

# Biocapteurs à base de nanostructures pour une double détection par résonance de plasmons de surface localisés et fluorescence

Introduction .....	151
A. Plasmons de surface localisés .....	152
1. Intérêt des nanoparticules .....	152
2. Théorie des plasmons de surface localisés .....	153
3. Biocapteurs LSPR .....	154
B. Utilisation des couches minces $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ .....	155
1. Modes opératoires .....	155
a) Evaporation des nanoparticules .....	155
b) Dépôt de silicium amorphe .....	155
c) Fonctionnalisation de surface .....	156
d) Immobilisation des sondes et hybridation .....	156
e) Mesure .....	157
2. Dépôt de couches minces $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ .....	157
a) Caractérisations des nanoparticules .....	157
b) Caractéristiques des plasmons de surface localisés .....	158
c) Influence de l'épaisseur de $a\text{-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}\text{:H}$ .....	160
d) Caractérisation de surfaces fonctionnalisées .....	161
3. Etude de l'hybridation .....	163
C. Etude par fluorescence .....	165
1. Fluorescence couplée aux plasmons de surface localisés .....	165
2. Influence de la composition des nanoparticules .....	166
3. Exaltation de la fluorescence .....	169
a) Influence de l'épaisseur de $a\text{-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}\text{:H}$ .....	169
b) Influence de l'épaisseur et sensibilité .....	170
4. Cinétique d'hybridation .....	173
Conclusion .....	177
Bibliographie .....	178

« La science ne consiste pas seulement à savoir ce qu'on doit ou peut faire, mais aussi à savoir ce qu'on pourrait faire quand bien même on ne doit pas le faire. »

U. Eco



## Introduction

Des progrès remarquables ont été réalisés ces dernières années pour le développement des biocapteurs à résonance de plasmon de surface afin d'étudier les interactions de biomolécules.<sup>1,2</sup> Comme montré au chapitre précédent, la SPR est considérée comme une technique de référence dans le domaine des biocapteurs, particulièrement pour l'étude de cinétiques de réaction et la détermination de constantes thermodynamiques, par exemple la constante de dissociation. Quand les plasmons de surface sont confinés dans des nanoparticules métalliques, des modes optiques localisés sont observés permettant un champ électromagnétique élevé à l'interface nanoparticule/milieu diélectrique.<sup>1-6</sup> Comme pour les plasmons de surface, les plasmons de surface localisés (LSPR) sont sensibles au changement local d'indice de réfraction qui varie lors d'une reconnaissance moléculaire entre des sondes et les cibles complémentaires. Pour la plupart des capteurs LSPR utilisant des nanoparticules d'or, l'accrochage des sondes sur les capteurs LSPR se fait principalement via les liaisons Au-S en utilisant la chimie des thiols.<sup>7</sup> Alternativement le dépôt d'une couche mince sur les nanoparticules permet d'adapter différentes techniques de fonctionnalisation, par exemple l'accrochage via des liaisons électrostatiques d'espèces chargées négativement avec des amines greffées sur une couche de silice déposée à la surface de nanoparticules d'or.<sup>8-10</sup>

Bien que le champ électrique localisé décroisse sur une distance de l'ordre de la taille de la nanoparticule,<sup>11,12</sup> plusieurs groupes ont montré récemment qu'il était possible d'optimiser la sensibilité du capteur en y intercalant un espaceur, comme la silice.<sup>9,13,14</sup>

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à l'utilisation des alliages silicium-carbone amorphes comme espaceur. Nous montrerons l'intérêt de pouvoir contrôler la sensibilité du capteur LSPR via un contrôle de la chimie de surface. Enfin nous étudierons le couplage fluorescence / plasmons de surface localisés, pour une étude de la réaction d'hybridation par fluorescence à partir d'un substrat LSPR.

# A. Plasmons de surface localisés

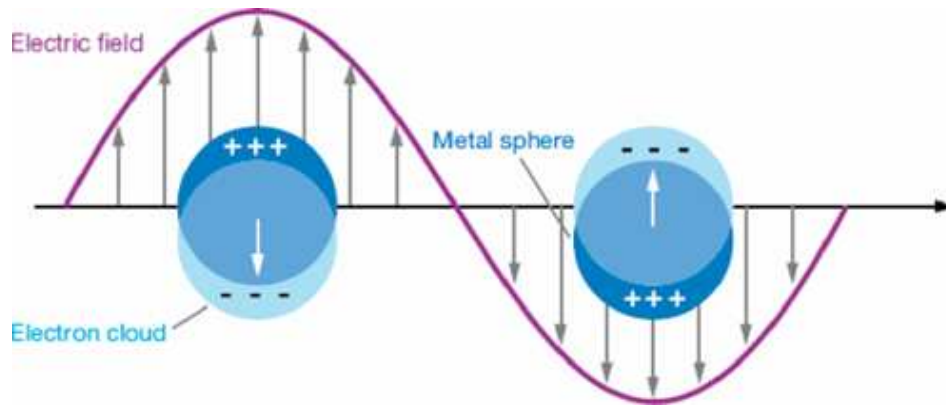
## 1. Intérêt des nanoparticules

Depuis la fin des années 90, les nanotechnologies ont connu un réel essor. Les nanoparticules, dont les propriétés optiques dépendent fortement de la taille, trouvent cependant leurs premières applications il y a plusieurs siècles. Un exemple connu de tous est l'utilisation de nanoparticules pour les vitraux des églises du Moyen-Age ou encore la coupe de Lycurgus qui apparaît verte en réflexion et rouge en transmission (400 après J.-C.) (figure 90). Aujourd'hui les nanoparticules sont utilisées dans différents domaines, de la photonique à la médecine.<sup>5</sup>



**Figure 90 : Coupe de Lycurgus (exposée au British Museum à Londres). Verte en réflexion et rouge en transmission.**

En 1908, Gustav Mie a montré que les propriétés optiques des nanoparticules métalliques reposent sur l'oscillation collective des électrons de conduction induite par interaction avec un rayonnement électromagnétique (figure 91).<sup>15</sup> Les modes d'oscillation des charges sont nommés plasmons de surface localisés. Les charges étant soumises à une force de rappel qui les ramène toujours vers le centre de la particule, leur oscillation est résonnante pour une certaine fréquence d'excitation.<sup>6,16</sup> L'impossibilité de créer des excitations propagatives de l'ensemble des nanoparticules disjointes relâche la condition de couplage existante en SPR classique (chapitre 3), il y a donc moins de contraintes expérimentales en LSPR ce qui rend l'utilisation des nanoparticules intéressante.



**Figure 91 : Action d'un champ électromagnétique sur le plasmon d'une nanoparticule métallique montrant le déplacement du nuage électronique par rapport au centre de la nanoparticule.<sup>6</sup>**

## 2. Théorie des plasmons de surface localisés

Gustav Mie a développé en 1908 une théorie explicitant les solutions au problème de l'interaction de sphères métalliques isolées avec la lumière. Ces solutions ont une expression simple dans le cadre plus restreint de l'approximation de Rayleigh où le diamètre des nanoparticules est très petit devant la longueur d'onde, car on peut alors considérer que le champ électrique est uniforme dans la sphère. Le coefficient d'absorption d'un ensemble de nanoparticules avec une concentration  $N_A$  s'exprime alors de la manière suivante :

$$A = \frac{24\pi^2 N_A a^3 \varepsilon_{medium}^{3/2}}{\lambda} \left[ \frac{\varepsilon''}{(\varepsilon' + 2\varepsilon_{medium})^2 + \varepsilon''^2} \right] \quad (18)$$

Où  $a$  est le rayon de la particule,  $\varepsilon_{medium}$  la constante diélectrique du milieu extérieur et  $\varepsilon'$  et  $\varepsilon''$  les parties réelle et imaginaire de la fonction diélectrique du métal constituant la nanoparticule. L'absorbance est maximale quand le dénominateur tend vers zéro.<sup>17</sup> Le phénomène de résonance apparaît donc à la fréquence électromagnétique  $\omega$  pour laquelle  $\varepsilon' = -2\varepsilon_{medium}$  et  $\varepsilon''$  très petit, déterminant ainsi l'existence de plasmons de surface localisés. Seuls les métaux possédant des électrons libres (essentiellement l'or et l'argent, le cuivre et les métaux alcalins) possèdent des résonances plasmons dans le spectre visible présentant ainsi de telles couleurs (figure 92).<sup>5,17</sup> La fréquence de résonance plasmon dépend de plusieurs paramètres comme la composition, ou la taille des particules. Elle dépend aussi de la

forme des nanoparticules, bien que cela n'apparaisse pas explicitement dans l'équation (18) obtenue pour le cas de nanoparticules sphériques.

Dans le cas de substrats pour lesquels la densité des nanoparticules est importante et où la longueur d'onde est grande devant la taille des nanoparticules et la distance les séparant, nous pouvons considérer que nous sommes à la limite électrostatique. Les nanoparticules sont en interaction les unes avec les autres, ce qui résulte en la concentration de champs électriques intenses entre les nanoparticules, appelés parfois « points chauds ».

A la résonance, une forte extinction de la lumière est observée, associée à un intense champ autour de la particule, dont l'intensité décroît rapidement avec la distance. Une molécule placée à proximité de la nanoparticule métallique verra dans ce cas un champ avec une intensité un à deux ordres de grandeur supérieure par rapport à celle du champ incident.

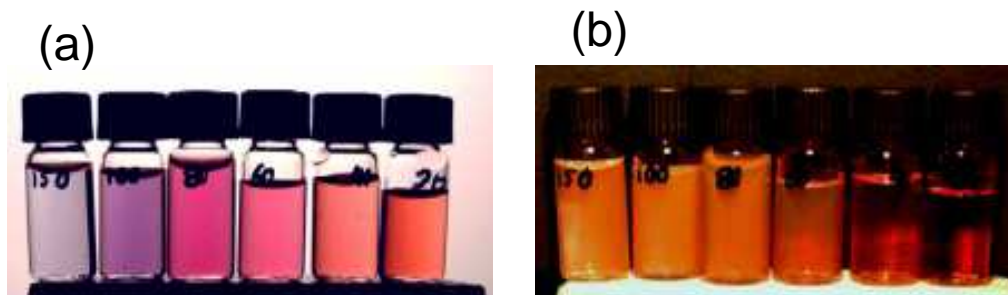


Figure 92 : Photographie en lumière blanche, en transmission (a) et en réflexion (b), de solutions colloïdales contenant des nanoparticules d'or de différentes tailles : de gauche à droite (150 nm, 100 nm, 80 nm, 60 nm, 40 nm, 20 nm).

### 3. Biocapteurs LSPR

Au début des années 2000, le groupe de Van Duyne a montré qu'il était possible d'utiliser des substrats à base de nanoparticules pour l'étude de réactions biologiques grâce à l'évolution du pic LSPR ( $\lambda_{\max}$ ).<sup>4</sup> En effet, comme le montre la figure 93a le signal dépend fortement de l'indice de réfraction à la surface du substrat. L'évolution du pic LSPR pour des nanoparticules d'argent dans différents solvants permet de déterminer la sensibilité du capteur grâce à la pente de la droite de  $\lambda_{\max}$  en fonction de l'indice de réfraction.<sup>4,17</sup> De nombreuses équipes se sont alors intéressées à la réaction d'hybridation et ont montré qu'il était possible d'obtenir une sensibilité plus élevée que pour les capteurs SPR.<sup>4,9,17</sup>

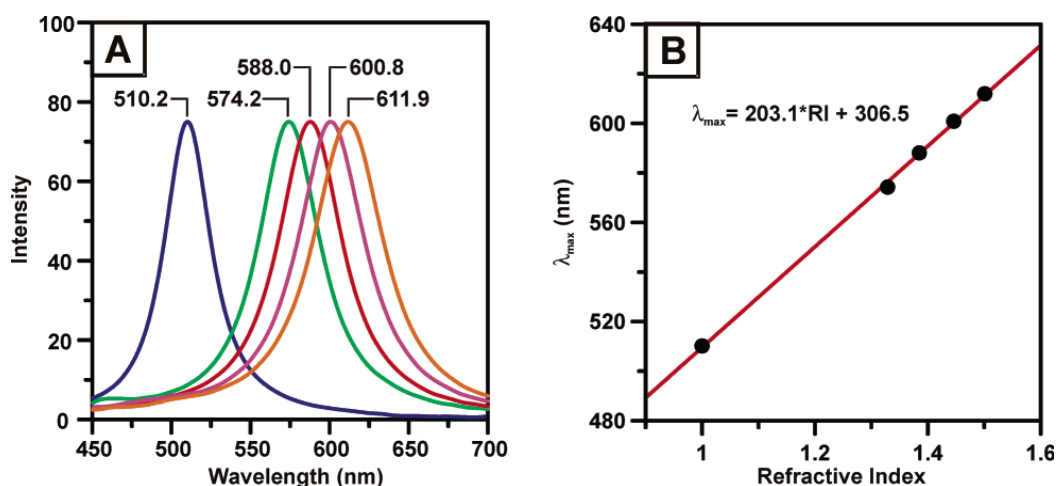


Figure 93 : (A) Spectre d'absorbance de nanoparticules d'argent immergées dans différents milieux de gauche à droite (azote, méthanol, 1-propanol, chloroforme et benzène) ; (B) Variation de  $\lambda_{max}$  en fonction de l'indice de réfraction du solvant.<sup>17</sup>

## B. Utilisation des couches minces a-Si<sub>1-x</sub>C<sub>x</sub>:H

### 1. Modes opératoires

#### a) Evaporation des nanoparticules

Les lames de verre sont dans un premier temps lavées aux ultrasons dans l'isopropanol et l'acétone. Après un rinçage soigneux à l'eau MilliQ, elles sont séchées sous azote et introduites dans la chambre d'évaporation (MEB 550S Plassys).

Les nanoparticules (Np) sont déposées sur des lames de verre par évaporation thermique d'un film mince métallique (par exemple un film d'or de 4 nm), suivie d'un démouillage du film par un traitement thermique rapide : un recuit à 500°C pendant 60 secondes sous un flux d'azote grâce au four Jipelec Jet First 100.<sup>13,18</sup>

#### b) Dépôt de silicium amorphe

Des films de silicium amorphe carboné sont déposés comme aux chapitres 2 et 3 par PECVD en régime « basse puissance », le taux final en carbone (C) dans le matériau étant ajusté en variant la proportion de méthane dans le mélange gazeux ( $[\text{CH}_4]/\{[\text{CH}_4]+[\text{SiH}_4]\}$ ).<sup>19,20</sup>

## c) Fonctionnalisation de surface

La couche mince  $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$  est ensuite fonctionnalisée suivant les procédures précédemment décrites dans les chapitres précédents. En bref, la surface est hydrogénée par des vapeurs de HF (15 s) puis une monocouche d'acide undécylénique est greffée par photochimie (3 h ; 312 nm). Les sites acides sont ensuite activés par traitement dans un mélange équimolaire EDC/NHS à 5 mM. Pour l'étude par infrarouge, la réaction d'amidation a été étudiée avec l'éthanolamine à  $5 \cdot 10^{-2}$  M pendant 15 minutes à température ambiante.

## d) Immobilisation des sondes et hybridation

### (1) Etude LSPR

En partant de surfaces activées, la sonde G-ON (non marquée 25-mer [5'  $\text{NH}_2$ - $(\text{CH}_2)_6$ -AAC-GCC-CAT-CTT-AAA-ATC-GAC-GCC-T 3']) est diluée à  $10^{-5}$  M dans 150 mM d'un tampon phosphate contenant 0,01% de SDS à pH 8,5. L'immobilisation se fait ensuite entre lame et lamelle en déposant 20  $\mu\text{L}$  par  $\text{cm}^{-2}$  pendant 14 à 16 h pour l'analyse. Après dépôt, les sites ester de succinimidyle non amidés sont bloqués avec de l'éthanolamine ( $5 \cdot 10^{-2}$  M, pendant 15 min), puis dans de l'eau ultrapure (Millipore) et les lames sont séchées sous un flux d'azote.

La surface est alors hybridée avec des solutions de différentes concentrations de 50 nM à 500 nM contenant l'oligonucléotide  $\overline{\text{ON}}$  (complémentaire des sondes ON-G) 5' [AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T 3'] à température ambiante pendant 40 minutes dans un tampon d'hybridation contenant (2X SSC, 0,1% SDS, 35% formamide, 0,1% de sperme de saumon).

### (2) Etude en Fluorescence

Les sondes G-ON,  $\text{Cy}5\text{-}\overline{\text{ON}}\text{-G}$  (5' [Cy5-AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T- $(\text{CH}_2)_6$ - $\text{NH}_2$ ]3') et  $\text{Cy}3\text{-ON-G}$  (5' [Cy3-AAC-GCC-CAT-CTT-AAA-ATC-GAC-GCC-T- $(\text{CH}_2)_6$ - $\text{NH}_2$ ]3') sont déposées dans les mêmes conditions ( $10^{-5}$  M, tampon phosphate 0,01% SDS) par le robot Microgrid Biorobotics II sur des lames activées.

La surface est alors hybridée avec des solutions de concentrations de 5 fM, 500 fM, 50 pM et 5 nM contenant l'oligonucléotide  $\text{Cy}5\text{-}\overline{\text{ON}}$ , complémentaire des sondes G-ON et  $\text{Cy}3\text{-ON-G}$ , (5' [Cy5-AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T 3']) à température



ambiante pendant 40 minutes dans un tampon d'hybridation contenant (2X SSC, 0,1% SDS, 35% formamide, 0,1% de sperme de saumon). De la même manière, la séquence Cy5- $\overline{ON}$ '' 5'Cy5 [AGG-CGT-GCA-TTT-TAA-GTA-GGG-CGT-T 3'] contenant 4 mésappariements a été utilisée.

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) lorsque les hybridations sont réalisées dans une chambre d'hybridation ou Hyblive (voir chapitre 2).

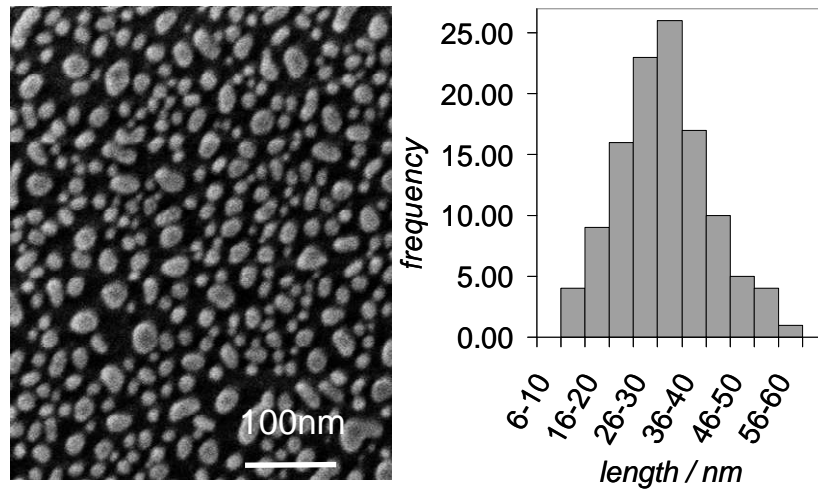
### e) Mesure

Les mesures LSPR ont été faites grâce au spectrophotomètre UV-Vis Cary 50 scan pour des longueurs d'onde comprises entre 400 et 800 nm. Les mesures de fluorescence ont été faites comme au chapitre 2 en utilisant le scanner Axon instrumentation personal 4100A pour mesurer l'intensité après immobilisation des sondes et après leur hybridation avec les cibles en chambre d'hybridation (Tecan). Pour l'étude in-situ de l'hybridation, on utilise à nouveau l'appareil Hyblive.

## 2. Dépôt de couches minces a-Si<sub>1-x</sub>C<sub>x</sub>:H

### a) Caractérisations des nanoparticules

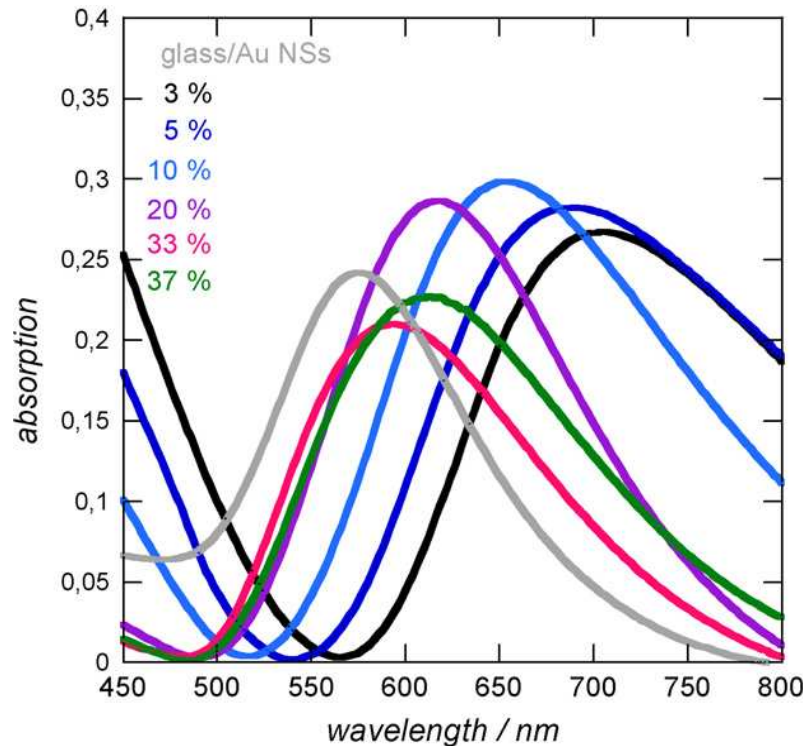
La figure 94 montre une image MEB (microscopie électronique à balayage) de la surface obtenue après évaporation et recuit à 500°C d'un film d'or (4 nm). Cela conduit à la formation de nanostructures en or (AuNp) avec une taille moyenne de 33 nm.



**Figure 94: Image en microscopie électronique à balayage (MEB) typique de la structure LSPR formée et histogramme de distribution des tailles des nanoparticules.<sup>18</sup>**

### b) Caractéristiques des plasmons de surface localisés

La figure 95 (courbe grise) montre que les nanostructures présentent un maximum d'absorption à  $\lambda_{\max} = 575$  nm, une absorption  $I_{\max}$  de 0,24 et une largeur à mi-hauteur (fwhm) de 120 nm. La reproductibilité des lames est évaluée en mesurant le signal LSPR sur 8 lames différentes. Nous avons mesuré un écart-type de 2 nm pour  $\lambda_{\max}$  et 0,02 unité d'absorbance pour  $I_{\max}$ . Ces substrats présentent des bandes d'extinction fortes dans le spectre de transmission UV-Visible dues à l'excitation des plasmons de surface localisés (LSPR) sur les nanostructures d'or.



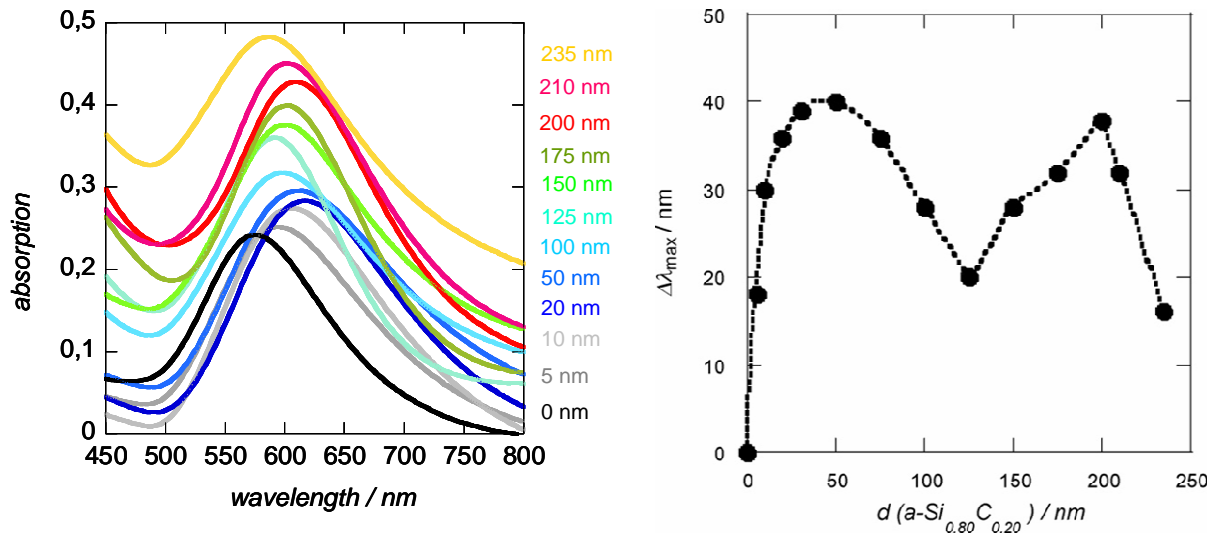
**Figure 95 : Spectre de transmission UV-Visible (UV-Vis) dans l'air d'une interface verre/nanoparticules d'or nue ou revêtu d'un film de 20 nm d'épaisseur d'a-Si<sub>1-x</sub>C<sub>x</sub>:H, x variant de 3 à 37%.<sup>18</sup>**

Nous avons ensuite étudié l'influence du dépôt de films de a-Si<sub>1-x</sub>C<sub>x</sub>:H sur les propriétés LSPR. Pour faire cette étude, des films de a-Si<sub>1-x</sub>C<sub>x</sub>:H de 20 nm d'épaisseur présentant des taux de carbone allant de 3 % à 37 % sont déposés et l'effet du dépôt sur le spectre de transmission UV-Visible de l'interface est ensuite recherché (Figure 95). On remarque que le dépôt des films de a-Si<sub>1-x</sub>C<sub>x</sub>:H déplace les bandes LSPR vers les longueurs d'onde plus élevées tout en augmentant leur largeur à mi-hauteur.

La Figure 95 montre qu'un faible taux de carbone résulte en un déplacement plus fort. En outre, une augmentation du taux de carbone dans le film de a-Si<sub>1-x</sub>C<sub>x</sub>:H au-delà de 20 % diminue l'absorption et augmente la largeur à mi-hauteur. Ces comportements sont liés à un changement dans les parties réelle (principalement pour  $\lambda_{max}$ ) et imaginaire (principalement pour la largeur à mi-hauteur) des indices de réfraction des alliages de a-Si<sub>1-x</sub>C<sub>x</sub>:H formés. Ceux-ci varient respectivement entre  $n=4,2-0,07i$  et  $n=1,81-1,07 \times 10^{-3}i$  pour a-Si:H et pour a-Si<sub>0,63</sub>C<sub>0,37</sub>:H. Le film de a-Si<sub>1-x</sub>C<sub>x</sub>:H avec un taux de carbone de 20 % permet d'obtenir une structure avec des caractéristiques spectrales favorables en termes de sensibilité et d'intensité d'absorption : maximum d'absorption situé à  $\lambda_{max} = 614$  nm, absorption au pic de 0,29 et largeur à mi-hauteur de 150 nm.

### c) Influence de l'épaisseur de a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>:H

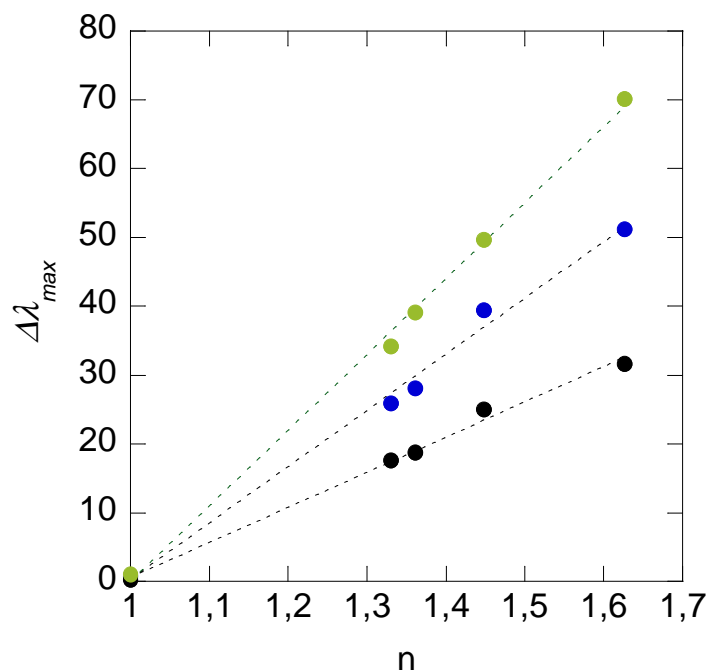
L'influence de l'épaisseur de a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>:H sur le décalage du maximum d'absorption LSPR est maintenant examinée. La Figure 96 montre les changements dans le spectre de transmission UV-Visible lorsque les nanoparticules d'or sont revêtues d'un film de a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>:H d'épaisseur croissante. Le spectre représentant le décalage de  $\lambda_{\max}$  en fonction de l'épaisseur du film de a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>:H montre un comportement oscillatoire avec une période de 125 nm et une amplitude  $\Delta\lambda_{\max}$  de 40 nm (Figure 96B). Un comportement oscillatoire similaire a été rapporté récemment pour les nanoparticules d'or revêtues d'un mince film de SiO<sub>x</sub> dans l'eau.<sup>9</sup> Le dépôt d'un film de a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>:H de 5 nm entraîne un déplacement de  $\lambda_{\max}$  de 20 nm vers les grandes longueurs d'onde par rapport à des nanostructures en or non revêtues.



**Figure 96 : (A) Spectre de transmission UV-Vis dans l'air d'une interface verre / nanoparticules d'or recouverte de couches de a-Si<sub>0,8</sub>C<sub>0,2</sub>:H d'épaisseur croissante ; (B) Variation du déplacement du maximum de  $\lambda_{\max}$  (LSPR) en fonction de l'épaisseur en nm de la couche superposée de a-Si<sub>0,8</sub>C<sub>0,2</sub>:H.**

Comme dans le cas des structures SPR étudiées au chapitre précédent, la sensibilité a été déterminée par immersion de ces différentes structures dans des solvants d'indices de réfraction différents (figure 97). Un changement de  $\lambda_{\max}$  de 80 nm par unité d'indice de réfraction est observé pour un film de a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>:H de 20 nm, tandis qu'un changement de 112 nm par unité d'indice de réfraction est observé pour une couche de 5 nm d'épaisseur. Cette sensibilité est en bon accord avec des travaux déjà publiés notamment par Haynes et

Van Duyne.<sup>21</sup> L'utilisation des interfaces revêtues de films de 150-200 nm est possible pour des études de détection à longue distance, avec un décalage  $\lambda_{\max}$  de 50 nm par unité d'indice de réfraction.



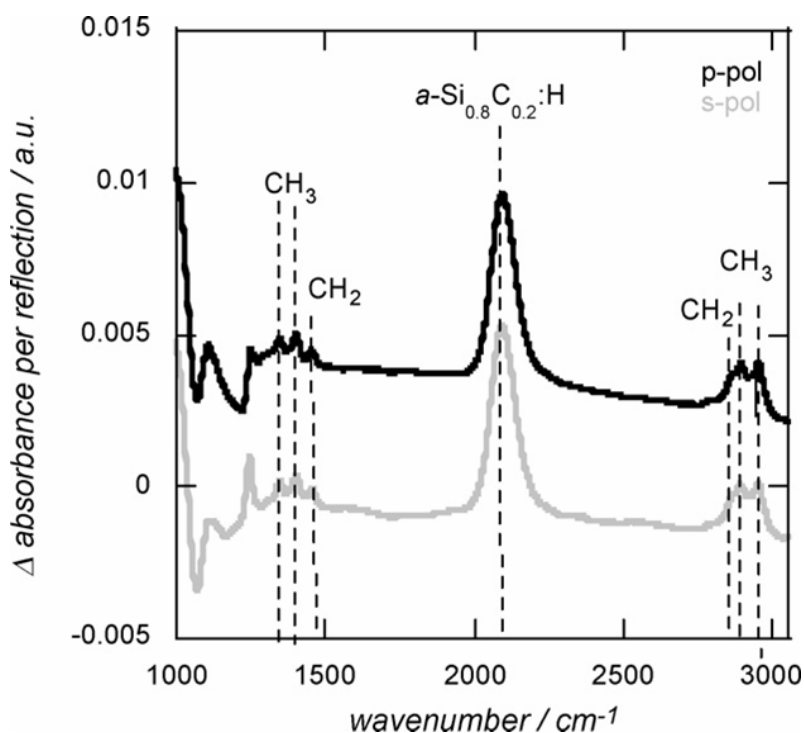
**Figure 97 : Variation de  $\lambda_{\max}$  en fonction de l'indice de réfraction de différents solvants pour différents substrats verre / AuNp recouverts de 5 nm (vert), 20 nm (bleu) and 150 nm (noir) de  $a\text{-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}\text{:H}$ .**

La stabilité chimique des interfaces LSPR revêtues d'un film de  $a\text{-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}\text{:H}$  de 5 nm a été testée par le suivi du signal LSPR des interfaces immergées dans l'eau, l'éthanol et un tampon phosphate à température ambiante. Aucun changement dans le signal LSPR n'a été observé lors de ces immersions successives de 2 h chacune à température ambiante. Ces substrats peuvent donc supporter les étapes de fonctionnalisation et sont stables durant les mesures cinétiques.

#### d) Caractérisation de surfaces fonctionnalisées

Les substrats LSPR sont ensuite fonctionnalisés pour permettre l'immobilisation de molécules biologiques. C'est dans le cadre de cette étude que nous avons pu remarquer que la couche mince  $a\text{-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}\text{:H}$  était particulièrement intéressante pour bénéficier de bonnes propriétés optiques et qu'elle nous permettait de contrôler la chimie.<sup>18</sup> Aussi avons-nous décidé de caractériser la couche par infrarouge (figure 98) et d'étudier les différentes étapes

de fonctionnalisation par la suite. La figure 98 montre le spectre ATR FT-IR (Absorption Infrarouge par Transformée de Fourier en réflexion totale atténuée) d'un film de  $a\text{-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}\text{:H}$  déposé sur un prisme ATR de silicium référencé au spectre du prisme de silicium cristallin nu. Le pic intense à  $2100\text{ cm}^{-1}$  confirme la présence d'une grande quantité de liaisons silicium-hydrogène dans le matériau. Les bandes détectées à  $2890\text{ cm}^{-1}$  et  $2953\text{ cm}^{-1}$  indiquent que le carbone dans le film est majoritairement sous forme de  $\text{CH}_3$ .<sup>19,20</sup>



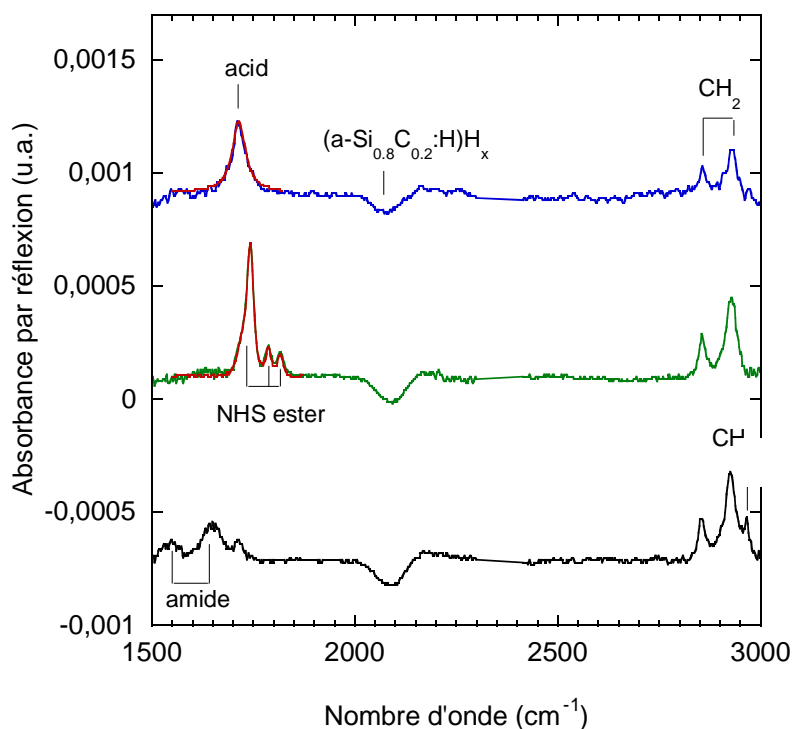
**Figure 98 :** Spectre ATR-FTIR en polarisations p et s d'une couche mince de  $a\text{-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}\text{:H}$  (20 nm) déposée sur un prisme de silicium. La référence est le prisme de silicium cristallin « nu » avant dépôt.

La figure 99 montre les différentes étapes de fonctionnalisation de la couche  $a\text{-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}\text{:H}$ . Les bandes vibrationnelles  $\text{C=O}$  à  $1711\text{ cm}^{-1}$  et  $\text{CH}_2$  à  $2855\text{ cm}^{-1}$  et  $2930\text{ cm}^{-1}$  permettent de caractériser le greffage de groupes carboxydécyles sur la couche mince  $a\text{-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}\text{:H}$ . L'intégration de l'aire des pics de la bande  $\text{C=O}$  permet de déterminer la densité moléculaire des groupes carboxydécyles liés :  $N = 7,8 \cdot 10^{13}\text{ cm}^{-2}$  (courbe bleue). Cette valeur, inférieure à celle du silicium cristallin ( $N = 2,5 \cdot 10^{14}\text{ cm}^{-2}$ ),<sup>22,23</sup> est probablement due à une rugosité de la surface et à la moindre disponibilité des sites d'accrochages en surface liée à la présence de groupes méthyles au sein du matériau.

La fonction acide est par la suite convertie en un groupement ester dans une solution de EDC / NHS (N-éthyl-N'-[3-diméthylaminopropyl] carbodiimide/N-hydroxy succinimide) à 5

mM / 5 mM. Comme précédemment, on observe la formation des esters activés par la disparition complète du pic caractéristique de l'acide à  $1711\text{ cm}^{-1}$  et l'apparition de nouveaux pics à  $1744$ ,  $1788$  et  $1816\text{ cm}^{-1}$  associés à l'ester de succinimidyle.<sup>24,25</sup> La quantité des groupements ester formés est estimée à  $N = 7,2 \cdot 10^{13}\text{ mol cm}^{-2}$ . Ceci correspond à une efficacité d'activation de l'ordre de 90%.

Le spectre ATR-FTIR de la surface activée par l'ester après réaction avec l'éthanolamine, représenté sur la figure 99 (courbe noire), montre l'apparition de pics à  $1651$  et  $1551\text{ cm}^{-1}$  des groupes amides. La quantité de groupements amides formés est  $N = 7,2 \cdot 10^{13}\text{ cm}^{-2}$ . Le pic carboxyle restant à  $1711\text{ cm}^{-1}$  révèle la présence des acides non activés.<sup>26</sup>

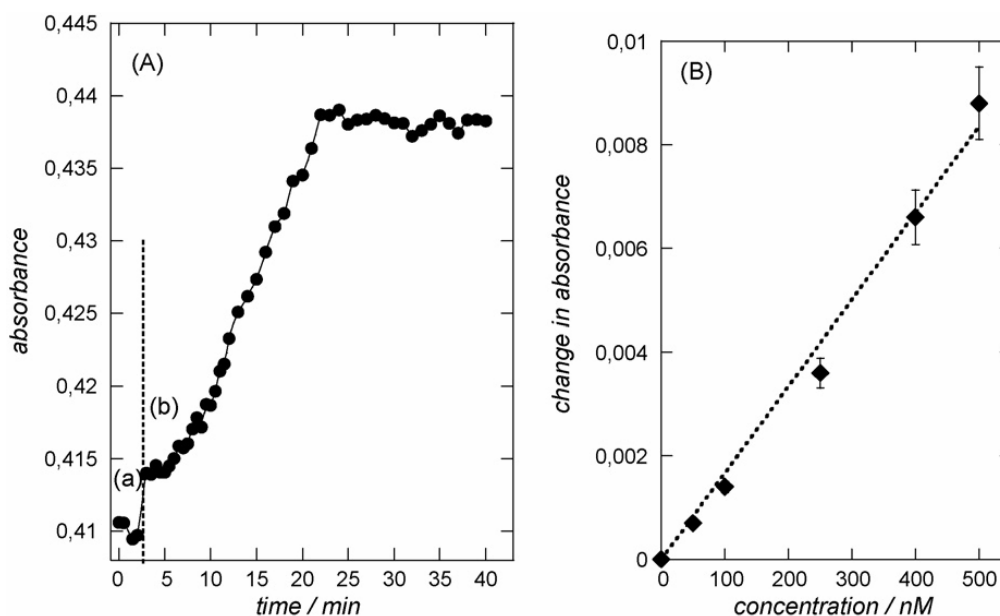


**Figure 99 : Spectre ATR-FTIR de a-Si<sub>0,8</sub>C<sub>0,2</sub>H modifié avec l'acide undécylénique (bleu), réaction avec EDC/NHS (vert), et amidation avec l'éthanolamine (noir) ; Les courbes rouges correspondent aux courbes ajustées pour calculer les concentrations superficielles des groupes fonctionnels liés à la surface.**

### 3. Etude de l'hybridation

Les interfaces (5 nm a-Si<sub>0,8</sub>C<sub>0,2</sub>H / Au Np) sont suffisamment optimisées pour permettre de suivre l'hybridation. Pour cela nous suivons par des mesures in situ et en temps

réel l'évolution de l'absorption à une longueur d'onde donnée (figure 100). Les mesures sont réalisées dans un premier temps dans le tampon de préhybridation puis la cinétique de la réaction est mesurée en introduisant la solution contenant les brins d'ADN complémentaires. La figure 100 (A) montre une cinétique mesurée avec des brins complémentaires à 500 nM à une longueur d'onde donnée (595 nm). On peut par ailleurs suivre la cinétique en regardant le décalage et la variation d'absorbance à  $\lambda_{\max}$ . La figure 100 B montre la variation d'absorbance à  $\lambda_{\max}$  mesurée après hybridation avec différentes concentrations en cibles. Cela nous permet de pouvoir déterminer la limite de détection (dans les conditions conventionnelles de détermination de celle-ci, quantifiée selon le changement d'absorbance à la longueur d'onde  $\lambda_{\max}$  déterminée en l'absence de cibles dans la solution d'hybridation) qui est ici environ égale à 40 nM. Cette limite est légèrement plus faible que celle mesurée par Szunerits et coll. pour un substrat SiOx/AuNp/ verre, égale à 60 nM.<sup>9</sup> Il est cependant clair que pour bénéficier de la sensibilité maximale, il vaudrait mieux se placer au point d'inflexion de la couche d'absorption plutôt qu'à son maximum. Dans ces conditions, la limite de détection pratique peut être sensiblement inférieure à la valeur ci-dessus. On voit d'ailleurs en comparant les figures 100a et 100b que la sensibilité est bien meilleure si on regarde la variation d'absorbance à une longueur d'onde fixe différente de  $\lambda_{\max}$ .



**Figure 100 : (A) Evolution de l'absorption (signal LSPR) à 595 nm au cours de l'hybridation sonde/cible des oligos sondes G-ON 10  $\mu$ M et des oligomères cibles  $\overline{\text{ON}}$  à 500 nM mesurée in situ par spectrométrie optique avant (a) et après introduction des cibles (b); (B) variation de l'absorbance au niveau de  $\lambda_{\max}$ .**



## C. Etude par fluorescence

### 1. Fluorescence couplée aux plasmons de surface localisés

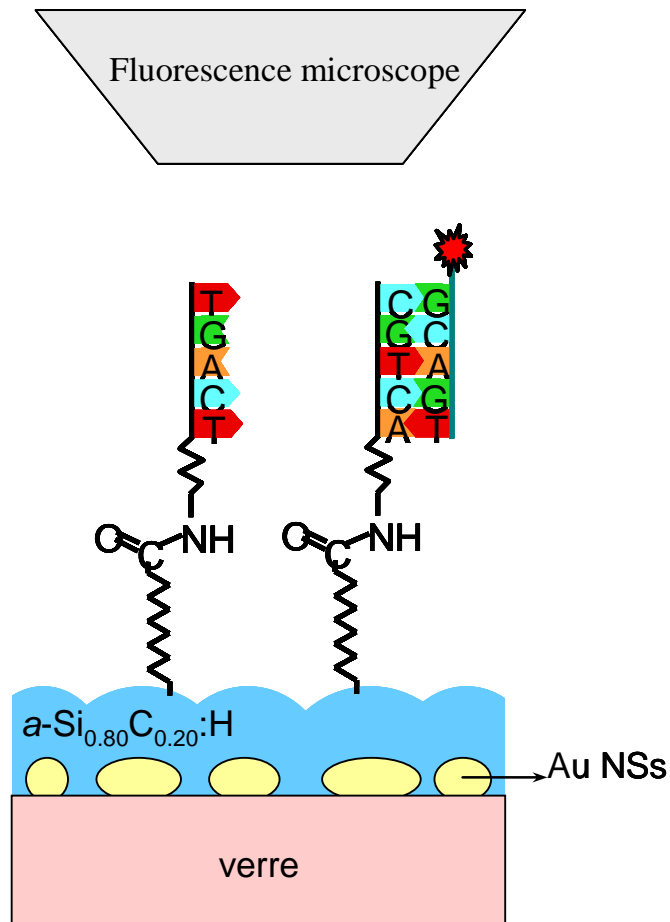
Dans la partie précédente, nous avons montré comment les propriétés optiques des nanoparticules permettent l'élaboration d'un capteur très sensible en suivant le signal LSPR. Nous nous intéresserons désormais à l'exaltation de fluorescence par les nanoparticules.<sup>18</sup>

L'étude de la fluorescence est bien plus complexe sur les nanoparticules que sur les films plans où le phénomène de recombinaison non radiative (« quenching ») est particulièrement gênant pour une distance métal/fluorophore inférieure à 20 nm.<sup>27</sup> Le champ électrique autour de la nanoparticule, résultant du couplage de la lumière incidente et des plasmons de surface localisés, est très intense et entraîne une augmentation de la fluorescence et une diminution du temps de vie du fluorophore.<sup>28</sup> Le facteur d'exaltation dépend fortement de la taille, de la répartition, de la forme, de la longueur d'onde de résonance des nanoparticules, de la distance métal / fluorophore mais aussi de la longueur d'onde d'émission et d'excitation des fluorophores.<sup>1,16,29-32</sup> La relaxation non radiative est le principal canal de désexcitation lorsque la distance est inférieure à 5 nm.<sup>33-35</sup> Au-delà de cette distance, le canal radiatif redevient appréciable et la diminution du temps de vie persiste encore, conduisant à un maximum d'exaltation à une distance environ égale à 10 nm.<sup>36</sup>

Un compromis pour contrôler la distance est d'utiliser un espaceur. Ceci permet aussi de limiter l'instabilité de la morphologie des nanoparticules et des propriétés optiques lors de l'immersion des substrats dans différents solvants et lors du séchage.<sup>37-39</sup> Il faut utiliser pour cela une couche mince semi-transparente ou transparente.<sup>9,37,40,41</sup> Cette couche peut aussi permettre de contrôler l'accrochage des biomolécules. Nous avons en effet montré dans la partie précédente que nous pouvons contrôler la chimie de surface sur des couches minces (5 nm) d'alliages silicium-carbone amorphes et que la fluorescence est même amplifiée grâce au contrôle de la chimie (chapitre 2).<sup>18</sup> L'objet de cette partie est de voir comment le substrat LSPR à base de silicium peut aussi être utilisé avantageusement pour des études en fluorescence, notamment d'hybridation de brins d'ADN.

## 2. Influence de la composition des nanoparticules

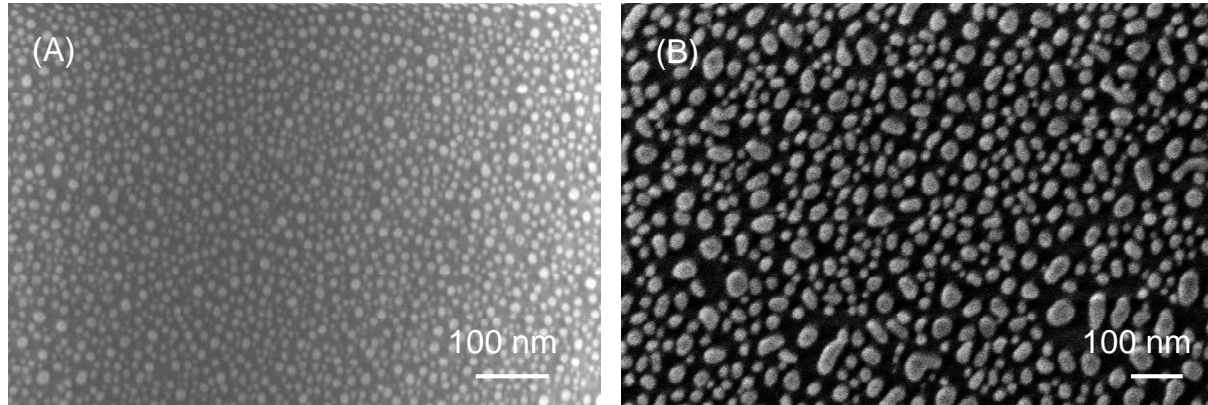
La figure 101 montre une représentation schématique du capteur LSPR utilisé pour cette étude. Il consiste en une répartition homogène de nanoparticules (or, argent ou or/argent) recouvertes de silicium amorphe carboné (20%), sur lequel sont greffées les sondes. On détecte l'appariement des cibles marquées avec un fluorophore.



**Figure 101: Représentation schématique du capteur LSPR**

Dans le cadre des capteurs SPR, on a remarqué que l'argent est plus sensible que l'or. Qu'en est-il ici ? On peut aussi songer à utiliser des alliages argent-or pour ajuster les propriétés du signal LSPR. A partir des images MEB, comme celles de la figure 102, la morphologie des nanoparticules d'argent (a) ou d'or (b) peut être déterminée. Par exemple pour les nanoparticules d'or obtenues par évaporation d'un film d'or de 4 nm suivie d'un traitement thermique à 500°C pendant 1 minute, le diamètre moyen est  $d = 25 \pm 8$  nm avec une distance entre les particules  $a = 16 \pm 8$  nm et une hauteur  $h = 13,6 \pm 3$  nm.<sup>13</sup> Ceci

conduit à une valeur  $d/h = 1,8 \pm 0,2$ . Dans le cas de l'argent les nanoparticules sont formées à partir d'un film de 2 nm. Le diamètre et les dimensions sont plus faibles  $d = 12 \pm 6$  nm et  $h = 5,5 \pm 1,7$  nm respectivement, conduisant à une valeur  $d/h = 2,1 \pm 0,4$  comparable à celle de l'or.<sup>21</sup>

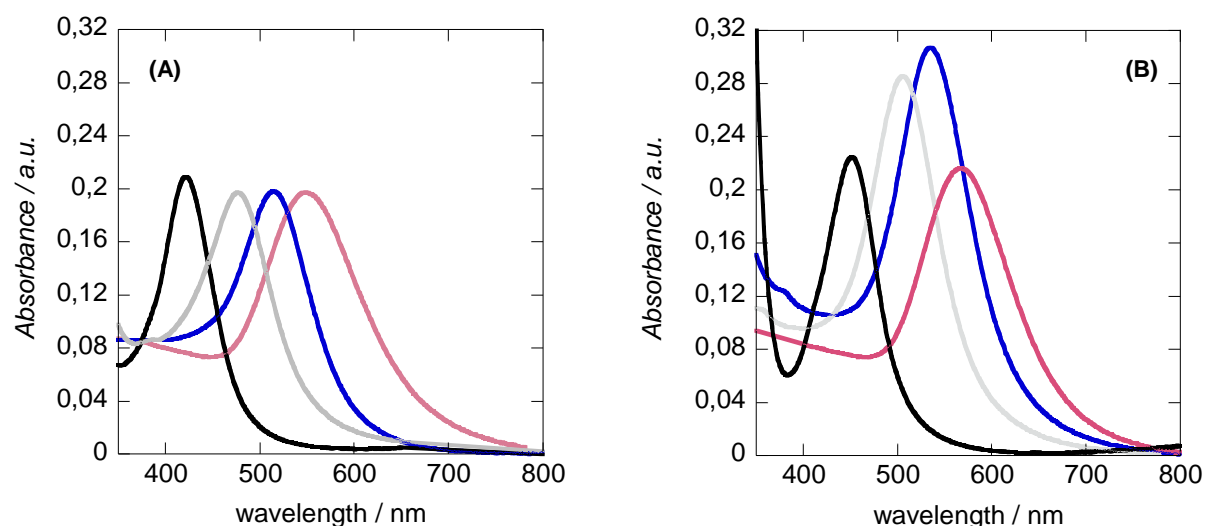


**Figure 102: Images MEB de nanoparticules après évaporation de films de 2 nm d'argent (A) et 4 nm d'or (B) et recuit à 500°C.**

Les spectres d'absorption de tels substrats (couche mince après recuit) sont représentés figure 103 pour les nanoparticules d'or. Le maximum d'absorption est atteint pour une longueur d'onde  $\lambda_{\max}$  égale à 548 nm alors que pour les nanoparticules d'argent le pic est à 421 nm. Cette dernière valeur est typique de celles obtenues pour des nanoparticules d'argent sphériques, généralement comprises entre 400 et 500 nm. On remarque que le pic correspondant aux nanoparticules d'argent présente une largeur à mi-hauteur (fwhm=53 nm) plus faible que celle pour l'or (100 nm). Ces résultats sont bien connus et s'expliquent par la plus faible valeur de la partie imaginaire de la fonction diélectrique.<sup>42</sup> D'autres substrats ont été préparés par évaporation de couches minces d'or et d'argent de différentes épaisseurs et recuit. La deuxième colonne du tableau 7 indique les épaisseurs des couches d'argent puis d'or évaporées pour réaliser les différentes structures étudiées. Sur la figure 103a on constate que les spectres des différentes structures ne présentent qu'une seule bande plasmon. Si des nanoparticules distinctes d'or et d'argent s'étaient formées sur la surface lors du recuit, on aurait obtenu deux bandes plasmons distinctes. Cela indique qu'on observe ici au contraire la formation d'un alliage Au/Ag.<sup>43,44</sup> On note que plus l'épaisseur d'or évaporée initialement est élevée, plus le pic se décale vers les grandes longueurs d'ondes.<sup>43</sup> Cela donne un moyen d'ajuster les propriétés optiques des nanoparticules de métaux nobles.

Pour stabiliser leurs morphologies et leurs propriétés optiques, les nanoparticules sont recouvertes d'une couche a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>H. Nous avons montré dans la première partie que cette

structure permet d'obtenir un substrat sensible en LSPR. La figure 103b montre les spectres d'absorption des différentes structures après dépôt de 5 nm de a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>H. On note que la présence de la couche entraîne une augmentation de l'intensité d'absorbance et de la largeur à mi-hauteur. Les résultats sont synthétisés dans le tableau 7.



**Figure 103 : Spectre d'absorption de différents substrats (verre / métal après recuit) (A) avant (B) après dépôt de 5 nm de a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>H : 2nm Ag (noir) ; 2nm Ag/2nm Au (gris) ; 1 nm Ag/4 nmAu (bleu) et 4 nm Au (rouge).**

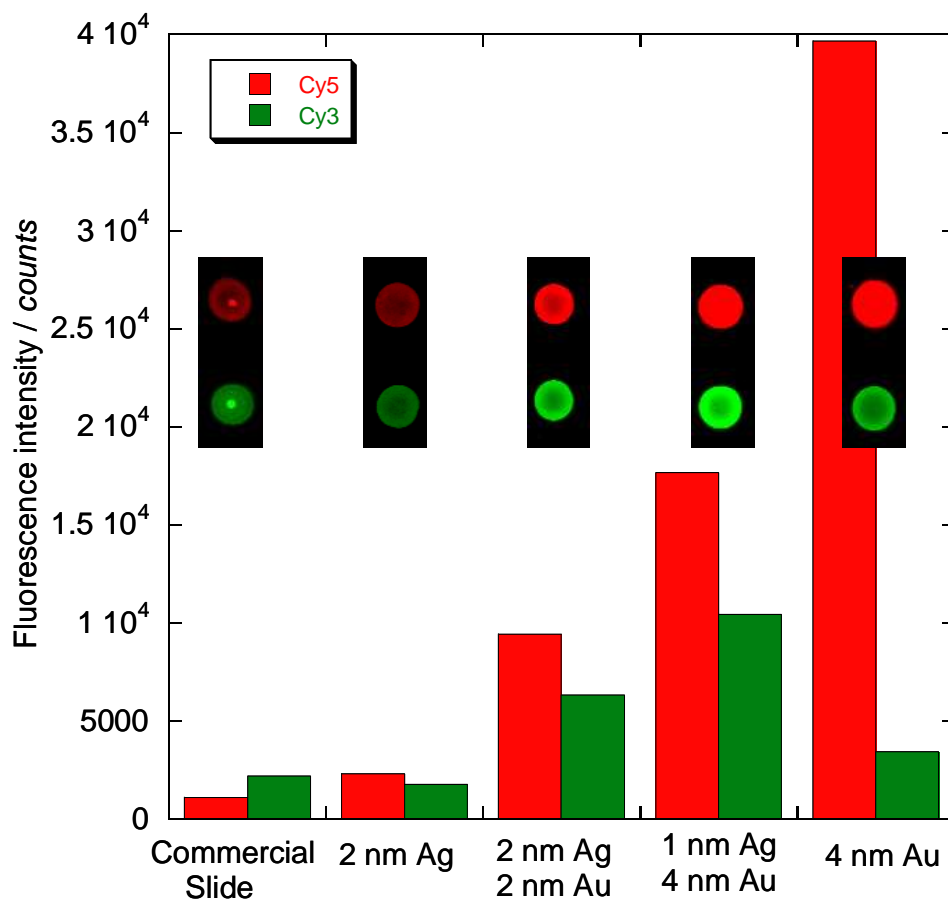
	composition	$\lambda_{\max}$ /nm	fwhm /nm	$\lambda_{\max}$ / nm (après dépôt)	fwhm / nm (après dépôt)	$\lambda_{\max}$ / nm (dans PBS)
1	2 nm Ag	421	53	450	62	519
2	2 nm Ag 2 nm Au	474	62	502	97	523
3	1 nm Ag 4 nm Au	512	76	534	100	548
4	4 nm Au	548	100	566	102	580

**Tableau 7 : Caractéristiques des spectres d'absorption de différentes structures avant et après dépôt de 5 nm de a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>H.**

### 3. Exaltation de la fluorescence

#### a) Influence de l'épaisseur de a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>:H

Outre préserver de bonnes propriétés optiques, les couches de a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>:H permettent le greffage covalent de biomolécules, ainsi que la maîtrise de la distance métal/fluorophore. En effet, la fonctionnalisation de la surface par l'acide nous permet de pouvoir accrocher les brins d'ADN à une distance de 7 nm (5 nm + 2 nm couche moléculaire). Après l'étape d'activation, les sondes Cy5- $\overline{\text{ON}}$ -G et Cy3-ON-G sont immobilisées à la surface (10  $\mu\text{M}$ ) des différents substrats (tableau 7) et sur une lame commerciale terminée par des groupements NHS ester. La figure 104 montre l'intensité de la fluorescence (Cy3 et Cy5) et l'homogénéité des spots sur les différentes structures en comparaison avec la lame commerciale. On note sur cette figure que les sondes marquées Cy5 fluorescent plus que celles marquées Cy3. Même si une comparaison quantitative n'est pas possible dans la mesure où nous n'avons pas calibré précisément l'intensité des lasers utilisés, nous pouvons clairement corréler cette tendance au rendement quantique des fluorophores qui est bien plus faible pour le marqueur Cy3 (0,04) que pour Cy5 (0,3).<sup>45</sup> Pour les sondes Cy5- $\overline{\text{ON}}$ -G, le substrat verre/AuNp/ a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>:H est le plus fluorescent. La fluorescence mesurée est 3 fois plus importante que pour la structure 3 (1 nm Ag/ 4 nm Au) et 35 fois plus intense que pour la lame commerciale. Pour les sondes Cy3-ON-G, c'est la structure 3 qui présente le facteur d'exaltation le plus élevé. La comparaison des longueurs d'onde associées au signal LSPR ( $\lambda_{\text{max}}$ ) et des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de Cy3 (550 nm ; 570 nm) et de Cy5 (650 nm, 670 nm) permet de comprendre ces résultats. Nous remarquons (tableau 7) que la structure 4 ( $\lambda_{\text{max}}$ =580 nm) est la structure dont la longueur d'onde de résonance est la plus proche des longueurs d'onde caractéristiques de Cy5, tout comme la structure 3 ( $\lambda_{\text{max}}$  =548 nm) vis-à-vis de Cy3. L'intensité de la fluorescence est en effet maximale lorsque la longueur d'onde d'excitation du fluorophore est très proche de la longueur d'onde de résonance grâce au couplage à la résonance.<sup>29</sup> On comprend ainsi pourquoi l'intensité des brins Cy3 est comparable à celle des brins Cy5 pour la structure 1 à base de nanoparticules d'argent.<sup>46</sup>

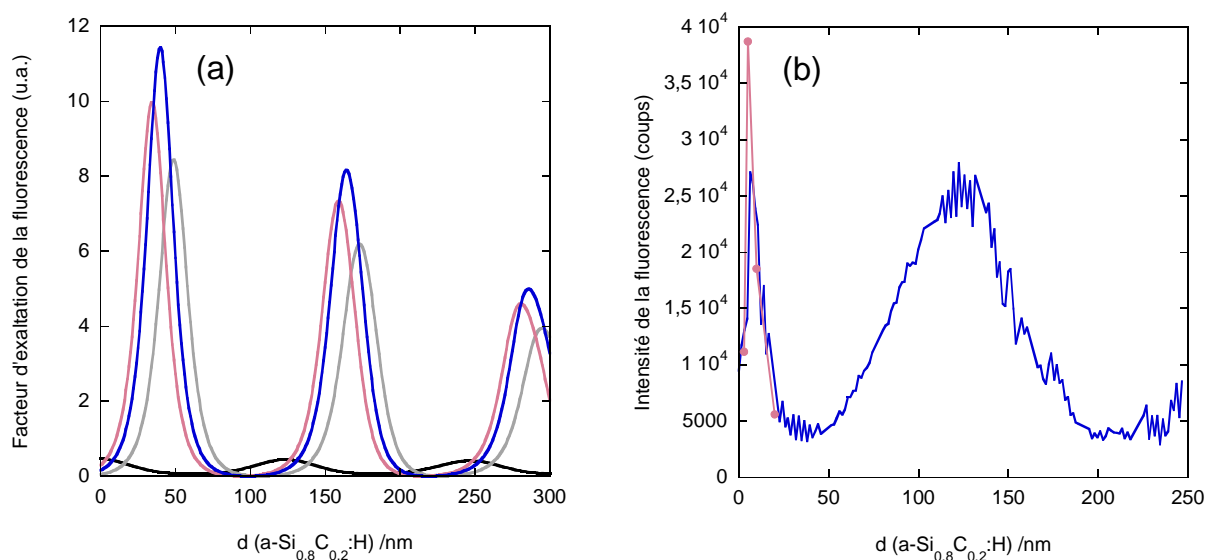


**Figure 104 : Intensité de la fluorescence et images des spots associés pour les sondes Cy5- $\overline{\text{ON}}$ -G et Cy3-ON-G immobilisées à 10  $\mu\text{M}$  sur les différents substrats. La valeur des histogrammes correspond aux valeurs médianes corrigées par les valeurs de fluorescence du fond continu mesurées au voisinage des spots.**

### b) Influence de l'épaisseur et sensibilité

Comme le montre la figure 105a, indépendamment de l'exaltation par les plasmons de surface (efficace seulement pour les très faibles épaisseurs de la couche de  $\text{a-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}:\text{H}$ ), l'épaisseur d'une couche de  $\text{a-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}:\text{H}$  déposée sur une couche métallique continue a un effet significatif sur l'intensité de la fluorescence de sondes Cy5 immobilisées à la surface. Le facteur d'exaltation a été calculé comme au chapitre 2 (facteur calculé à l'excitation et à l'émission). La figure 105b montre la variation de fluorescence des sondes Cy5-ON en fonction de l'épaisseur de  $\text{a-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}:\text{H}$  déposée sur les nanoparticules d'or. Il faut cependant tenir compte du fait que les fluorophores sont à une distance égale à environ 10 nm du diélectrique (2 nm couche d'accrochage + 8 nm pour les bases de l'ADN) pour calculer la

distance métal/fluorophore. La courbe bleue continue sur la figure 105b montre l'intensité des sondes Cy5- $\overline{\text{ON}}$ -G immobilisées par le robot Biorobotics Microgrid II sur une couche à épaisseur variable (déposée comme décrit au chapitre 2). Dans cette expérience, la variation d'épaisseur sur un même spot (diamètre de 300  $\mu\text{m}$ ) est d'environ de 1 à 2 nm, ce qui moyenne le signal mesuré. C'est pourquoi, aux faibles épaisseurs où la variation du signal en fonction de l'épaisseur est rapide, des mesures indépendantes ont été faites sur des couches d'épaisseur homogène (3, 5, 10 et 20 nm, points roses figure 105b). L'intensité maximale est obtenue pour le substrat avec 5 nm de  $\text{a-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}\text{:H}$ . En supposant que les brins d'ADN sont orientés perpendiculairement à la surface, le fluorophore est alors à une distance de 15 nm du métal, une distance pour laquelle l'exaltation est proche du maximum.<sup>31,36</sup>



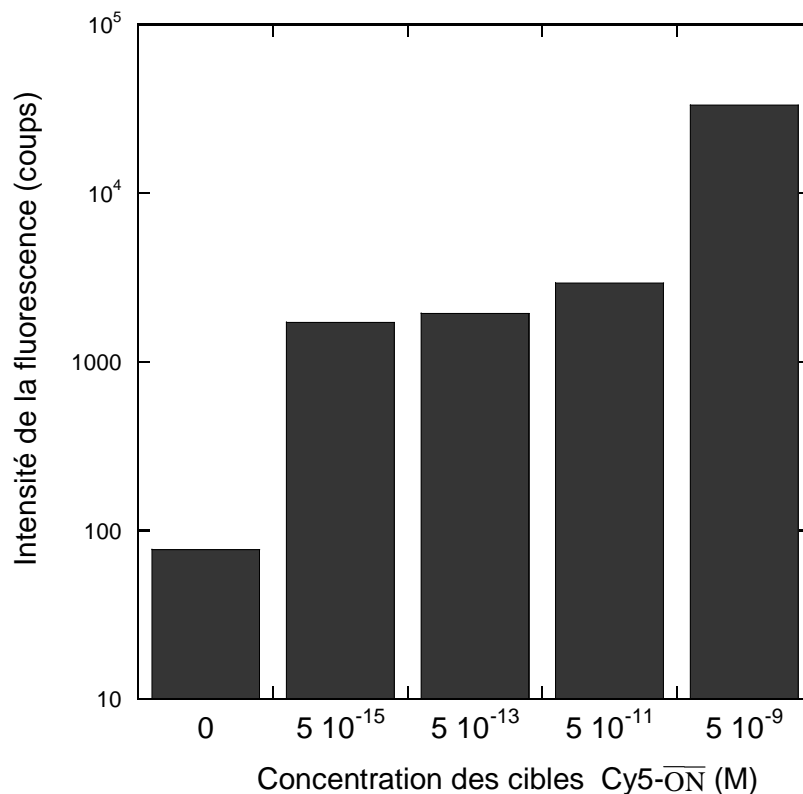
**Figure 105 : (a) Calcul du facteur d'exaltation de la fluorescence de sondes marquées Cy5 en fonction de l'épaisseur de  $\text{a-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}\text{:H}$  sur différents substrats : verre (noir) ; aluminium (gris) ; or (rose) et argent (bleu) ; (b) Intensité de la fluorescence pour différentes épaisseurs de  $\text{a-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}\text{:H}$  déposé sur le substrat verre/AuNp, mesurée sur des couches d'épaisseur homogène (courbe rose) ou une couche d'épaisseur variable (courbe bleue).**

Pour des couches plus minces que 5 nm, l'intensité de la fluorescence décroît à cause de l'intervention de processus de recombinaison non radiatifs dus à la proximité du métal. Parallèlement, on note que pour de grandes épaisseurs, on retrouve un maximum de fluorescence dû au phénomène d'interférences entre la lumière directement émise et celle réfléchiée par la couche des nanoparticules. Les deux maxima sont séparés par une valeur proche de  $\lambda/2n$  comme sur la figure 105a. Toutefois on remarque que les franges sont

décalées d'une valeur proche de  $\lambda/4n$ . Ce décalage est dû au fait que le déphasage lors de la réflexion sur la couche de nanoparticules est distinct de celui enregistré à la surface d'une couche métallique continue.

Le substrat 5 nm a-Si<sub>0,80</sub>C<sub>0,20</sub>:H/AuNP/ apparaît comme étant le meilleur substrat pour obtenir une fluorescence optimale avec des sondes marquées Cy5. Nous n'avons pas dans ce cas calculé le facteur d'exaltation, mais nous pouvons remarquer que le rapport d'intensité entre les deux premiers maxima de la courbe théorique de la figure 105a est sensiblement identique à celui mesuré expérimentalement d'après la figure 105b. Cela indique que pour des conditions optimales, l'intensité de la fluorescence des sondes marquées Cy5 immobilisées sur la structure 5 nm a-Si<sub>0,8</sub>C<sub>0,2</sub>:H / Au Np est du même ordre de grandeur que celle calculée et mesurée expérimentalement sur des couches métalliques planes. Cela suggère que le facteur d'exaltation est du même ordre que le facteur d'augmentation déterminé sur des couches métalliques planes ( $\lambda/4$ ), donc compris entre 10 et 15. On peut atteindre ainsi un niveau de sensibilité très élevé et proche des meilleurs capteurs à fluorescence sur réflecteur. En d'autres termes, dans les conditions optimales, le gain dû à l'augmentation du champ local compense les pertes imputables aux phénomènes de recombinaison non radiative dus à la proximité du métal. De telles valeurs permettent la détection de l'hybridation pour des valeurs très faibles en fluorescence, comme le montre la figure 106 où l'hybridation à 5 fM est détectée. Au vu de l'intensité du signal par rapport au signal de fond, la limite de détection peut être comparée à celle obtenue par SPFS (500 attomolaire).<sup>47</sup> Sur de tels substrats nous avons essayé de déterminer comme pour le LSPR la limite de détection (figure 106), mais nous avons rencontré le même comportement que celui observé et discuté au chapitre 2 (partie E §3 c).



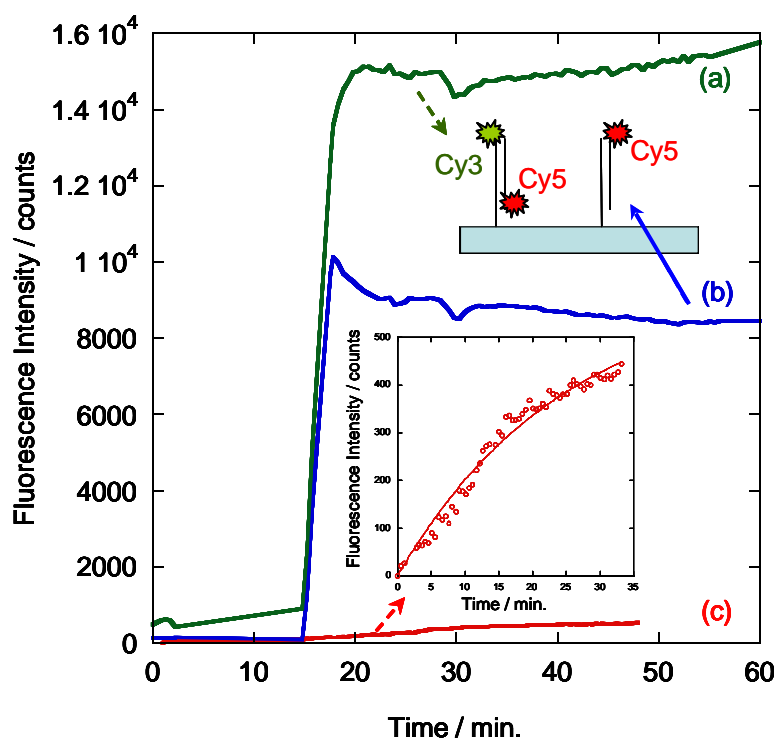


**Figure 106 : Diagramme d'intensité de fluorescence après hybridation des spots à différentes concentrations (5 fM, 500 fM, 50 pM, 5 nM). Les valeurs des histogrammes sont corrigées par les faibles valeurs de fluorescence du fond continu au voisinage des spots. Pour la lame immergée dans le tampon de préhybridation (0M), l'intensité de fluorescence correspond à la valeur brute mesurée.**

#### 4. Cinétique d'hybridation

Comme pour les biocapteurs SPFS ou fluorescents, la très bonne sensibilité permet de suivre l'hybridation in situ en temps réel. La figure 107 montre l'intensité de fluorescence obtenue avec les cibles  $\text{Cy5-ON}$  et  $\text{Cy5-ON}''$  marquées Cy5. La courbe (a) correspond à l'hybridation des cibles  $\text{Cy5-ON}$  avec les sondes  $\text{Cy3-ON-G}$  et la courbe (b) montre celle entre les mêmes cibles  $\text{Cy5-ON}$  et les sondes  $\text{G-ON}$ . La cible  $\text{Cy5-ON}$  est complémentaire des deux sondes, mais s'hybride avec le fluorophore Cy5 orienté vers la surface sur la sonde  $\text{Cy3-ON-G}$  (figure 107) alors que lors de l'hybridation avec la sonde  $\text{G-ON}$ , le fluorophore est orienté vers l'extérieur. Les cibles (5 nM) sont introduites après 15 minutes (temps nécessaire pour faire le réglage de l'intensité et mesurer la stabilité des sondes en solution

dans le tampon de préhybridation). Dans les deux cas, l'hybridation est très rapide (la prise de mesure pendant les premières minutes est limitée par les conditions opératoires : échange de solution, et homogénéisation de la solution contenant les cibles).



**Figure 107 :** Intensité de la fluorescence des cibles  $\text{Cy5-}\overline{\text{ON}}$  (5 nM) hybridées avec les sondes  $\text{Cy3-ON-G}$  (a vert) et  $\text{G-ON}$  (b bleu) à  $10\mu\text{M}$ . L'encart et la courbe c (rouge) montrent l'intensité de la fluorescence des cibles  $\text{Cy5-}\overline{\text{ON}}$  hybridées avec les sondes  $\text{Cy3-ON-G}$ .

Comme pour la couche déposée sur le miroir de Bragg, on note ici que la fluorescence est environ 2 fois plus importante pour l'hybridation avec les sondes  $\text{Cy3-ON-G}$  qu'avec les sondes  $\text{G-ON}$ .

Une explication plausible serait de considérer que cette différence est principalement due à l'appariement des fluorophores en dimères non fluorescents, ou fluoresçant à une autre longueur d'onde. Cela reste concevable au vu de la forte densité des sites d'accrochage ( $> 10^{13}$  molécules  $\text{cm}^{-2}$ ).<sup>48</sup> Dans ce cas le phénomène serait plus important avec les sondes  $\text{G-ON}$  qu'avec les sondes  $\text{Cy3-ON-G}$  car les fluorophores des sondes  $\text{Cy3-ON-G}$  sont plus proches des sites d'accrochage ce qui les maintient plus ou moins séparés les uns des autres, alors

qu'avec les sondes G-ON, les fluorophores se retrouvent en bout de chaîne, plus libres de se déplacer et de former des dimères.

Cependant, au vu de la dépendance de l'intensité de la fluorescence en fonction de la distance métal/fluorophore, une autre explication apparaît plus plausible. Une séquence d'oligonucléotides 25-mer sans un groupement amino hexyle peut être considérée comme un tube d'une longueur de 8 nm. Comme on peut le voir sur la figure 105b, l'intensité de la fluorescence est 2 à 3 fois plus faible quand l'épaisseur varie de 5 à 15 nm pour la couche de  $\alpha\text{-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}\text{H}$ . Le facteur mesuré expérimentalement ( $\sim 2$ ) quand on compare l'intensité du fluorophore avec les sondes Cy3-ON-G ( $d=7$  nm) et les sondes G-ON (15 nm) est légèrement plus petit, ce qui se conçoit dans la mesure où les duplex ne sont en réalité pas parfaitement perpendiculaires à la surface notamment à cause de la rugosité de surface.

La courbe c (figure 107) montre l'hybridation des cibles Cy5- $\overline{\text{ON}}$ '' avec les sondes Cy3-ON-G. Cette séquence contient 4 mésappariements (deux à la septième et huitième base en partant de l'extrémité 5' et deux autres à la huitième et neuvième en partant de l'extrémité 3'). En comparant la cinétique d'hybridation pour les cibles on voit que la cinétique est fortement ralentie et que le signal de fluorescence est bien plus bas (diminution d'un facteur  $\sim 25$ ). La fluorescence augmente selon une cinétique de premier ordre avec un temps caractéristique de 25 minutes.

Même si un signal de fluorescence est détecté aussi bien pour une hybridation avec les cibles parfaitement complémentaires qu'imparfaitement complémentaires, une analyse quantitative du signal nous permet aisément de différencier les deux situations. Pour une densité de sondes immobilisées connue, l'intensité du signal à la saturation montre que les cibles et les sondes appariées ont une bien plus grande affinité que dans la situation où l'on a mésappariement. Par ailleurs la cinétique beaucoup plus lente pour les cibles (temps caractéristique = quelques minutes pour les cibles parfaitement complémentaires et 25 minutes pour les cibles Cy5- $\overline{\text{ON}}$  et Cy5- $\overline{\text{ON}}$ '')) permet aussi d'améliorer encore en pratique la spécificité de reconnaissance sur nos substrats. Cependant, une telle différence de cinétique n'est pas vraiment attendue si l'on considère le cas classique de la formation de la double hélice d'ADN (nucléation d'un appariement sur un ensemble de quelques bases puis appariement complet par un mécanisme de type « fermeture éclair »).<sup>49</sup> En effet, les mésappariements sont localisés au milieu de la séquence permettant la reconnaissance entre 6 à 8 paires de bases de part et d'autre de la séquence. De telles longueurs sont largement suffisantes pour nucléer l'appariement. Ainsi, une influence marginale dans la cinétique

devrait être observée. La cinétique particulièrement ralentie nous suggère ici une interaction entre les sondes immobilisées (gênes stériques, répulsions électrostatiques) qui interviennent lorsque la densité de sondes est trop importante (ce qui est le cas sur nos couches minces). Peterson et coll. ont montré que sur des surfaces d'or, les cinétiques étaient aussi ralenties pour des cibles contenant des mésappariements lorsque la densité de sondes est élevée.<sup>50</sup> Nous pouvons par ailleurs rapprocher ce résultat de ceux obtenus par SPFS au chapitre 3 lors de l'étude de l'hybridation de cibles complémentaires ou non avec des sondes immobilisées sur des surfaces préparées à partir de couches acides diluées 15% (figure 88). On remarque en effet que dans ce cas les cinétiques sont semblables alors que les sondes sont plus diluées. Une dilution des chaînes permet de favoriser la cinétique de l'hybridation et on peut donc tenter d'expliquer le ralentissement de la cinétique observé figure 107 par la présence de gênes stériques. Un scénario possible sur des surfaces où les sondes sont insuffisamment diluées serait qu'une cible puisse s'hybrider avec deux sondes voisines. Ce mécanisme est certainement plus favorable lorsque la cible est partiellement mésappariée avec les sondes. En effet, l'appariement par fermeture éclair se trouve alors bloqué par les substitutions de base, ce qui laisse la partie non appariée de la cible libre de se lier éventuellement avec la partie complémentaire qu'elle peut trouver sur une sonde voisine. L'interaction d'une même cible avec deux sondes distinctes, en bloquant plus ou moins irréversiblement certaines sondes, peut à la fois ralentir la cinétique de reconnaissance et limiter le nombre de cibles susceptibles de se fixer à la surface.

# Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis au point un substrat LSPR à base de silicium amorphe sur des nanoparticules. L'intérêt de l'utilisation de ces couches minces est de pouvoir contrôler à la fois la chimie de surface, grâce à une fonctionnalisation par des monocouches terminées par des groupements carboxyles, et aussi les propriétés optiques des nanoparticules. Ainsi avons-nous pu étudier l'hybridation de brins d'ADN sur un substrat 5 nm  $a\text{-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}:\text{H}$  / AuNp / verre par suivi du signal LSPR. Ce substrat présente par ailleurs une très bonne sensibilité (40 nM).

Nous avons montré que sur ce même substrat, il est possible d'étudier l'hybridation de l'ADN par fluorescence couplée aux plasmons de surface localisés. L'intensité de la fluorescence, très élevée (35 fois plus importante que sur une lame commerciale), permet de détecter de faibles quantité d'ADN (limite de détection < 5 fM).

Un aspect particulièrement intéressant de ce substrat est de pouvoir étudier simultanément l'hybridation par fluorescence et l'imagerie par LSPR (même si la sensibilité est plus faible en LSPR). De telles mesures en LSPR et fluorescence n'ont jamais été réalisées et peuvent être obtenues simultanément sans contrainte géométrique particulière, contrairement au cas de la fluorescence couplée au SPR. Cela sera un outil particulièrement intéressant pour la compréhension de réactions compétitives, qui jouent un rôle important dans les essais réalistes nécessaires à de nombreux diagnostics.