveau des fluorophores et l'intensité I est proportionnelle à $|\vec{E}_{\text{émis}}|^2$. Or E est affecté par les caractéristiques du système : le champ électrique auquel les fluorophores sont en réalité soumis est $E'_{\text{laser}} = E_{\text{laser}} \times (1+r_E)$ avec r_E le coefficient de réflexion en amplitude du système en incidence normale pour la longueur d'onde du laser. C'est un nombre complexe compris à l'intérieur du disque unité. Une deuxième contribution vient du fait que l'intensité récupérée est également affectée à la réémission. En supposant le rendement non radiatif inchangé, on a alors

$$K' = K \frac{\int_0^{45^\circ} |1 + r'_E(i)|^2 \sin(i) di}{\int_0^{45^\circ} \sin(i) di} \quad (4)$$

où $r'_E(i)$ est le coefficient de réflexion en amplitude pour le champ électrique du système optique considéré pour la longueur d'onde de réémission à l'angle d'incidence i . L'intégration vient du fait que l'on moyenne les contributions sur le cône de demi-ouverture 45° , qui représente toutes les directions que peuvent prendre les rayons lumineux qui vont être collectés par le capteur. Au total on peut donc écrire un gain

$$F = \frac{I'}{I} = |1 + r_E|^2 \frac{\int_0^{45^\circ} |1 + r'_E(i)|^2 \sin(i) di}{\int_0^{45^\circ} \sin(i) di} \quad (5)$$

C'est cette grandeur, comprise entre 0 et 16, que nous allons tenter de maximiser. Les calculs de r_E et r'_E ne sont pas détaillés dans ce chapitre, ils sont basés sur les formules classiques de Fresnel fournies par exemple par l'ouvrage de Born et Wolf.³⁰ Grâce à un programme écrit en fortran, nous pouvons calculer les fonctions $f_{exc}(d)$ et $f_{em}(d)$ pour une excitation en incidence normale et une émission supposée non polarisée. Pour ce faire, le coefficient r_E a été calculé en polarisation p et s, puis moyenné.

De plus, puisque l'émission est collectée sur un angle de demi-ouverture de 45° et la différence du chemin optique dépend de l'angle d'incidence, la période d'oscillation pour le facteur d'émission $f_{em}(d)$ est en réalité distribuée, ce qui amène une contribution supplémentaire à l'amortissement. L'absorption du matériau ($\alpha_{635} = 1,17 \mu\text{m}^{-1}$; $\alpha_{670} = 0,5 \mu\text{m}^{-1}$) contribue aussi à cet amortissement.

Dans le cas idéal où les fluorophores sont libres dans l'air, F est égal à 1 par définition. Or, dans une architecture classique où les fluorophores sont déposés sur du verre, le facteur F est de 0,45 (= $F(0 \text{ nm})$). La courbe calculée prédit un premier maximum à 77 nm (couche $\lambda/2n$) avec une légère diminution de la fluorescence $F(77 \text{ nm}) = 0,36$. Nous définirons un facteur d'amplification G :

$$G = \frac{F_d(\text{max})}{F(0)} = \frac{F_d(\text{max})}{0,45} \quad (5)$$

Dans le cas de a-Si :H, la figure 37 montre que :

$$G = \frac{F_d(\text{max})}{0,45} = 0,8$$

La fluorescence calculée est donc plus faible que celle calculée sur verre. On voit toutefois que l'on a amélioré sensiblement la situation par rapport au silicium cristallin.

b) Utilisation d'un réflecteur

Afin d'augmenter davantage la fluorescence, il convient d'incorporer un réflecteur entre la couche de silicium amorphe et le verre comme le montre la figure 38. En présence d'un réflecteur, la courbe calculée comme précédemment (figure 38c. bleu) montre que le facteur F est égal à 4,2 pour une épaisseur optimale de 25 nm (l'épaisseur de la "couche $\lambda/4n$ " n'est pas exactement la moitié de celle de la "couche $\lambda/2n$ ", parce que le changement de phase

associé à la réflexion sur le métal diffère de sa valeur idéale de π). L'introduction d'une couche d'aluminium ($n= 1-7i$) nous permet d'obtenir un signal avec un gain G égal à 9,3. L'augmentation possible du rendement quantique due au couplage optique entre les fluorophores et le réflecteur est négligée.

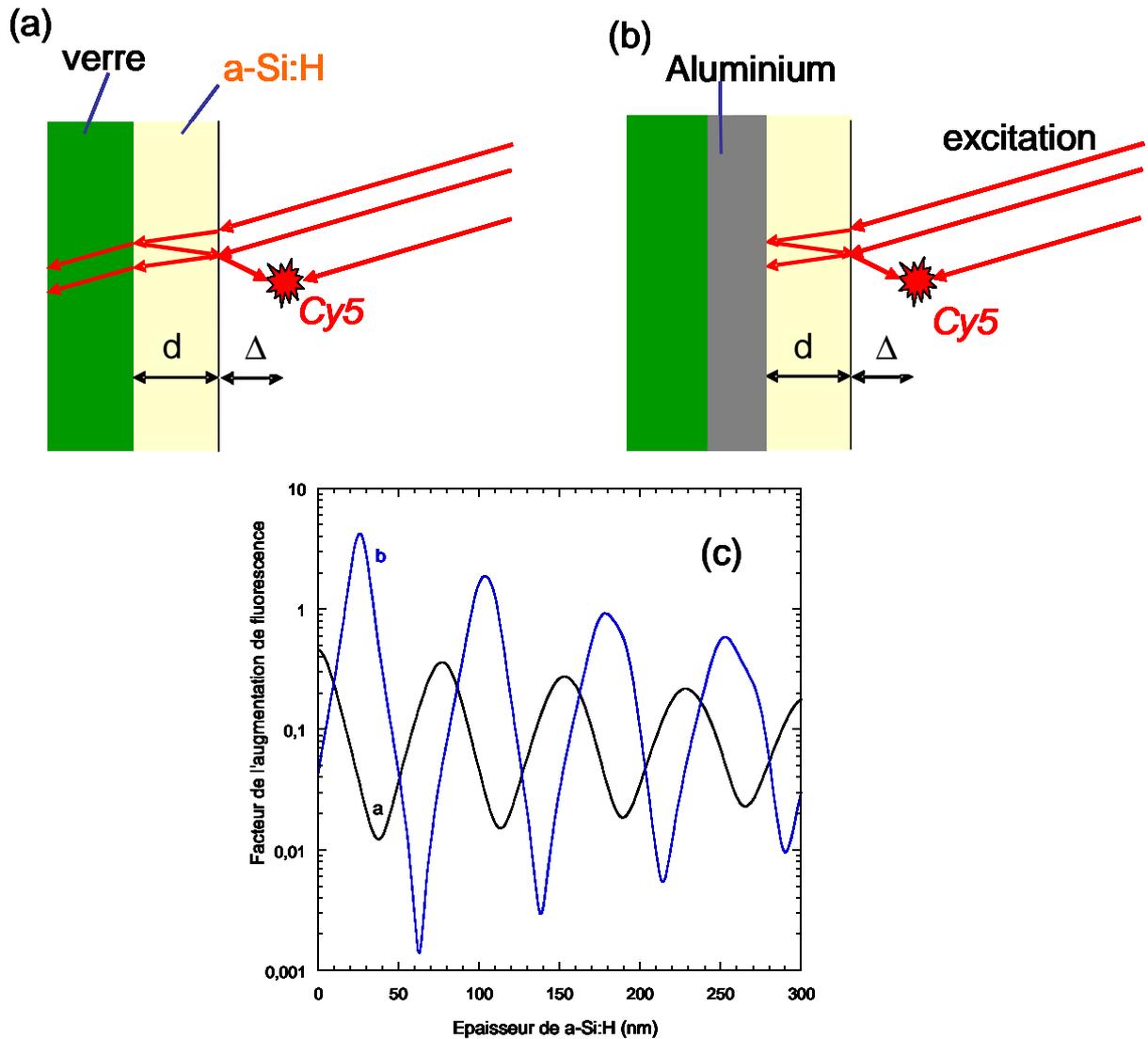


Figure 38 : (a) et (b) Représentation schématique des différentes structures ; (c) calcul théorique pour une couche avec (bleu) et sans aluminium (noir).

c) Utilisation de couches minces de silicium amorphe carboné

(1) Caractérisation des couches

Afin d'optimiser la fluorescence, il est intéressant de pouvoir ajuster les propriétés optiques en diminuant l'indice optique de la couche de silicium amorphe. En effet, l'indice de réfraction du silicium ($n_{635} = 4,2$) est trop élevé par rapport à celui de la couche d'aluminium qui n'est pas un miroir parfait. Ainsi avons-nous été amenés à étudier les alliages silicium-carbone amorphes ($a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$). Ces alliages présentent l'avantage de pouvoir être déposés par PECVD en utilisant comme gaz précurseur un mélange de méthane et de silane.^{28,29,31} Le tableau 2 présente les parties réelle n' et imaginaire n'' pour différents alliages $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$. Ces valeurs ont été déterminées par spectroscopie à transmission suivant une procédure décrite par Solomon.³² Les mesures ont été faites à l'aide d'un spectromètre Shimadzu UV-visible entre 500 et 1100 nm, domaine spectral pour lequel des interférences sont observées. Plus le taux de carbone est important, plus l'indice de réfraction n' diminue. En effet, l'atome de carbone étant plus petit que l'atome de silicium, la liaison Si-C est plus courte que la liaison Si-Si. Ceci entraîne une augmentation des interactions entre les atomes, donc une augmentation de l'énergie du gap optique E_g qui conduit à une diminution de l'indice optique. La teneur en carbone dans nos couches est limitée à 37% pour rester dans le régime « basse puissance » permettant d'éviter un bombardement ionique.^{28,29}

Taux de carbone (%)	n' ₆₃₅	n'' ₆₃₅	n' ₆₇₀	n'' ₆₇₀
0	4,2	0,0681	4,09	0,025
2	3,92	0,0382	3,82	0,0131
5	3,61	0,0173	3,53	0,0056
13	3,24	0,00472	3,19	0,0015
15	2,91	0,014	2,87	0,0004
20	2,63	0,0005	2,60	0,0003
25	2,37	0,0004	2,35	0,0002
33.3	1,97	0,0005	1,93	0,0003
37	1,81	0,0011	1,92	0,001

Tableau 2 : Indice de réfraction des alliages a-Si_{1-x}C_x:H à 635 et 670 nm.

Ces alliages déposés par PECVD ont été très bien caractérisés par Solomon et coll. il y a plus de 20 ans. La RMN du proton a par exemple pu montrer que l'incorporation du carbone se fait sous forme de groupements méthyle -CH₃ pour un taux de carbone < à 20% comme le montre la figure 39.^{28,29}

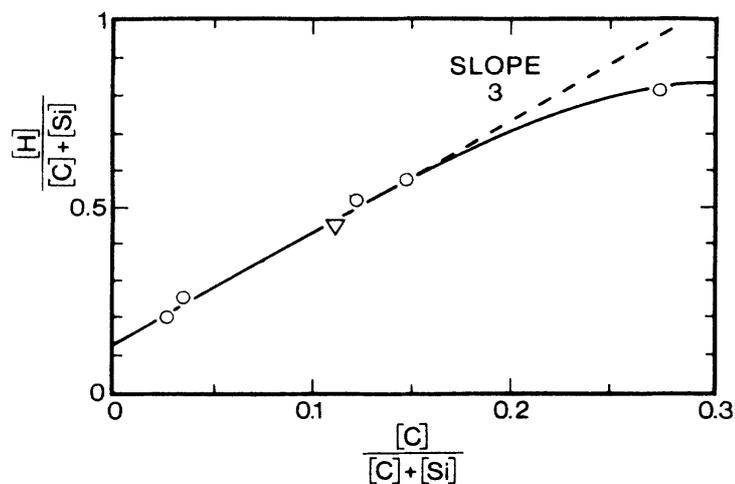


Figure 39 : Concentration atomique d'hydrogène dans les couches minces a-Si_{1-x}C_x:H.²⁹

(2) Simulation de la fluorescence

Dans un premier temps, nous avons cherché à optimiser la fluorescence en faisant varier le taux de carbone. En considérant une architecture avec un réflecteur et une couche de silicium amorphe carboné avec un taux x variable de 0 à 37%, nous avons pu calculer comme précédemment le gain de la fluorescence. La figure 40 montre les résultats obtenus pour différents taux de carbone (0, 15, 20, 37%). On note que la fluorescence augmente avec le taux de carbone x , jusqu'à un maximum atteint pour un taux de 37% (qui est en outre le maximum envisageable par la technique PECVD). On note de plus que l'épaisseur à déposer varie selon le taux de carbone.

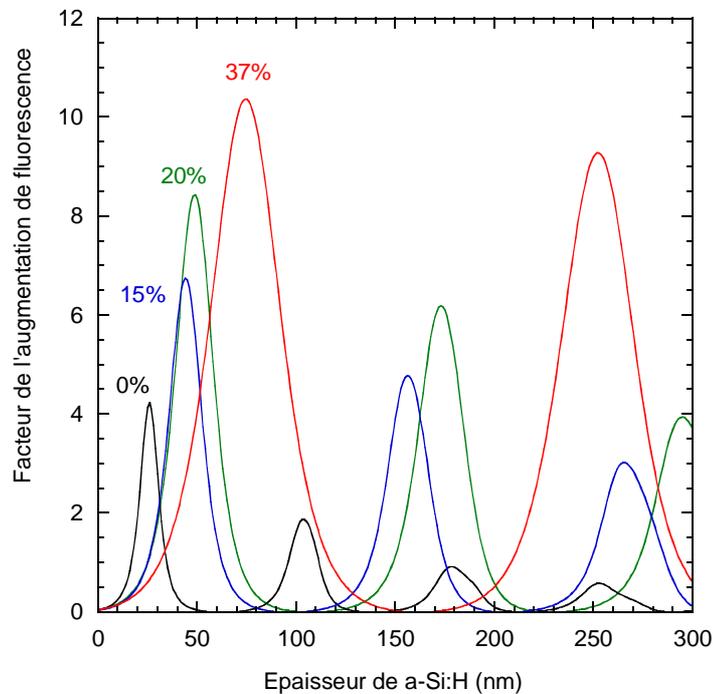


Figure 40 : Simulation du facteur d'augmentation de la fluorescence pour différentes couches de silicium amorphe carboné $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ déposées sur aluminium : 0% (noir) ; 15%(bleu) ; 20% (vert) ; 37% (rouge).

Le tableau 3 résume les résultats obtenus en présentant les facteurs F pour les différentes architectures.

Taux de carbone	G
0	9,5
2	11,1
5	13,1
13	15,5
15	17,2
20	19
25	20,6
33,3	22,9
37	23,2

Tableau 3 : Gain G calculé pour différentes couches a-Si_{1-x}C_x:H.

(3) Utilisation de différents métaux

Il est encore possible d'améliorer ces valeurs de gain en utilisant d'autres réflecteurs métalliques, tels que l'or ou l'argent. Le tableau 4 présente les gains en fluorescence pour une couche de a-Si_{0,63}C_{0,37}:H déposée sur différents métaux. Les résultats obtenus montrent que la fluorescence peut-être de 23 à 27 fois plus élevée suivant le métal utilisé. Nous privilégierons cependant l'utilisation de l'aluminium, moins coûteuse et plus facile.

Métal	Aluminium	Argent	Or
Indice du métal	1-7i	0.135- 4.02 i	0.181-3.02i
F (max)	10.3	12.3	10.8
Gain /verre	23	27	24
Epaisseur déposée (nm)	74	63	57

Tableau 4 : Gain G calculé pour une couche de a-Si_{0,63}C_{0,37}:H déposée sur différents métaux.

C. Modes opératoires : Dépôt et fonctionnalisation de $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$

1. Evaporation du réflecteur

Les métaux sont déposés par évaporation sous vide sur des lames de verre. Elles sont préalablement nettoyées, successivement avec du détergent dilué dans de l'eau osmosée ($15\text{ M}\Omega\text{ cm}$), de l'éthanol, du piranha (1vol. H_2O_2 , 3vol. H_2SO_4) et abondamment rincées à l'eau ultrapure. Elles sont ensuite séchées sous azote. Enfin, les lames sont introduites dans une chambre sous vide $p = 2 \cdot 10^{-5}$ Torr et de l'aluminium est placé sur un filament de tungstène (figure 41). On applique un courant qui permet l'évaporation de l'aluminium par chauffage (effet Joule). L'aluminium se dépose de façon homogène sur les lames de verre.

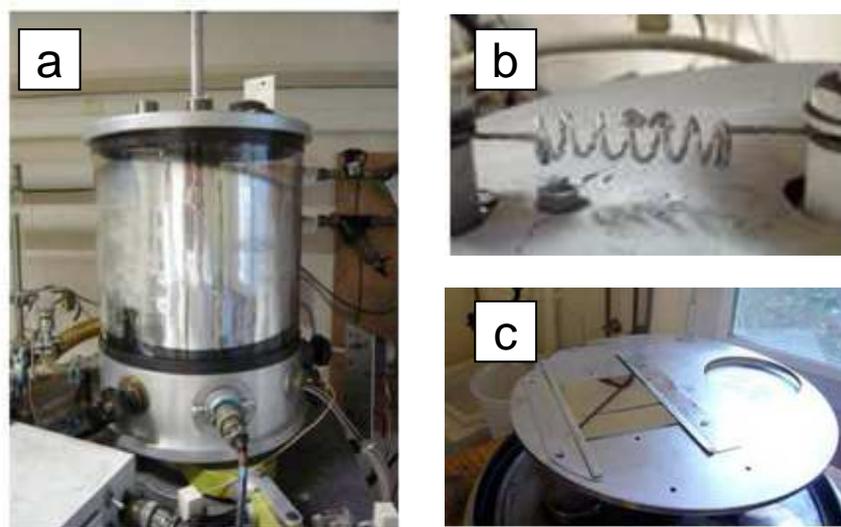


Figure 41 : (a) Enceinte de l'évaporateur d'aluminium ; (b) Filament de tungstène ; (c) Lames métallisées.

2. Dépôt par PECVD

Nous déposerons nos couches minces de $a\text{-Si:H}$ par décomposition chimique en phase vapeur assistée par plasma (PECVD) en « régime basse puissance » (RF= $13,56\text{ MHz}$) avec une densité de puissance de $0,1\text{ W cm}^{-2}$ (figure 42). Les dépôts sont effectués à 250°C sous

une pression de 35 mTorr et avec un flux des gaz de 2 L/h. La proportion des gaz à introduire est calculée d'après le modèle empirique proposé par Solomon et coll., ainsi pour une couche $aSi_{0,85}C_{0,5}:H$, 73% (1,45 L/h soit 24 sccm) de méthane et 27% de silane (0,55 L/h soit 9 sccm) sont nécessaires ; alors que pour d'autres couches il faut 81%(1,62 L/h soit 27 sccm) de méthane et 19% de silane (0,38 L/h soit 6,3 sccm) pour $aSi_{0,8}C_{0,2}:H$ et 97%(1,94 L/h soit 32 sccm) de méthane et 3% de silane (0,06 L/h soit 1 sccm) pour une couche $aSi_{0,63}C_{0,37}:H$,²⁹ ce qui nous permet par exemple d'obtenir en 1 heure des couches de 1,2 μm de a-Si:H ou de 1 μm pour des couches de $aSi_{0,8}C_{0,2}:H$. Les substrats (lames de verre, lames métallisées ou prismes de silicium ATR) sont introduits et placés à l'anode. Les lames métallisées sont introduites telles quelles dans le réacteur, les lames de verre sont nettoyées comme pour l'évaporation de métaux.

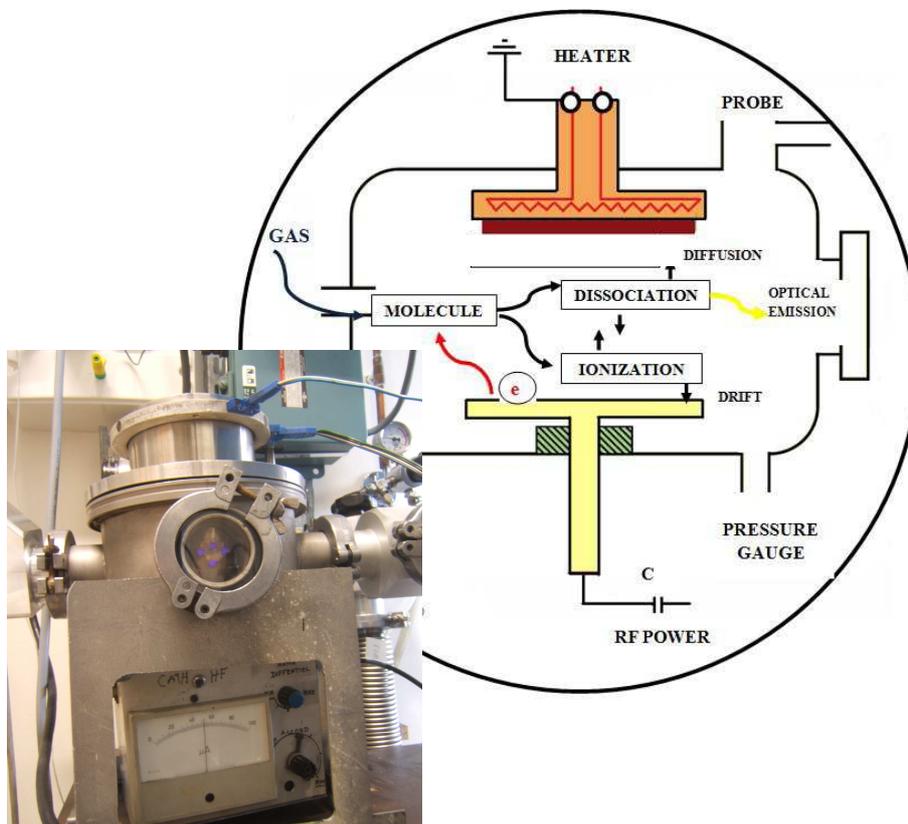


Figure 42 : Représentation schématique du réacteur et du processus lors du plasma.

3. Fonctionnalisation des couches minces

La surface $a-Si_{1-x}C_x:H$ est hydrogénée par exposition à des vapeurs de HF pendant 15 secondes, puis greffée avec des chaînes 10-carboxydécyle par hydrosilylation photochimique dans l'acide undécylénique (312 nm, 6 mW cm^{-2} , 3 h), et finalement rincée à l'acide acétique

(75°C, 30 mn). Les groupes carboxyles sont ensuite activés dans un mélange de EDC et NHS (5 mM/5 mM) à 15°C pendant 1h30.³³ Pour l'étude par spectroscopie infrarouge, les surfaces sont amidées par de l'éthanolamine à $5 \cdot 10^{-2}$ M pendant 15 minutes.³⁴

4. Protocole d'immobilisation des sondes

Pour l'étude par fluorescence de l'immobilisation et de l'hybridation de brins d'ADN, deux sondes d'oligonucléotides sont utilisées : une sonde 25-mer [5' Cy5-AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T-NH₂-(CH₂)₆ 3'] nommée Cy5- \overline{ON} -G (G= groupement aminohexyle) et une sonde non marquée 50-mer [5' AGC-ACA-ATG-AAG-ATC-AAG-ATC-ATT-GCT-CCT-CCT-GAG-CGC-AAG-TAC-TCC-GT-(CH₂)₆-NH₂ 3'] nommée ON1. Les deux sondes, diluées à 10^{-5} M dans 150 mM d'un tampon phosphate contenant 0,01% de SDS (sodium dodécyl sulfate) à pH 8,5, sont déposées par contact sur la surface activée en utilisant un robot de dépôt (spotter) Biorobotics MicroGrid II (figure 43). Une lame de verre commerciale fonctionnalisée par des groupements ester de succinimidyle sert de référence. Après dépôt, les sites activés non amidés sont bloqués avec de l'éthanolamine ($5 \cdot 10^{-2}$ M), les lames sont rincées dans 0,1% SDS (pH 6,5), puis dans de l'eau ultrapure (Millipore) et séchées sous un flux d'azote.

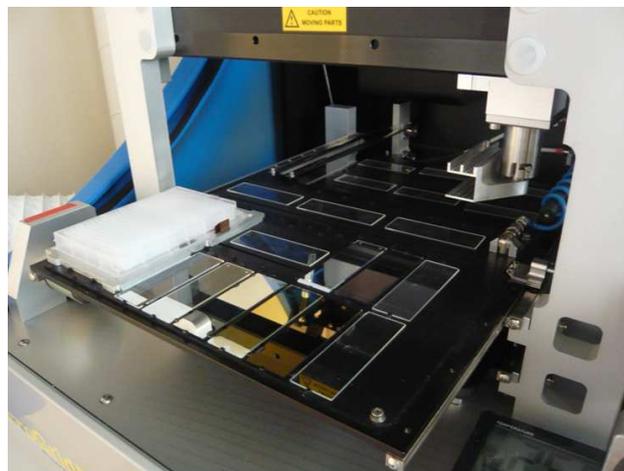


Figure 43 : robot de dépôt Biorobotics MicroGrid II.

D. Transfert de la chimie et mesure de la fluorescence

1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Nous vérifions, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, la qualité des surfaces acides obtenues par hydrosilylation pour une couche de a-Si:H (figure 44, courbe rouge). En intégrant le pic correspondant à la vibration C=O, on peut déterminer la quantité $N \sim 2 \cdot 10^{14}$ de molécules par cm^2 .^{35,36} La surface acide est ensuite activée par EDC/NHS (courbe verte) et amidée par l'éthanolamine (courbe bleue). Aux chapitres 3 et 4, nous montrerons la caractérisation par infrarouge des alliages a-Si_{0,8}C_{0,2}:H et a-Si_{0,63}C_{0,37}:H, utilisés pour la mise en œuvre de capteurs à résonance de plasmons de surface.

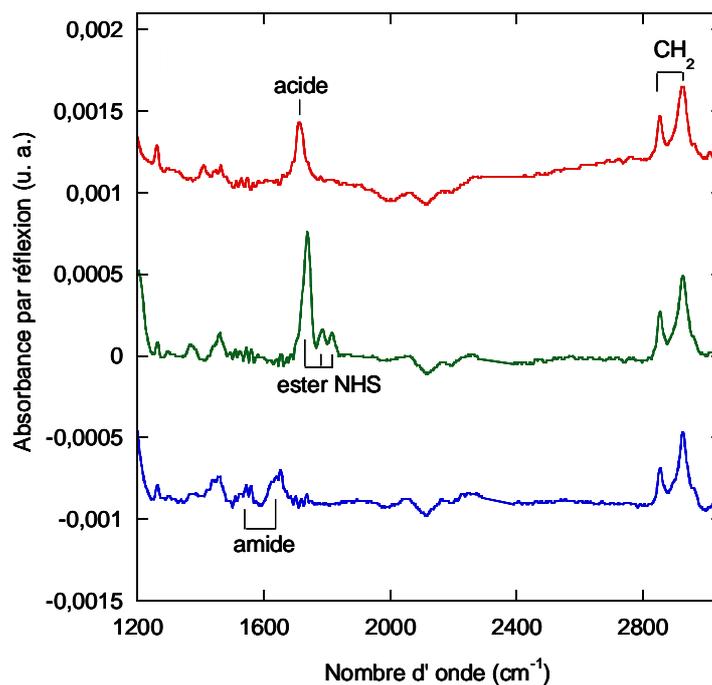


Figure 44 : Spectres infrarouges d'une surface a-Si:H acide (rouge) ; activée (vert); amidée (bleu). Le spectre de référence est une surface a-Si:H hydrogénée par HF.

2. Mesure de la fluorescence

La figure 45 montre l'intensité de la fluorescence mesurée après dépôt des sondes fluorescentes Cy5- $\overline{\text{ON}}$ -G pour différentes architectures (différents taux de carbone et différentes épaisseurs).

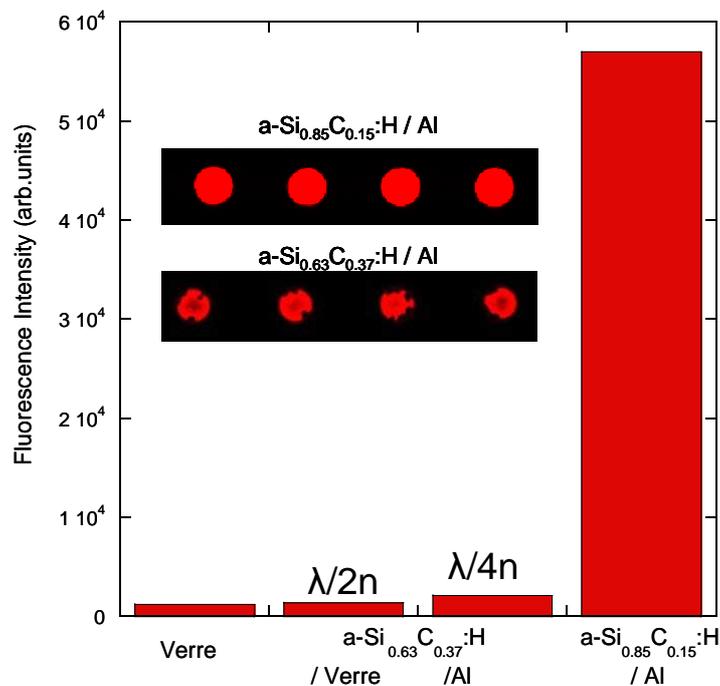


Figure 45 : Diagramme de l'intensité de la fluorescence et formes des spots obtenues sur différentes structures de biocapteurs. Les valeurs des histogrammes correspondent aux valeurs médianes corrigées par les (faibles) valeurs de fluorescence du fond continu, mesurées au voisinage des spots.

On constate que les résultats ne se corrént pas du tout aux prévisions théoriques (tableau 3). En effet, la fluorescence mesurée sur les couches de a-Si_{0.63}C_{0.37}:H sur aluminium est légèrement plus intense que celle mesurée pour une lame de verre. Comme attendu la lame ($\lambda/2n$) a-Si_{0.63}C_{0.37}:H / verre se comporte comme une lame de verre. De façon plus surprenante, la lame ($\lambda/4n$) avec une couche de a-Si_{0.85}C_{0.15}:H / Al présente de meilleures caractéristiques que la lame ($\lambda/4n$) avec une couche de a-Si_{0.63}C_{0.37}:H / Al. La couche de silicium amorphe carboné a une influence sur la fixation des sondes à la surface de silicium. Il y a un fait expérimental frappant lorsque l'on regarde la figure 45 : l'inhomogénéité des spots. Celle-ci montre que sur le silicium amorphe carboné à 37%, la chimie n'est pas aussi contrôlée que sur le silicium amorphe-carboné à 15%. Les couches contenant plus de carbone

comptent moins de sites sur lesquels on peut greffer et le rendement d'immobilisation y est plus faible (par exemple étape d'activation comme on le montrera au chapitre 3). On comprend donc que la fluorescence sur une couche de 37% n'est pas optimale dans la mesure où la chimie de surface n'est pas parfaitement homogène. Cependant nous montrerons au chapitre 3 l'intérêt de cette couche pour d'autres architectures de biopuces.

Le facteur d'amplification G est égal à 46 pour une lame ($\lambda/4n$) a-Si_{0.85}C_{0.15}:H/Al. Il est bien supérieur à celui calculé théoriquement. Ceci peut se comprendre dans la mesure où la chimie de surface utilisée est différente de celle de la lame commerciale. Nous avons donc cherché à dissocier l'optimisation due à l'optique et à la chimie de surface. Pour cela, nous avons choisi de travailler avec une couche de silicium amorphe carboné à 15%, qui nous permet d'avoir des spots homogènes (figure 45) et donc d'étudier la fluorescence après immobilisation des sondes Cy5- $\overline{\text{ON}}$ -G et hybridation des oligonucléotides ON1 avec leurs brins complémentaires. Nous optimiserons ensuite le taux de carbone.

E. Mise au point de l'architecture

1. Séparation de l'effet de la chimie de surface et de l'amplification optique

a) Protocole d'hybridation

La surface sur laquelle ont été immobilisées les sondes ON1 (cf C. 4) est exposée à une solution de concentration $5 \cdot 10^{-9}$ M contenant l'oligonucléotide complémentaire de la sonde ON1 et marqué Cy5 (5' AC-GGA-GTA-CTT-GCG-CTC-AGG-AGG-AGC-AAT-GAT-CTT-GAT-CTT-CAT-TGT-GCT-Cy5 3') dans une chambre d'hybridation Tecan HS 4100. L'hybridation se fait sous agitation pendant 1 heure à 42°C dans un tampon contenant 2,5X SSC (tampon salin de citrate de sodium, pH 7), de solution de Denhardt 1X (agent bloquant), 0,5% SDS et 25% de formamide. Des rinçages post-hybridation de 2 minutes sont ensuite réalisés, en utilisant 3 tampons : 0,5 X SSC + 0,5% SDS ; 0,2 X SSC + 0,5% SDS et 2,5 X SSC.

Les mesures *ex situ* sont réalisées à chaque étape du protocole d'immobilisation des sondes (spotting, lavage) et après hybridation avec le scanner à fluorescence (PMT 450 V) (figure 32a). Plusieurs cycles d'hybridation/déshybridation sont réalisés *in situ*, grâce à la station d'hybridation en temps réel Hyblive (figure 32 b).^{6,7} La déshybridation est réalisée *in situ* à 50°C dans la même chambre dans un mélange formamide (50%), 2,5X SSC. Une image de fluorescence (temps d'intégration 1 seconde) a été prise toutes les 30 secondes.

b) Choix des architectures

La Figure 46 a-b montre les deux structures utilisées pour séparer l'effet de la chimie de surface de celui de l'amplification optique. La Figure 46a représente une structure comprenant une couche a-Si_{0,85}C_{0,15}:H déposée sur une couche d'aluminium. La Figure 46b représente une couche a-Si_{0,85}C_{0,15}:H déposée directement sur du verre. La Figure 46c montre le facteur théorique $F(d)$ qui affecte l'intensité de la fluorescence (courbes en trait plein et pointillés) en fonction de l'épaisseur d de a-Si_{0,85}C_{0,15}:H. Le calcul est réalisé pour le marqueur Cy5 (excitation à 635 nm, émission à 670 nm).

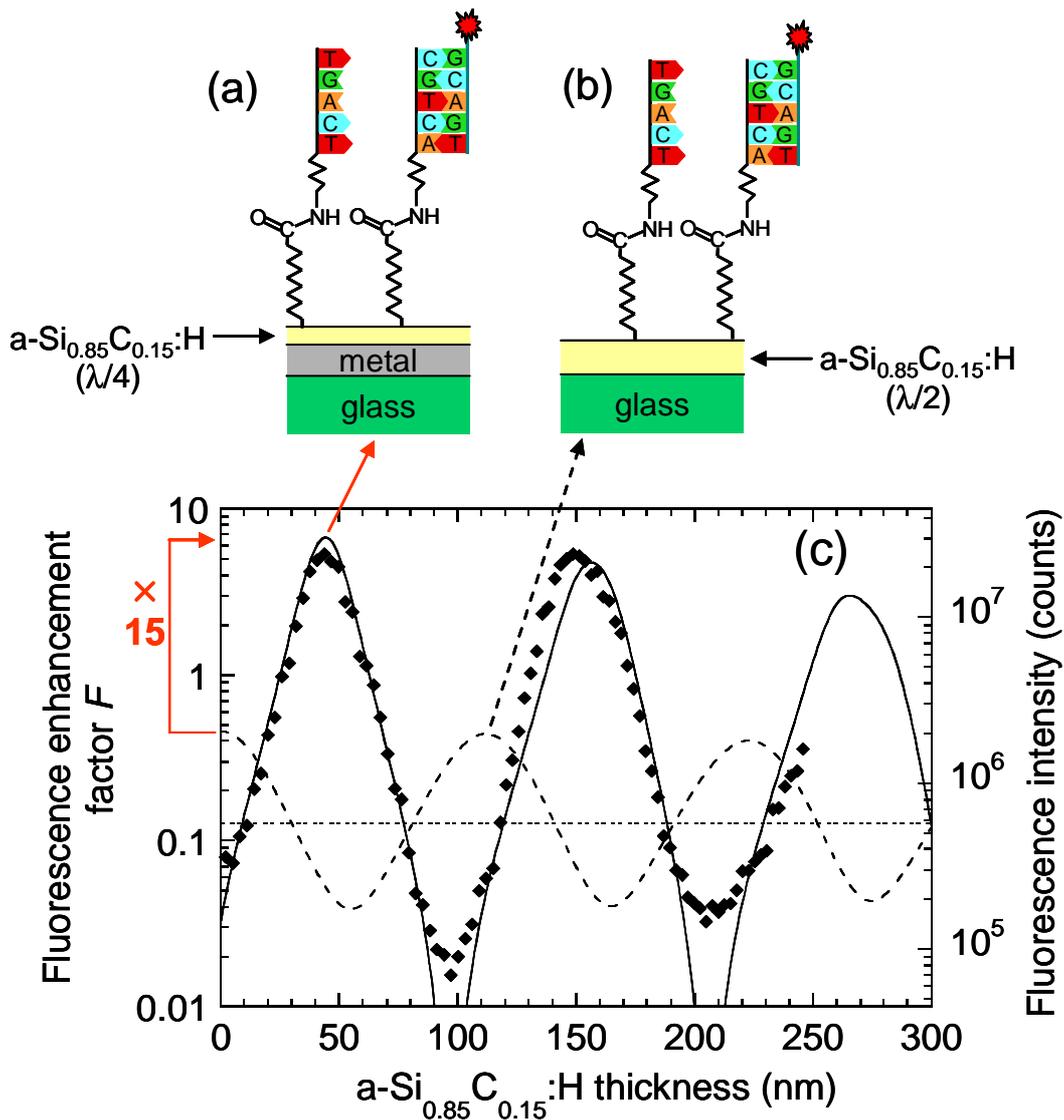


Figure 46 : Vue schématique de l'architecture d'une puce à ADN comprenant une couche $a\text{-Si}_{0,85}\text{C}_{0,15}\text{:H}$ déposée (a) sur un réflecteur en aluminium (b) directement sur verre (c) facteur F affectant l'intensité de la fluorescence (ligne pleine, échelle de gauche) comparée à la mesure de l'intensité de fluorescence (diamants, échelle de droite) en fonction de l'épaisseur de la couche $a\text{-Si}_{0,85}\text{C}_{0,15}\text{:H}$ [schéma (a)]. La courbe en tiretés représente le facteur F calculé pour une couche de $a\text{-Si}_{0,85}\text{C}_{0,15}\text{:H}$ déposée directement sur du verre [schéma (b)]. La droite horizontale en pointillés est la valeur de F calculée pour une couche de $a\text{-Si}_{0,85}\text{C}_{0,15}\text{:H}$ très épaisse.³⁷

En l'absence de réflecteur, la courbe calculée (Fig. 46c, tiretés) prédit un premier maximum à 112 nm sans augmentation de la fluorescence. En effet, un dépôt direct de $\lambda/2n$ de la couche de $a\text{-Si}_{0,85}\text{C}_{0,15}\text{:H}$ sur du verre est optiquement équivalent au verre « nu » et la seule différence avec les lames ordinaires est la différence de la chimie de greffage.

En présence d'un réflecteur, la courbe calculée (figure 46c, trait continu) montre que le facteur F est égal à 7 pour une épaisseur optimale de 44 nm. Ainsi, on obtient une amélioration du gain G d'un facteur d'environ 17 par rapport à une lame standard. Pour des épaisseurs très élevées, le facteur F calculé diminue à 0,12 à cause de l'indice de réfraction élevé du a-Si_{0,85}C_{0,15}:H massif. Afin de tester ces prédictions théoriques, une couche est déposée en utilisant un cache mobile pendant l'étape de PECVD pour varier de manière continue l'épaisseur de la couche d sur le même substrat. L'intensité de la fluorescence mesurée sur les spots est montrée sur la Figure 46c (diamants). Afin de pouvoir comparer calcul et expérience, les deux échelles ont été ajustées par translation. Il y a donc une bonne adéquation entre la théorie et l'expérience. Dans ce qui suit, la structure optimisée consiste en une couche de a-Si_{0,85}C_{0,15}:H de 44 nm d'épaisseur déposée sur un réflecteur d'aluminium.³⁷

c) Mesure de l'effet de la chimie et de l'optique

La Figure 47 compare l'intensité de fluorescence mesurée sur les deux structures définies précédemment (une lame de verre portant une couche de a-Si_{0,85}C_{0,15}:H de 112 nm d'épaisseur (« couche $\lambda/2n$ ») (figure 47 b,e) et une couche de a-Si_{0,85}C_{0,15}:H de 44 nm d'épaisseur sur un réflecteur (figure 47 c,f) avec celles mesurées sur une lame commerciale (a,d), après l'immobilisation de la sonde Cy5- \overline{ON} -G (figure 47 a,b,c) et l'hybridation de la sonde ON1 avec son complémentaire Cy5 (figure 47 d,e,f). Afin de pouvoir les comparer, les mêmes conditions (celles recommandées par le fournisseur des lames commerciales) ont été utilisées sur nos lames et sur les lames commerciales de verre.

L'augmentation de l'intensité de la fluorescence de (b) à (c) peut être attribuée à l'optique optimisée (effet « physique »). Puisqu'une couche $\lambda/2n$ est optiquement équivalente au verre « nu », l'augmentation de la sensibilité de (a) à (b) de la figure 47 peut être attribuée à l'amélioration de la chimie de surface (effet « chimique »). La figure 47 montre que l'amélioration totale est de l'ordre d'un facteur 40, avec un facteur 13 attribué à l'optique et un facteur 3 attribué à la chimie de surface. Plusieurs points sont à noter :

- les lames basées sur la chimie Si-C (figure 47 b, c) ne manifestent essentiellement aucune perte du signal fluorescent après lavage, ce qui est une preuve de la stabilité de l'immobilisation covalente des sondes;
- les spots (b) et (c) sont bien circulaires et reproductibles;

- Malgré la forte augmentation du signal, le niveau du fond continu dans (c) reste bas, ce qui indique une faible fluorescence des substrats. La figure 47 (d-f) montre le résultat d'une comparaison similaire au niveau de l'hybridation (oligomères sondes non marqués hybridés avec les cibles marquées au Cy5). Tandis que la lame commerciale (d) montre une fluorescence plus forte qu'en (a), après spotting, les résultats de (e) et (f) sont essentiellement équivalents à ceux obtenus au niveau du spotting. Une fois de plus, le fond continu de la lame (f) est très faible, indiquant une très faible adsorption non spécifique des cibles.

Le vieillissement des lames a été testé en les conservant dans une solution de 1X SSC (pH~7) pendant un mois. Aucune dégradation mesurable de la fluorescence n'a été observée.

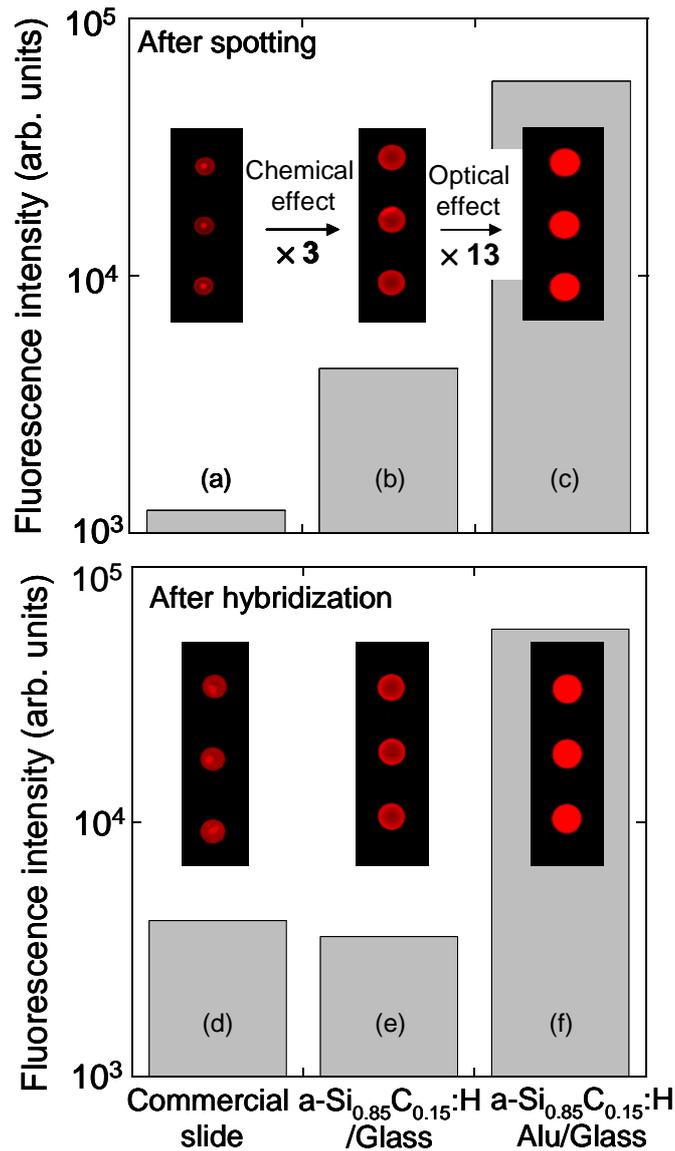


Figure 47 : Diagrammes de l'intensité de fluorescence et formes des spots obtenus sur les lames commerciales (a, d), sur a-Si_{0,85}C_{0,15} (112 nm) / verre (b, e) et sur a-Si_{0,85}C_{0,15} (44 nm) /Al/verre (c, f), après spotting (a, b, c) et après hybridation (d, e, f). Les spots Cy5- $\overline{\text{ON}}\text{-G}$ sont montrés en haut, et les spots après hybridation des brins ON1-50 mer non marqués avec les brins complémentaires marqués avec la Cy5 sont montrés en bas. Les valeurs des histogrammes correspondent aux valeurs médianes corrigées par les (faibles) valeurs de fluorescence du fond continu, mesurées au voisinage des spots.³⁷

d) Hybridation in situ et réutilisabilité

L'intensité de la fluorescence sur une lame optimisée (figure 46a) permet de suivre l'hybridation de ON1 in situ en milieu liquide. La figure 48 montre un cycle typique d'hybridation-déshybridation. Différents cycles ont été réalisés sur une période de 3 semaines pour explorer la réutilisabilité et la stabilité de nos biocapteurs. Les lames ont été stockées dans une solution de 1X SSC entre les différents cycles. Ce type de support permet donc d'enregistrer plusieurs cycles successifs d'hybridation-déshybridation sans perdre de sensibilité. Ceci montre que nos biocapteurs sont réutilisables et confirme la robustesse de la chimie d'accrochage des sondes.

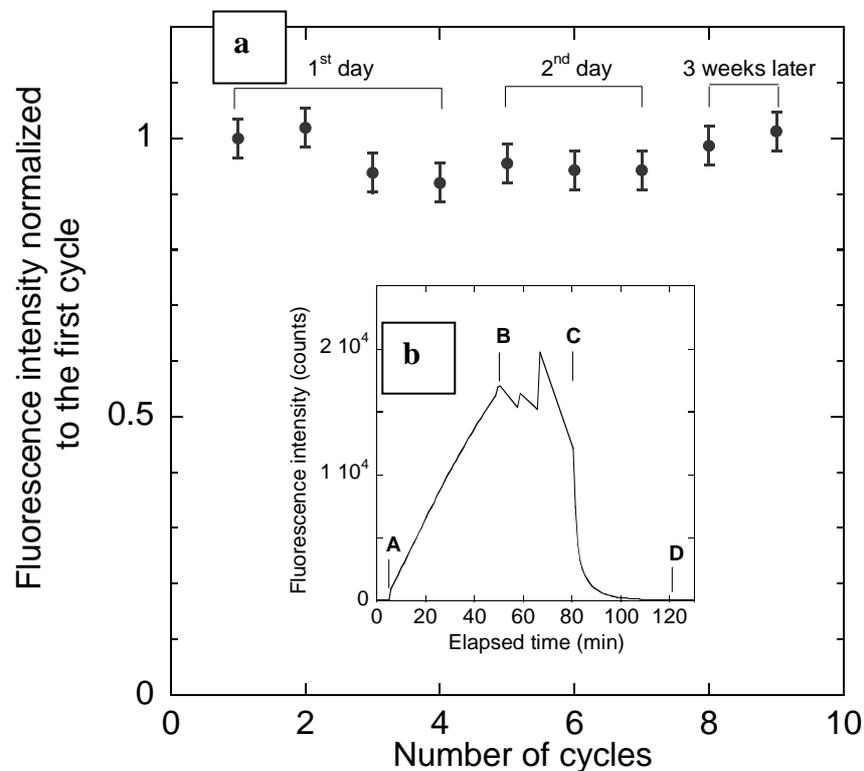


Figure 48 : (a) Intensité de la fluorescence après 30 minutes d'hybridation, en fonction du nombre de cycles d'hybridation/ déshybridation, normalisée au premier cycle. (b) détail d'un cycle d'hybridation/ déshybridation :(A) Introduction de la solution contenant les cibles complémentaires marquées avec Cy5, (B) cycles de lavage post-hybridation, (C) introduction de la solution de déshybridation ; (D) rinçage après la déshybridation.

2. Choix du taux de carbone

Nous pouvons aussi ajuster le taux de carbone pour augmenter la fluorescence, en vérifiant pour quel taux de carbone, le plus élevé possible, la chimie reste contrôlée. Comme Solomon l'a montré, c'est à partir de 20% de carbone que la couche carbonée n'est plus homogène. Il paraît donc raisonnable de ne pas dépasser cette valeur. En effet la figure 49 montre que pour une couche $a\text{-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}:\text{H}$ les spots sont d'une très bonne homogénéité, de plus comme attendu théoriquement la fluorescence, calculée pour une lame ($\lambda/4n$) sur l'aluminium, est plus intense que pour une couche de 15%. Nous privilégierons donc ces couches pour la suite de notre étude.

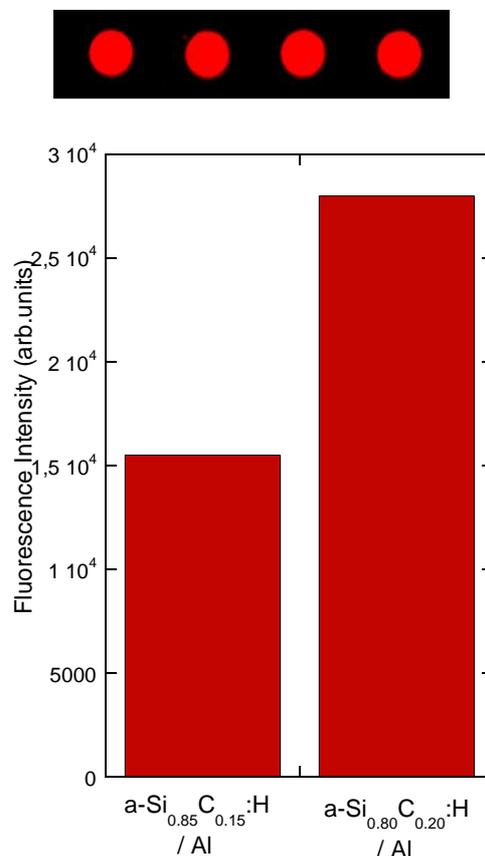


Figure 49 : Diagramme de l'intensité de la fluorescence pour différentes structures de biocapteurs et homogénéité des spots obtenus sur une couche $a\text{-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}:\text{H}$. Les valeurs des histogrammes correspondent aux valeurs médianes corrigées par les (faibles) valeurs de fluorescence du fond continu mesurées au voisinage des spots avec un PMT= 400 V.

3. Utilisation d'un miroir de Bragg

a) Choix du substrat

Le problème de l'optimisation de la fluorescence pour une puce à ADN conduit à chercher le substrat le plus réfléchissant possible aux longueurs d'ondes d'absorption et d'émission des fluorophores utilisés. Jusqu'ici, nous avons présenté des architectures comprenant une couche réfléchissante métallique, qui n'est pas la solution optimale du problème :

- La couche métallique, particulièrement l'aluminium ou l'argent, peut facilement s'oxyder. Il faut donc déposer la couche de silicium amorphe directement après le dépôt de la couche métallique.
- D'un point de vue théorique, les meilleurs rendements de réflexion à une longueur d'onde donnée ne sont pas obtenus par des miroirs métalliques, mais par des miroirs diélectriques dits « miroirs de Bragg ».³⁰

Un miroir de Bragg, conçu pour une longueur d'onde λ_{Bragg} donnée, consiste en une alternance de couches d'indices élevés et faibles, d'épaisseurs choisies telles que le déphasage induit par le passage dans une couche sous une incidence normale vaille $\pi/2$ (figure 50). Ainsi l'épaisseur e_i d'une couche i d'indice n_i est choisie d'après l'équation (6) telle que :

$$e_i \times n_i \times \frac{2\pi}{\lambda_{\text{Bragg}}} = \frac{\pi}{2} \rightarrow e_i = \frac{\lambda_{\text{Bragg}}}{4n_i} \quad (6)$$

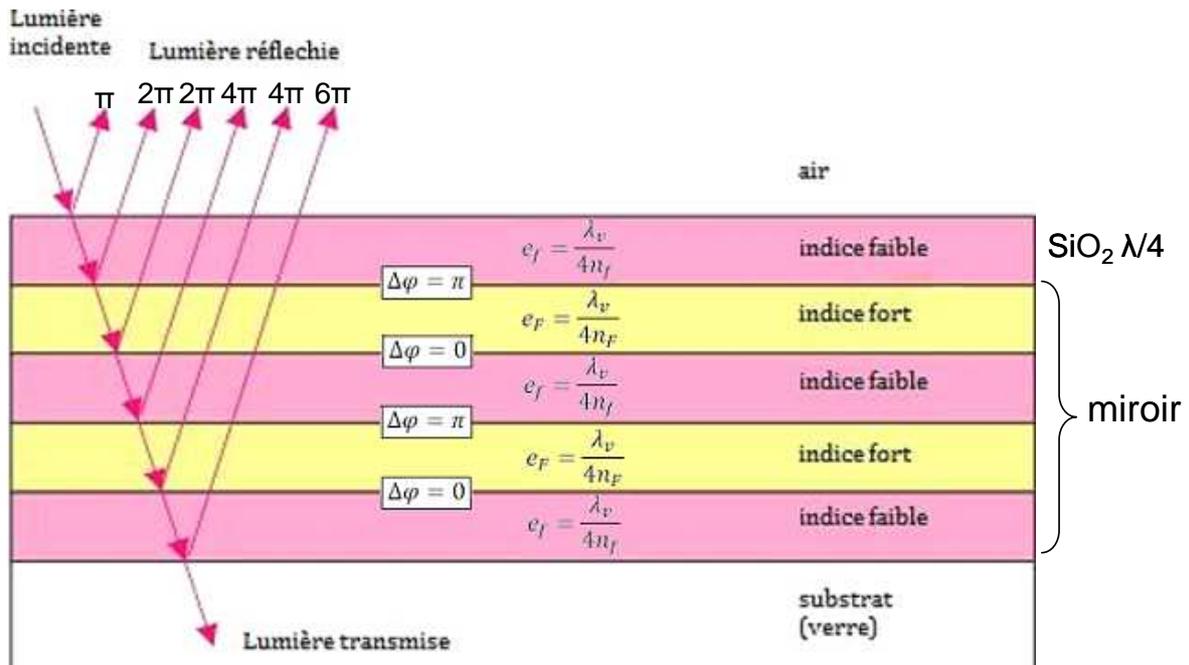


Figure 50 : Architecture d'une lame amplificatrice (couche de SiO₂ sur un miroir de Bragg).

Lors de la réflexion entre une couche d'indice faible et une couche d'indice élevé, le rayon lumineux subit un déphasage de π . Comme lors de son trajet aller-retour dans le miroir le rayon subit, pour chaque couche, un déphasage de π ($\pi/2$ aller ; $\pi/2$ retour), il suffit de commencer le miroir par une couche d'indice fort pour que tous les rayons qui ressortent du miroir en phase soient réfléchis. Pour un nombre suffisant de couches, le coefficient de réflexion est très proche de 1.

Dans le domaine des biocapteurs plusieurs équipes (CEA, Genewave) ont cherché à optimiser la fluorescence en utilisant des miroirs de Bragg, essentiellement basés sur une alternance de couches SiO₂ / TiO₂ ($n_{\text{SiO}_2} = 1,48$ / $n_{\text{TiO}_2} = 2,4$).^{5,38,39}

Dans le cadre de cette thèse, nous avons travaillé en étroite collaboration avec la société Genewave. Nous avons donc décidé d'utiliser leur miroir de Bragg (lame « Amplislide ») qui correspond à une lame de verre sur laquelle 8 couches alternées SiO₂/TiO₂ ont été déposées. La longueur d'onde choisie est $\lambda_{\text{Bragg}} = 612$ nm, ce qui correspond à une valeur moyenne des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission pour les fluorophores Cy3 et Cy5.⁵

Afin d'utiliser la lame « Amplislide » de Genewave dans nos expériences et d'utiliser une chimie de surface contrôlée, nous avons décidé de recouvrir cette lame d'une très fine couche

(5 nm) de $a\text{-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}:\text{H}$. L'épaisseur e de la couche rajoutée induit un déphasage Φ pour les rayons lumineux (équation 7) :

$$\Phi = \frac{2\pi}{\lambda_{\text{Bragg}}} \times 2 \times n_{\text{couche ajoutée}} \times e \quad (7)$$

$$\text{Soit } \Phi = \frac{2\pi}{612} \times 2 \times 2,6 \times 5 = 0,3 \text{ rad}$$

Ce déphasage est très faible par rapport à π , déphasage caractéristique d'une interférence destructive. Plus précisément l'intensité I reçue par le fluorophore lors de l'excitation varie comme

$$I = I_0(1 + \cos(\Phi)), \text{ terme d'interférence à deux ondes.} \quad (8)$$

La perte d'intensité due à l'ajout d'une fine couche de $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x:\text{H}$ est donc d'ordre 2 en Φ , soit 2% par rapport à un miroir de Bragg non modifié. Ceci nous permet aisément d'utiliser cette architecture pour bénéficier d'une chimie contrôlée et d'un gain optique maximal.³⁷

Pour étudier la fluorescence et l'hybridation de ces biocapteurs nous avons utilisé de nouvelles sondes et optimisé les tampons de lavage et d'hybridation.

b) Protocole d'immobilisation des sondes et hybridation

Trois oligonucléotides sondes sont utilisés : la sonde $\text{Cy5-}\overline{\text{ON}}\text{-G}$ [5' $\text{Cy5-AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T-(CH}_2\text{)}_6\text{-NH}_2$ 3'], une sonde non marquée 25-mer [5' $\text{(CH}_2\text{)}_6\text{-NH}_2\text{-AAC-GCC-CAT-CTT-AAA-ATC-GAC-GCC-T}$ 3'] nommée G-ON et la sonde marquée Cy3 [5' $\text{Cy3-AAC-GCC-CAT-CTT-AAA-ATC-GAC-GCC-T-(CH}_2\text{)}_6\text{-NH}_2$ 3'] nommée Cy3-ON-G . Les trois sondes sont diluées à $5 \cdot 10^{-6}$ M ou 10^{-5} M dans 150 mM d'un tampon phosphate contenant 0,01% de SDS à pH 8,5, puis déposées par contact sur la surface activée en utilisant le même robot de dépôt que précédemment. Après dépôt, les sites ester de succinimidyle non amidés sont bloqués avec de l'éthanolamine ($5 \cdot 10^{-2}$ M, pendant 15 min), puis les lames sont rincées dans de l'eau ultrapure (Millipore) et séchées sous un flux d'azote. La surface est alors exposée à une solution de concentration $5 \cdot 10^{-15}$ M, $5 \cdot 10^{-13}$ M, $5 \cdot 10^{-11}$ M ou $5 \cdot 10^{-9}$ M contenant l'oligonucléotide complémentaire des sondes ON-G et Cy3-ON-G 5' Cy5 [$\text{AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T}$ 3'] nommé $\text{Cy5-}\overline{\text{ON}}$ à 42°C pendant 4 heures dans un tampon d'hybridation contenant (2X SSC, 0,1% SDS, 35% formamide, 0,1% de sperme de saumon). Des rinçages post-hybridation de 2 minutes sont

ensuite réalisés, en utilisant 4 tampons (2XSSC + 1% SDS ; 1X SSC +0,1 SDS ; 0,1X SSC et 2,5 X SSC).

Les mesures *ex situ* sont réalisées à chaque étape du protocole décrit ci-dessus avec le scanner à fluorescence (PMT 350 V). La déshybridation est réalisée *in situ* par fusion dans la même chambre dans une solution de 2,5X SSC. La rampe en température est de 1°C par minute de 42°C à 85 °C. Une image de fluorescence (temps d'intégration 1 seconde) a été prise toutes les 30 secondes.

c) Amplification de la fluorescence et limite de détection

La figure 51 montre la fluorescence mesurée sur une lame commerciale et 4 lames « Amplislide » recouvertes de 5 nm de a-Si_{0,8}C_{0,2}:H. La fluorescence a été mesurée avant et après l'étape de lavage. Alors que pour la lame commerciale la fluorescence diminue de ~50% après le lavage, celle sur nos lames à base de silicium amorphe augmente légèrement. L'absence de diminution de la fluorescence montre que l'accrochage covalent des sondes sur silicium est robuste.^{40,41} L'augmentation du signal après lavage pourrait être associée à la disparition de dimères de fluorophores dont la fluorescence peut être modifiée en fréquence ou en intensité. L'intensité des spots marqués après l'étape de lavage correspond à une amplification d'un facteur 100. On remarque aussi la très bonne reproductibilité et l'homogénéité des spots.

Nous avons pu ensuite réaliser 4 hybridations à différentes concentrations (5 fM, 500 fM, 50 pM et 5nM). La figure 52 nous montre qu'un tel système nous permet de détecter une hybridation avec une très faible quantité de sondes complémentaires (5 fM). On remarque cependant que l'intensité de la fluorescence après l'hybridation en fonction de la concentration ne suit pas une isotherme de Langmuir. On pourrait rendre compte de ces résultats en considérant que l'hybridation implique une distribution bimodale d'enthalpies de réaction associée, par exemple, à une distribution des sites sur la surface. L'hybridation ne serait alors pas totale aux très faibles concentrations (première enthalpie de réaction) et il faudrait atteindre un régime de concentrations plus élevées (~5 nM) pour atteindre la seconde enthalpie de réaction et permettre l'hybridation complète des différentes sondes. Ces expériences ont été faites en dehors du laboratoire et nous n'avons pu réaliser une étude plus détaillée notamment pour explorer l'origine d'une éventuelle distribution de réactivité. Cependant nous verrons par la suite que pour d'autres types de détection des résultats similaires sont obtenus et qu'il serait donc important de s'y intéresser plus spécifiquement.

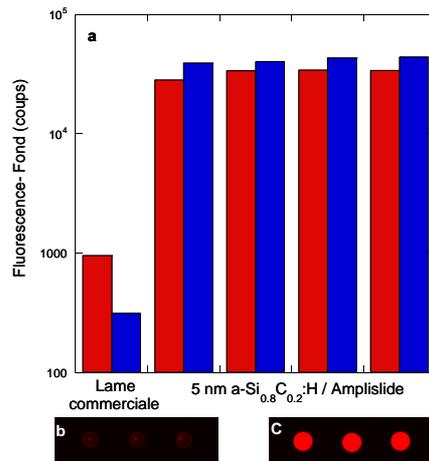


Figure 51 : (a) Diagramme d'intensité de fluorescence des sondes Cy5- $\overline{\text{ON}}\text{-G}$ (10^{-5}M) immobilisées à partir d'une solution à 10^{-5}M sur une lame commerciale et sur 4 lames (5 nm de a-Si_{0.8}C_{0.2}:H/Amplislide) rouge : fluorescence des spots avant lavage ; bleu : fluorescence des spots après lavage. (b) Homogénéité des spots d'une lame commerciale. (c) Homogénéité des spots d'une lame 5 nm de a-Si_{0.8}C_{0.2}:H/Amplislide.

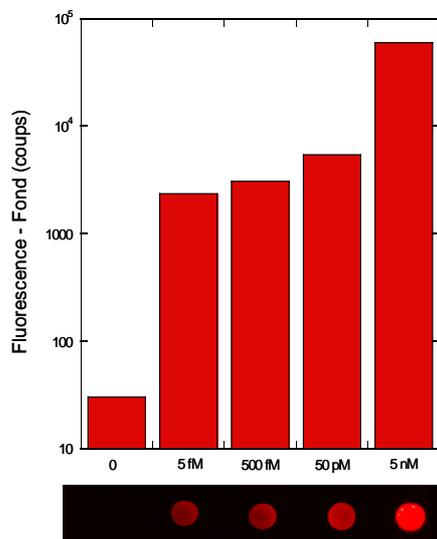


Figure 52 : Diagramme de l'intensité de la fluorescence après hybridation et homogénéité des spots obtenus sur une couche a-Si_{0.8}C_{0.2}:H / Amplislide. Les valeurs des histogrammes correspondent aux valeurs médianes corrigées par les (faibles) valeurs de fluorescence du fond continu mesurées au voisinage des spots. Pour la lame immergée dans le tampon d'hybridation (0 M), l'intensité de fluorescence correspond à la valeur brute mesurée.

F. Différentes utilisations du biocapteur

1. Hybridation in situ

Comme pour les lames avec un réflecteur métallique (aluminium), il est possible de procéder à un suivi de la cinétique en temps réel pour les lames utilisant un miroir de Bragg. Des hybridations in situ ont été réalisées pour pouvoir suivre l'hybridation des cibles avec les sondes en temps réel (figure 53). Bien que l'immobilisation des sondes soit très reproductible et les spots très homogènes (figure 51 c), on note cependant une certaine variabilité de spot à spot lors de l'hybridation in situ (figure 53a). Ceci peut s'expliquer par une agitation non homogène. En effet, dans le système que nous utilisons, le mélange se fait par des ondes acoustiques de surface, ce qui induit différentes vitesses pour le fluide selon la position des spots dans la chambre d'hybridation.⁴² Ainsi pour la suite nous présenterons le signal moyenné obtenu pour 7 spots (figure 53 b).

On peut suivre l'évolution de la fluorescence lors d'un cycle d'hybridation et fusion (de 42° à 85°C par paliers de 1° C dans une solution 2,5X SSC) de différentes sondes (G-ON et Cy3-ON-G) avec la cible complémentaire Cy5- $\overline{\text{ON}}$ à 5 nM. Les expériences ont été faites pour 2 concentrations superficielles de sondes obtenues en utilisant des solutions concentrées à 5 et 10 μM lors de l'immobilisation. Le suivi de la fluorescence de sondes témoins (Cy5- $\overline{\text{ON}}$ -G) nous permet de contrôler qu'il n'y a pas de perte de sondes immobilisées et de mesurer la variation de fluorescence en fonction de la température (figure 53b). Le signal est en effet constant au cours de l'hybridation, l'intensité diminue progressivement lorsque la température augmente puis brusquement lors de la fusion, et remonte lorsque la température diminue (courbe rouge). On note par ailleurs que la fluorescence augmente de façon systématique au début de chaque lavage. L'indice du tampon d'hybridation ($\sim 1,43$) est plus élevé que celui des solutions de rinçage ($\sim 1,33$) ce qui est vraisemblablement la cause de cette augmentation de la fluorescence mesurée.

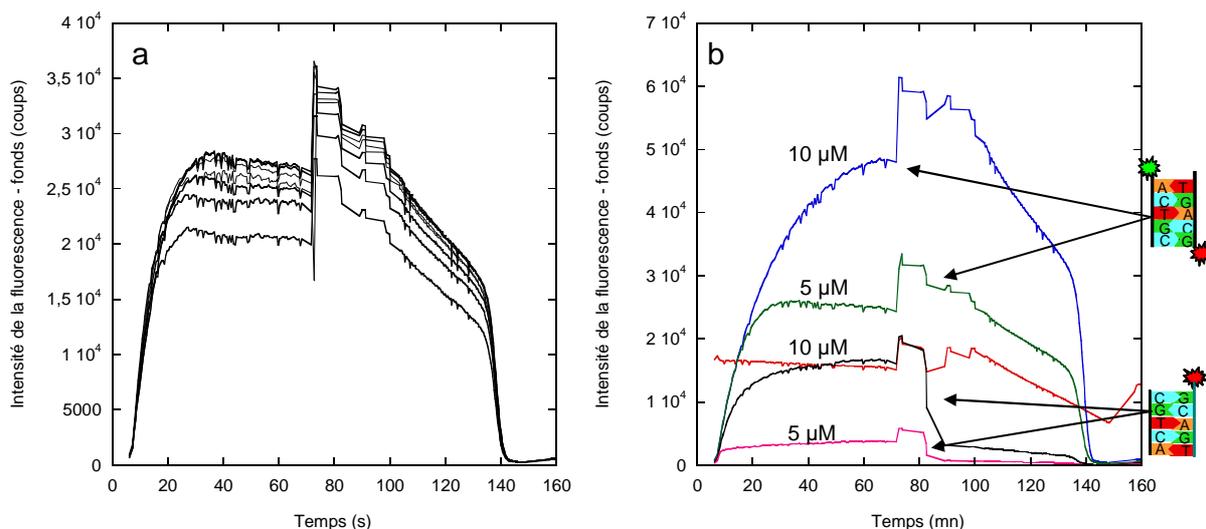


Figure 53 : Cycle d'hybridation et fusion avec les cibles complémentaires Cy5- $\overline{\text{ON}}$ à 5 nM (a) pour 7 spots : sondes Cy3-ON-G 5 μM . (b) bleu : Cy3-ON-G 10 μM ; vert : Cy3-ON-G 5 μM ; noir : G-ON 10 μM ; rose : G-ON 5 μM ; rouge : sondes Cy5- $\overline{\text{ON}}$ -G (non hybridées) 10 μM .

On note sur la figure 53b que l'intensité de fluorescence des sondes Cy5- $\overline{\text{ON}}$ -G marquées Cy5 à 10 μM (courbe rouge) est identique à celle des sondes G-ON spottées à 10 μM et hybridées à 5 nM. Ceci avait déjà été observé avec les lames avec l'aluminium comme réflecteur (figure 47 b et e). Ceci laisserait supposer que toutes les sondes sont appariées avec leurs cibles complémentaires. La constante d'association serait de l'ordre de quelques nM^{-1} .⁴³

On remarque aussi que la fluorescence est plus importante pour les sondes Cy3-ON-G que pour les sondes G-ON, dont le groupe amino-hexyle est accroché à l'autre extrémité du brin. Les brins complémentaires sont donc orientés différemment suivant qu'ils sont hybridés avec les sondes Cy3-ON-G et G-ON. Le fluorophore Cy5 des cibles hybridées avec les sondes G-ON est à une distance environ égale à 15 nm du miroir de Bragg ($\text{a-Si}_{0.8}\text{C}_{0.2}:\text{H} = 5\text{nm}$; Couche organique ≈ 2 nm ; longueur du brin = 8 nm) ; celui des cibles hybridées avec les sondes Cy3-ON-G est à une distance d'environ 7 nm ce qui pourrait expliquer la différence d'intensité mesurée lors des expériences in situ.

Afin de tester la plausibilité de cette hypothèse, une couche de $\text{a-Si}_{0.8}\text{C}_{0.2}:\text{H}$ est déposée en utilisant un cache mobile pendant l'étape de PECVD pour varier de manière continue l'épaisseur de la couche (0 à 250 nm) sur la lame « Amplislide ». L'intensité de la fluorescence mesurée sur les spots par le scanner est montrée sur la figure 54. Ce résultat permet de mesurer la différence de signal observée lorsque la couche de silicium amorphe

carboné varie de 7 à 15 nm. De façon frappante, l'intensité détectée varie appréciablement pour de faibles épaisseurs de la couche de $a\text{-Si}_{0.8}\text{C}_{0.2}\text{:H}$. On observe que le signal est plus faible à 15 nm qu'à 7 nm, d'un facteur 1,3 environ, alors qu'in situ le facteur est ~ 3 . Plusieurs raisons peuvent expliquer que l'accord n'est pas quantitatif. Tout d'abord, puisque sur la lame à épaisseur variable, on mesure la fluorescence sur des spots de $300\ \mu\text{m}$, on moyenne le signal sur une région où l'épaisseur de la couche varie de 1 à 2 nm. Ceci sous-estime certainement la valeur mesurée pour une épaisseur de 7 nm, où le signal passe par un maximum étroit. Par ailleurs, on peut penser que l'intensité ne décroît pas tout à fait de la même façon suivant que le fluorophore est éloigné du réflecteur via une couche diélectrique ou via l'assemblage cibles-sondes en solution. En conclusion, on peut considérer (au moins qualitativement) que la différence d'intensité de fluorescence enregistrée sur les spots G-ON et Cy3-ON-G est en bonne partie imputable à la variation d'éloignement entre le fluorophore et le réflecteur.

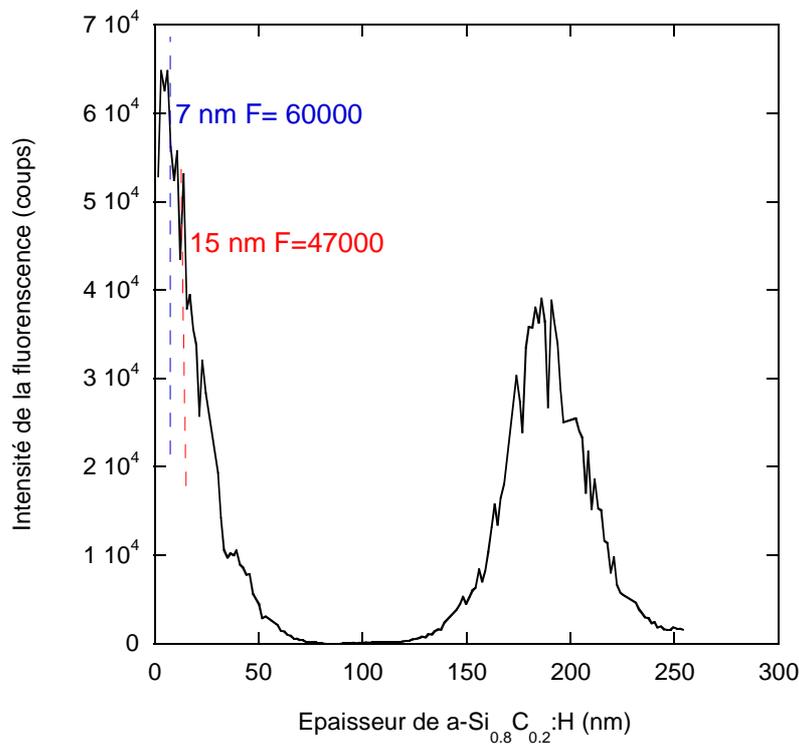


Figure 54 : Intensité de la fluorescence en fonction de l'épaisseur de $a\text{-Si}_{0.8}\text{C}_{0.2}\text{:H}$ mesurée sur des spots de sondes Cy5- $\overline{\text{ON}}$ -G à $10\ \mu\text{M}$. (PMT = 350).

2. Détermination de la température de fusion

Après le cycle de lavage, une fusion est réalisée pour explorer la résistance de la structure à un traitement thermique de nature à déshybrider les sondes et les cibles. Un tel

traitement thermique serait moins contraignant qu'une déshybridation par voie chimique et pourrait permettre plus facilement une cyclisation du processus. Sur des biopuces réalisées sur une couche d'aluminium, la couche d'aluminium n'avait pas résisté au traitement thermique. Nous avons donc procédé à des déshybridations par voie chimique pour étudier la réutilisabilité (figure 48).

La figure 55a correspond à une courbe de fusion de 42°C (température d'hybridation) à 85°C pour les sondes Cy3-ON-G immobilisées à 5 et 10 µM hybridées avec les cibles \overline{ON} -Cy5 à 5 nM. Lors de la rampe en température, on peut aussi mesurer la variation de fluorescence en fonction de la température pour des sondes Cy5- \overline{ON} -G à 10 µM. Ceci nous permet de corriger les courbes de fusion des sondes Cy3-ON-G pour mieux déterminer la température de fusion (figure 55b). On définit la température de fusion d'un duplex (T_m) comme la température à laquelle 50% des doubles brins sont désappariés.⁴⁴ Celle-ci est déterminée par le point d'inflexion de la courbe de fusion, obtenu par l'extremum de la dérivée première (figure 55c). Plusieurs paramètres influent sur la stabilité des duplex d'oligonucléotides et donc sur la mesure de la température de fusion. Parmi eux on peut citer :

- la concentration en sel de la solution dans laquelle se fait la fusion (dans notre cas 250 mM).
- La longueur des oligonucléotides : plus le brin est long plus il est stable.
- La proportion des bases AT et CG. La paire C-G implique 3 liaisons hydrogène contre 2 pour A-T. Un appariement C-G a donc une énergie de dissociation plus grande : 5,5 kcal/mol contre 3,5 kcal/mol pour un appariement A-T. Ainsi, plus une séquence d'ADN est riche en paires G-C, plus il faudra fournir d'énergie pour la dénaturer.

L'oligonucléotide utilisé est un 25-mer, sa température de fusion théorique déterminée par le fournisseur dans une solution saline 50 mM est de 74°C. Comme le montre la figure 55c, cette température est très proche de celle que nous obtenons. La température de fusion pour des sondes immobilisées en surface apparaît donc sensiblement identique à celle mesurée en solution. Dans le détail, on peut toutefois constater de légères différences. Ainsi, pour les cibles hybridées avec les sondes à 5 µM, $T_m = 74,8$ °C, alors que $T_m = 75,9$ °C pour les sondes à 10 µM (figure 55c). Cette différence de température (1°C) suggère que les gênes stériques ont une légère influence sur T_m : il faut fournir plus d'énergie pour séparer les duplex lorsqu'ils sont arrangés de manière dense.

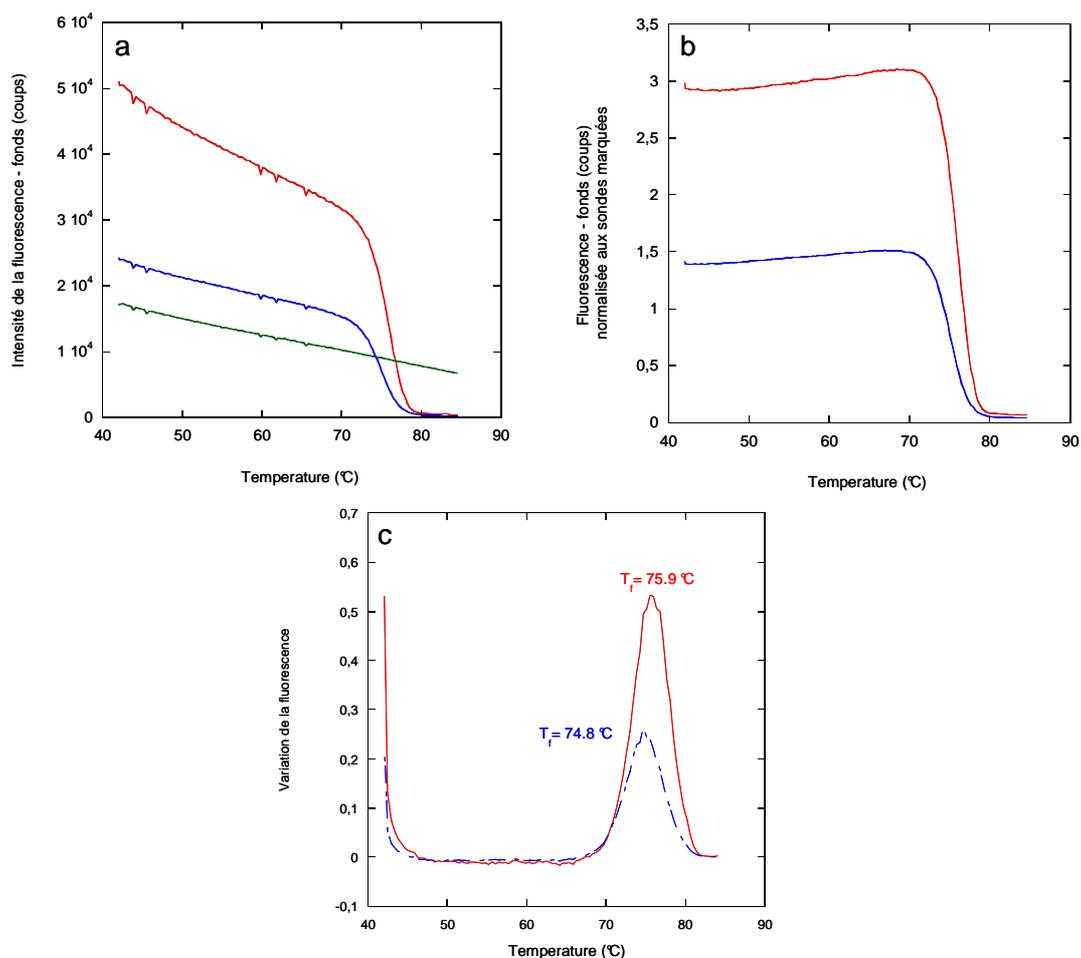


Figure 55 : (a) Courbe de fusion de sondes Cy3-ON-G immobilisées à partir d'une solution à 5μM (bleu) ou à 10 μM (rouge), et hybridées avec les cibles complémentaires Cy5- \overline{ON} à 5 nM; vert : variation de la fluorescence en fonction de la température pour les sondes Cy5- \overline{ON} -G à 10 μM. (b) Courbe de fusion normalisée par rapport à la variation de fluorescence en fonction de la température. (c) courbes dérivées des courbes de fusion corrigées.

3. Etude cinétique

Après une fusion il est possible de procéder à une deuxième hybridation (figure 56 courbe noire). De façon surprenante, l'intensité de fluorescence atteinte au bout d'une heure d'hybridation est plus importante après le second cycle. L'intensité mesurée résulte de l'hybridation de sondes Cy3-ON-G spottées à 5 μM avec des cibles marquées Cy5 à 5 nM. Ainsi il est possible de suivre l'évolution du signal en Cy3 (courbe bleue) et Cy5 (courbe noire). On note que le signal de la Cy3 avant le deuxième cycle (~ 40000 coups) est plus

intense qu'au départ (~ 30000 coups). Cette augmentation a lieu après la fusion de 42° à 85°C et retour à la température d'hybridation à 42°C. Une hypothèse raisonnable serait que le traitement thermique subi lors du premier cycle permet une meilleure organisation des sondes qui se traduit par une augmentation du signal des sondes. Ceci peut expliquer l'augmentation du signal de la Cy5 lors du deuxième cycle d'hybridation.⁴³

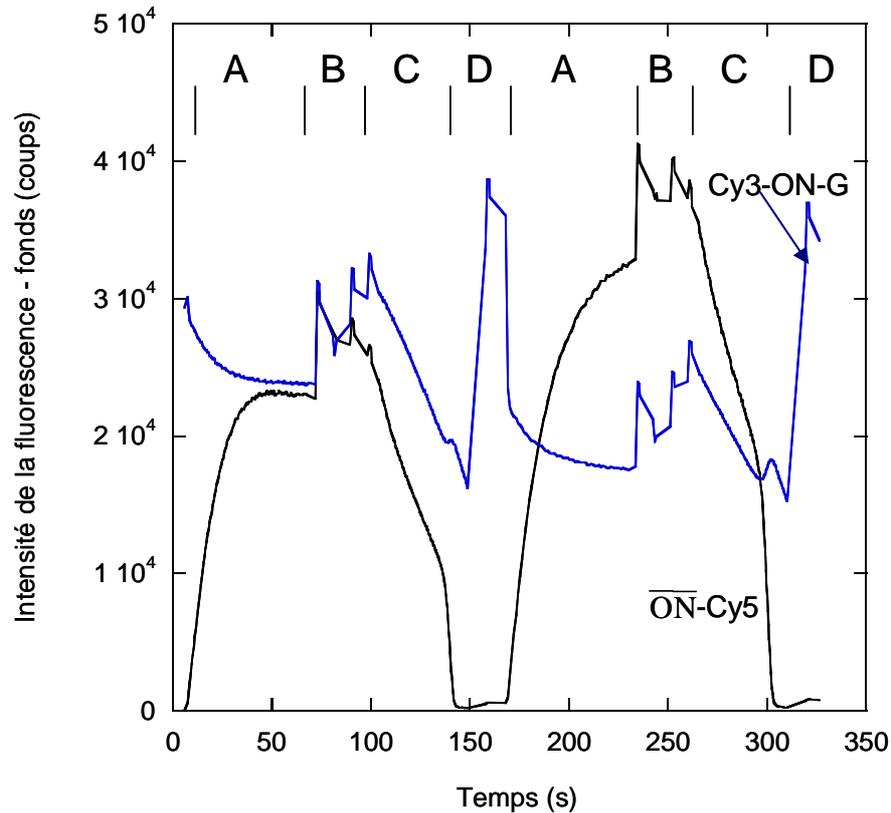


Figure 56 : 2 cycles (hybridation/fusion) ; Hybridation $\overline{\text{ON}}$ -Cy5 à 5 nM (noir) avec les sondes Cy3-ON-G spottées à 5 μ M (bleu). A : Hybridation ; B : Cycles de lavage ; C : Fusion de 42°C à 85°C ; D : Préhybridation à 42 °C.

Le suivi in situ de l'hybridation permet de procéder à des études cinétiques pour mieux comprendre le processus d'hybridation. En effet, sur la figure 56 on remarque que la cinétique d'hybridation n'est pas la même avant et après fusion. Ceci est confirmé par des ajustements (figure 57). Lors de la première hybridation, la cinétique ne suit pas une loi exponentielle et n'est donc pas une cinétique de premier ordre simple (figure 57 courbe bleue). Par contre, l'ajustement de la courbe d'hybridation du second cycle avec une exponentielle nous montre que la cinétique est ici une cinétique du premier ordre. Les temps caractéristiques sont tout de même très proches (13 minutes pour le premier cycle ; 19 minutes pour le second).

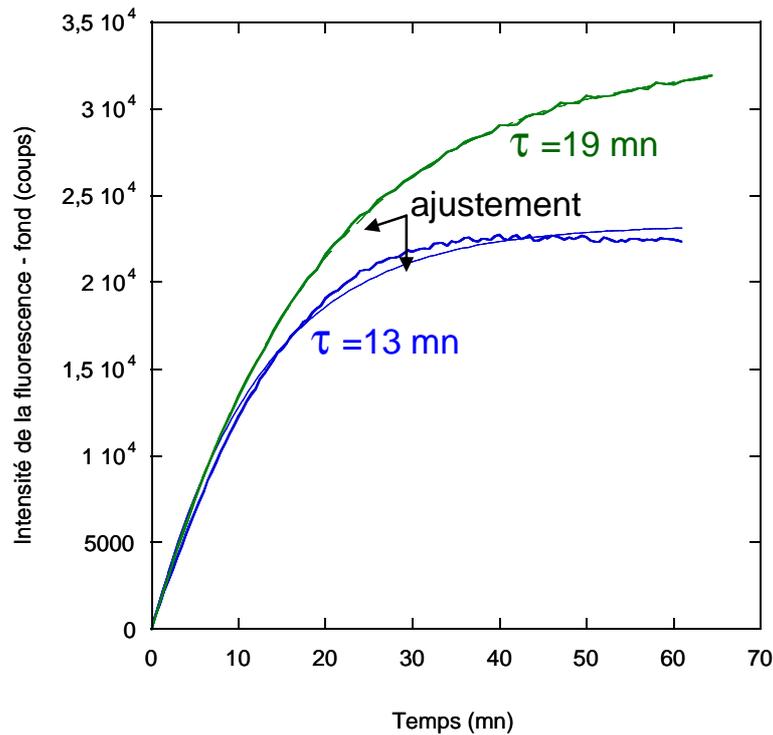


Figure 57 : Ajustement des courbes d'hybridation de la figure 56. (bleu) première hybridation ; (vert) seconde hybridation.

La différence observée dans les cinétiques peut être reliée à l'orientation des molécules. En effet nous avons vu, figure 56, qu'il était possible que les sondes soient mieux orientées après le premier cycle, ce qui favoriserait une cinétique d'hybridation du premier ordre. Par ailleurs, on note que la différence est aussi observée sur la figure 58. L'hybridation de sondes à 5 μM marquées Cy3 (vert) ou non (rose) ne suit pas une loi exponentielle, par contre pour des sondes de 10 μM marquées Cy3 (noir) ou non (bleu) la cinétique suit une loi exponentielle. Quelle que soit la concentration des sondes, le diamètre des spots est identique (300 μm). Plus la concentration des sondes est importante, plus la chance que les brins ont d'être ordonnés est grande, ce qui leur permet d'être mieux orientés et donc de favoriser l'hybridation. On peut comprendre ainsi la différence observée selon la concentration des sondes.

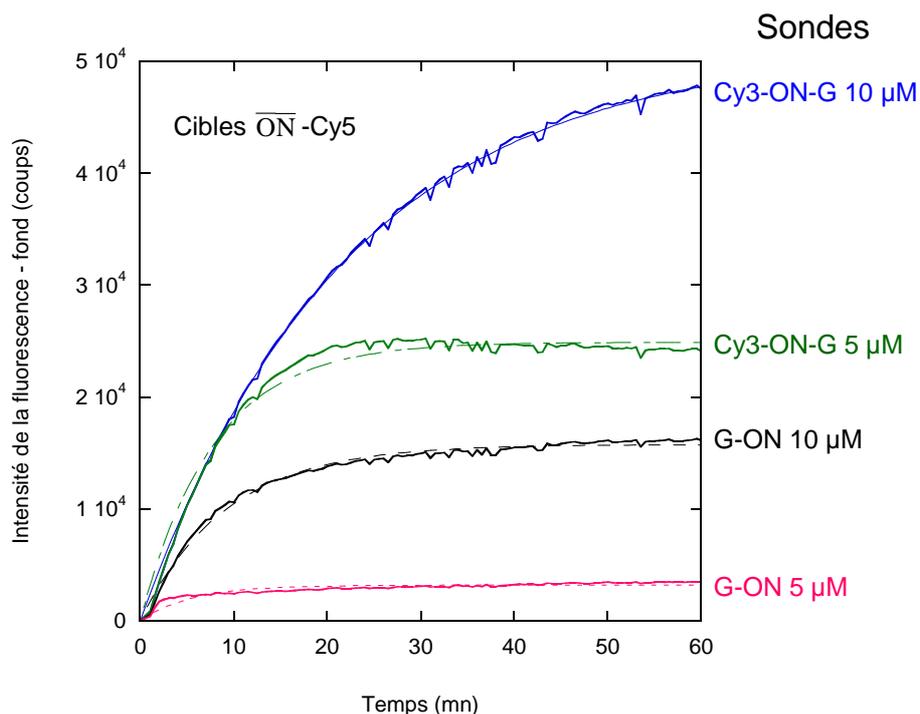


Figure 58 : ajustements des courbes d'hybridation de la figure 53b. Hybridation $\overline{\text{ON}}$ 5nM avec différentes sondes.

Au vu de la complexité des cinétiques d'hybridation en fonction de la concentration des sondes, nous avons choisi d'étudier l'influence de la concentration superficielle des sondes sans changer la concentration des solutions utilisées lors de l'immobilisation.

4. Fluorescence en fonction de la dilution des sondes

Sur une couche $\alpha\text{-Si}_{0.8}\text{C}_{0.2}:\text{H}$, le greffage de groupes carboxydécyles par hydrosilylation conduit à une concentration superficielle de $\sim 8 \cdot 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ pour les chaînes greffées.⁴⁵ Même si la concentration en sondes immobilisées à la surface est certainement bien inférieure à cette valeur, celle-ci est probablement plus élevée que la quantité de sondes immobilisées sur des lames commerciales ($\sim 10^{12} \text{ cm}^{-2}$).⁴⁶ Il paraît donc naturel de chercher à ajuster la densité des fonctions fournissant des sites d'accrochage pour les sondes afin d'éviter d'éventuelles contraintes stériques qui pourraient gêner l'hybridation et rendre encore plus complexe l'étude cinétique.

Pour faire varier la quantité de sondes nous avons procédé à l'hydrosilylation comme décrit dans le premier chapitre en utilisant un mélange acide undécylénique/1-décène (figure 59).³⁶

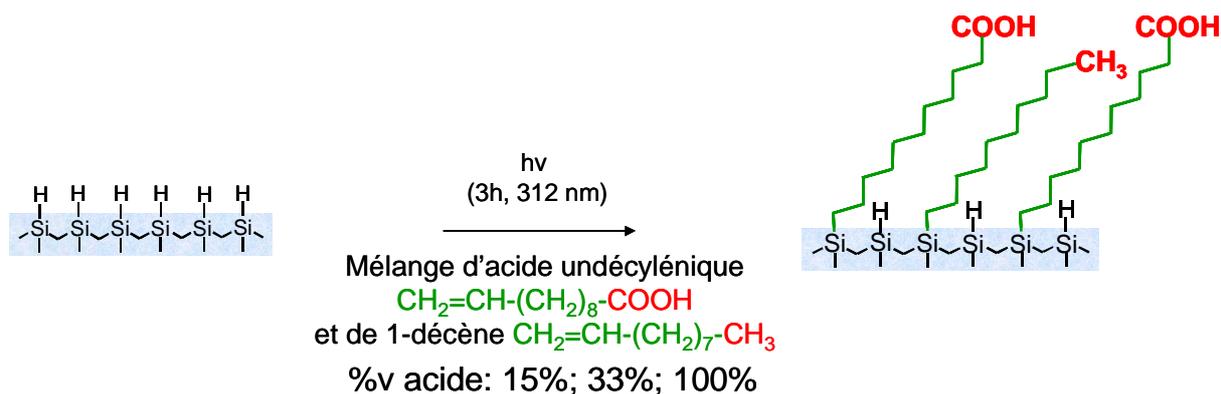


Figure 59 : Schéma du procédé de fabrication des couches à terminaisons mixtes carboxyles et méthyles.

Nous avons adopté le mode opératoire précédemment décrit pour l'immobilisation des sondes. La figure 60 montre la cinétique d'un cycle hybridation/fusion pour trois concentrations différentes en groupements acides (15 %v, 33 %v, 100%v). L'hybridation correspond à la reconnaissance de cibles Cy5- $\overline{\text{ON}}$ 5 nM avec des sondes Cy3-ON-G 5 μM . S'il n'y avait aucune gêne stérique à l'immobilisation et à l'hybridation, on s'attendrait à obtenir une fluorescence d'autant plus importante que la concentration en acide sur la surface initiale est élevée. Or, la surface 15% est la surface qui permet d'obtenir une intensité de fluorescence plus importante. La dilution permet une meilleure fixation des cibles sur les sondes.

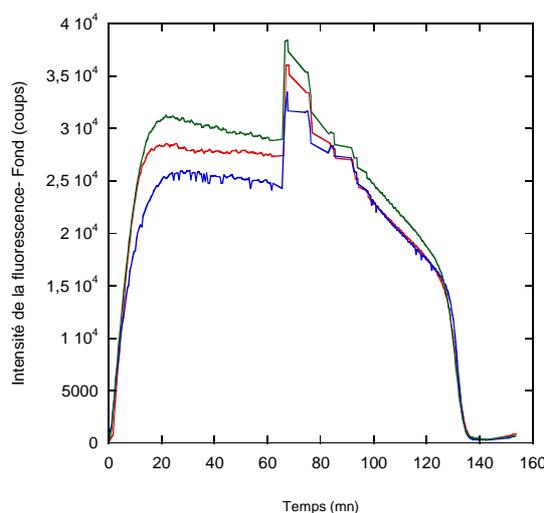


Figure 60 : Hybridation de cibles Cy5- $\overline{\text{ON}}$ à 5 nM avec les sondes Cy3-ON-G 5 μM ; (bleu) surfaces acides 100%v ; (rouge) 33%v ; (vert) 15%.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré comment à partir de couches minces à base de silicium amorphe carboné il est possible de bénéficier de l'apport de la chimie de greffage sur silicium bien contrôlée pour élaborer des puces à ADN. Nous avons mis au point une nouvelle architecture de biocapteurs qui permet de combiner à la fois les avantages de l'amplification optique du signal de la fluorescence et de l'accrochage covalent de brins d'ADN via les liaisons Si-C très robustes. La fluorescence peut être jusqu'à 100 fois plus intense en comparaison avec une lame commerciale selon le type de réflecteur utilisé. Il devient alors possible de détecter l'hybridation de très faibles quantités de cibles (5 fM).

De plus, cette très bonne sensibilité et spécificité ont permis l'étude in situ et en temps réel de la réaction d'hybridation, permettant de s'intéresser aux cinétiques de la réaction. Le caractère réutilisable et donc stable de nos biocapteurs a pu être démontré par la réalisation de plusieurs cycles d'hybridation/déshybridation sur des lames où le réflecteur était une couche d'aluminium. Par ailleurs nous avons pu déterminer les températures de fusion pour des biocapteurs où une couche de $\alpha\text{-Si}_{0.8}\text{C}_{0.2}:\text{H}$ est déposée sur un miroir de Bragg.

Nous avons aussi montré que les surfaces acides diluées présentent l'avantage de limiter les gênes stériques et fournissent donc une meilleure reconnaissance entre les cibles et les sondes.

L'architecture proposée présente l'avantage de pouvoir faire de la double détection Cy3 et Cy5. De plus le procédé de fabrication de nos biocapteurs est tout à fait approprié pour une production à grande échelle en vue d'une commercialisation.⁴⁷

Les biocapteurs développés présentent aussi l'avantage de servir de support pour une analyse détaillée de la réaction d'hybridation qui pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme d'hybridation en fonction de plusieurs paramètres tels que les gênes stériques, l'orientation des sondes, et les traitements thermiques. Les résultats obtenus montrent que l'architecture développée permet de disposer d'un outil efficace pour ce type de détection mais que les phénomènes complexes en jeu sur la surface mériteraient une étude plus approfondie.