

Couches minces de silicium amorphe carboné sur or ou argent pour une détection par résonance de plasmon surface (SPR)

Introduction	107
A. Les plasmons de surface.....	108
1. Théorie	108
a) Définition	108
b) Relation de dispersion	109
c) Couplage par prisme.....	111
d) Influence de la couche métallique.....	113
e) Fluorescence couplée au plasmon de surface.....	113
f) Biocapteurs basés sur la résonance de plasmon de surface.....	115
B. Utilisation des couches minces de silicium amorphe carboné	116
1. Intérêt des couches minces a-Si _{1-x} C _x :H.....	116
2. Mode opératoire	117
a) Préparation des interfaces SPR	117
b) Fonctionnalisation de surface.....	118
c) Mesure de la réflectivité.....	118
3. Optimisation de la sensibilité de capteurs SPR.....	119
a) Influence du taux de carbone et de l'épaisseur	119
b) Mesure de la sensibilité	120
c) Stabilité chimique.....	123
d) Caractérisations des couches.....	124
e) Caractérisation du greffage et de l'immobilisation	127
f) Mesure par SPR de l'interaction biotine-streptavidine	130
C. Fluorescence couplée au plasmon de surface : Applications aux puces à ADN.....	132
1. Contrôle de la chimie de surface	132
2. Calcul théorique de la réflectivité et du gain en fluorescence.....	133
3. Modes opératoires	134
a) Immobilisation des sondes	134
b) Hybridation.....	134
c) Mesure de la fluorescence	134
4. Détermination de constantes de dissociation	135
a) Isotherme de Langmuir	135
b) Etude de l'hybridation par SPFS	136
Conclusion.....	144
Bibliographie	145

« Pour progresser, il ne suffit pas de vouloir agir, il faut d'abord savoir dans quel sens agir. »

G. Lebon

Introduction

Parmi les biocapteurs, ceux basés sur la détection de la résonance de plasmon de surface (SPR) sont de plus en plus utilisés.¹ Contrairement à ceux exploitant la détection par fluorescence, ils présentent l'avantage d'une détection directe (sans fluorophore) et permettent une détection sensible et en temps réel de reconnaissance moléculaire par suivi du changement d'indice à la surface. Depuis leur invention à la fin des années 90, les biocapteurs SPR sont devenus des outils d'analyse particulièrement intéressants pour l'étude d'interactions moléculaires.²

Dans le cadre de cette étude, nous avons collaboré avec le groupe de S. Szunerits et R. Boukherroub de l'institut de recherche interdisciplinaire de Villeneuve d'Ascq, pour améliorer la physico-chimie des substrats plasmoniques et avec le Groupe de A. T. A. Jenkins du département de chimie de l'université de Bath (G.B.) pour l'étude de la fluorescence couplée au plasmon de surface (SPFS).

Le but de ce chapitre est de montrer comment la fonctionnalisation de surface jusqu'alors utilisée essentiellement sur or peut être améliorée en utilisant une couche mince de silicium amorphe. Nous nous intéresserons à la sensibilité de ces substrats et à l'utilisation combinée des plasmons de surface et de la fluorescence pour la détermination de constantes de dissociation, particulièrement intéressantes pour identifier des mutations ponctuelles de bases dans les brins d'ADN.

A. Les plasmons de surface

1. Théorie

a) Définition

Certaines des propriétés des métaux nobles peuvent être décrites par le modèle des électrons libres, dans lequel la présence du réseau d'atomes est ignorée. Les électrons libres sont dans ce cas considérés comme un plasma d'électrons ce qui confère au métal une fonction diélectrique de la forme :

$$\epsilon_m = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (9)$$

où ω_p est la pulsation du plasma, qui correspond au quantum d'excitation d'oscillations d'ondes de densité électronique qui peuvent se propager dans le volume du métal lorsque $\epsilon_m = 0$, c'est-à-dire lorsque $\omega = \omega_p$.² Dans la gamme de fréquence $\omega < \omega_p$, où $\epsilon_m < 0$, il apparaît des modes de surface, appelés plasmons de surface, qui se couplent au champ électromagnétique.^{2,3}

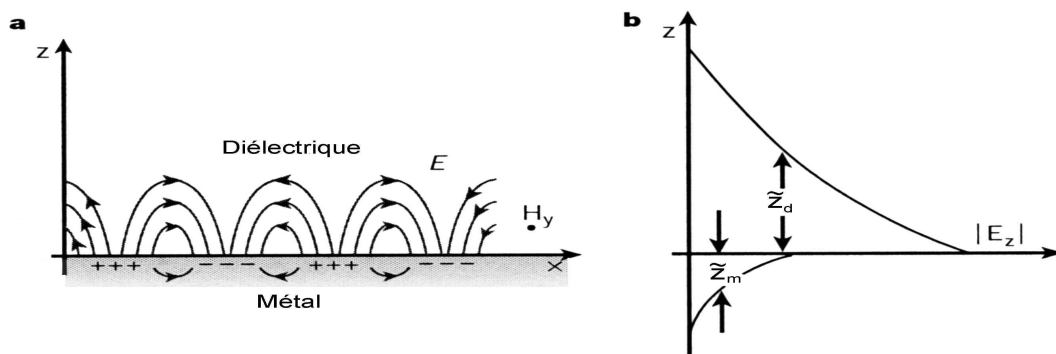


Figure 60 : (a) Représentation schématique de la propagation des oscillations de charge à l'interface métal/diélectrique ; (b) dépendance du champ électrique associé selon la direction perpendiculaire.⁴

La figure 60 représente les oscillations de charge (a) et la dépendance exponentielle du champ électrique associé (b). Le maximum d'intensité du champ associé à cette onde se trouve à

l'interface métal – diélectrique et décroît exponentiellement dans les deux milieux suivant les directions perpendiculaires à l'interface.⁴

b) Relation de dispersion

Les plasmons de surface se propagent le long de l'interface métal/diélectrique avec une constante de propagation k_x (équation 10) déterminée grâce aux équations de Maxwell :

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (10)$$

où ω est la pulsation, c la vitesse de la lumière, ϵ_d et ϵ_m les permittivités respectives du diélectrique et du métal. La fonction diélectrique du métal ϵ_m ($\epsilon_m = \epsilon'_m + i\epsilon''_m$) est complexe, on peut donc écrire $k_x = k'_x + ik''_x$ avec :

$$k'_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon'_m \epsilon_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d}} \quad (11)$$

$$k''_x = \frac{\omega}{c} \left(\sqrt{\frac{\epsilon'_m \epsilon_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d}} \right)^3 \left(\frac{\epsilon''_m}{2(\epsilon'_m)^2} \right) \quad (12)$$

Afin de comprendre le couplage de l'onde incidente avec les plasmons de surface, il est utile d'étudier leur relation de dispersion.

Le vecteur d'onde et la fréquence d'oscillation d'une onde électromagnétique sont liés par leur relation de dispersion (figure 61). Celle d'un photon se propageant dans le milieu diélectrique s'écrit :

$$k_{photon} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \quad (13)$$

La relation de dispersion du mode plasmon est donnée par les relations (11) et (12). Pour coupler un plasmon de surface à une excitation électromagnétique seule la partie propagative de l'onde importe, c'est à dire la partie réelle k'_x du vecteur d'onde (équation 11). La figure 61 représente la relation de dispersion $\omega(k'_x)$ des plasmons de surface. Celle-ci n'est pas linéaire puisque la fonction diélectrique ϵ_m dépend de ω . On note que pour les grands vecteurs d'onde, la fréquence d'oscillation tend vers une valeur ω_s :

$$\omega_s = \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + \epsilon_d}} \quad (14)$$

Au-delà de cette limite, le plasmon de surface est non propagatif (il n'existe que des plasmons de volume dont la fréquence d'oscillation est ω_p).

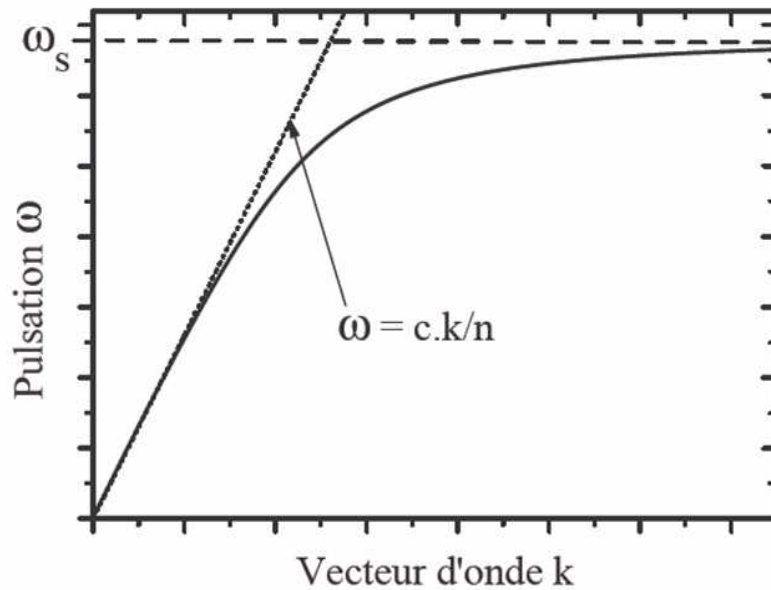


Figure 61 : Relation de dispersion d'un plasmon de surface se propageant entre un métal et un milieu diélectrique d'indice n . La droite correspondant à $\omega = c.k/n$ est la droite de dispersion de la lumière dans le milieu diélectrique n . La droite horizontale en pointillés correspond à la pulsation des plasmons de surface ω_s .

On note que, pour une pulsation donnée, le vecteur d'onde du plasmon de surface est toujours plus grand que celui de la lumière se propageant dans le diélectrique. L'absence d'interaction entre leurs courbes de dispersion interdit tout couplage. Par conséquent les deux courbes ne se croisent jamais. Il ne peut donc pas y avoir de couplage entre une onde lumineuse qui se propage dans le diélectrique et un mode de plasmon de surface. Il existe différentes techniques pour réaliser l'adaptation entre les vecteurs d'ondes : le couplage par prisme (expliqué ci-dessous) ou le couplage par réseau.⁵

c) Couplage par prisme

Il est possible d'illuminer la surface métallique au travers d'un milieu optique élevé, par exemple un prisme, pour augmenter le vecteur d'onde de la lumière incidente. Il existe 2 types de configurations :

- la configuration d'Otto : La lumière est projetée sur le métal en approchant un prisme de la surface métallique figure 62a.⁵
- la configuration de Kretschmann : la face arrière d'un film métallique est éclairée au travers d'un prisme figure 62b.⁵

Dans ces configurations, au-delà d'un certain angle (appelé angle critique) nous sommes en réflexion totale interne (ATR) ce qui permet l'apparition d'une onde évanescente à l'interface prisme / diélectrique possédant un vecteur d'onde plus grand que celui d'une onde se propageant dans le diélectrique (configuration d'Otto) ou l'excitation des plasmons de surface à l'interface métal / diélectrique dans la mesure où l'indice de réfraction du prisme est suffisamment grand devant celui du diélectrique (configuration de Kretschmann).

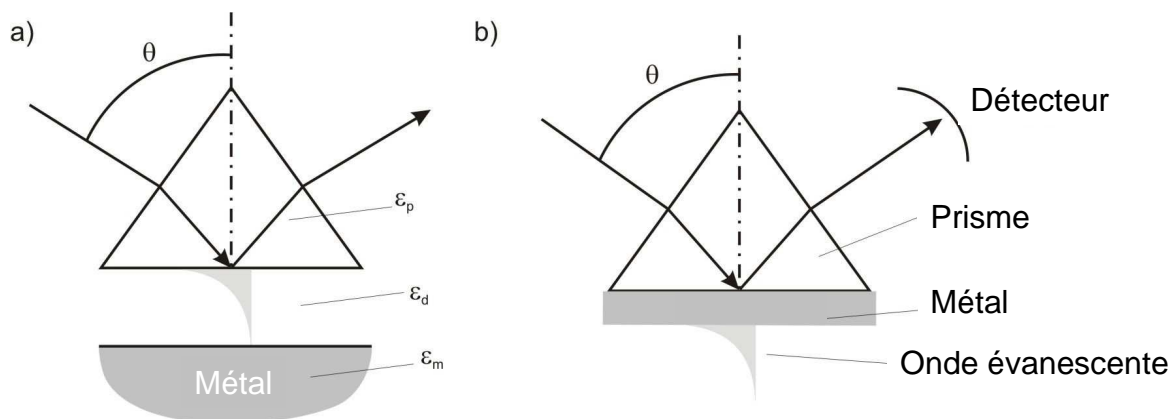


Figure 62 : Couplage d'une onde incidente d'angle θ par rapport à la normale avec un plasmon de surface en utilisant la configuration d'Otto (a) et la configuration de Kretschmann (b).

Dans les 2 cas, le faisceau de lumière incidente se réfléchit à la base du prisme. La relation de dispersion de la lumière dans la direction parallèle à l'interface est dans ce cas égale à :

$$k_{x, \text{photon}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_p} \sin(\theta) \quad (15)$$

avec ϵ_p la fonction diélectrique du prisme.

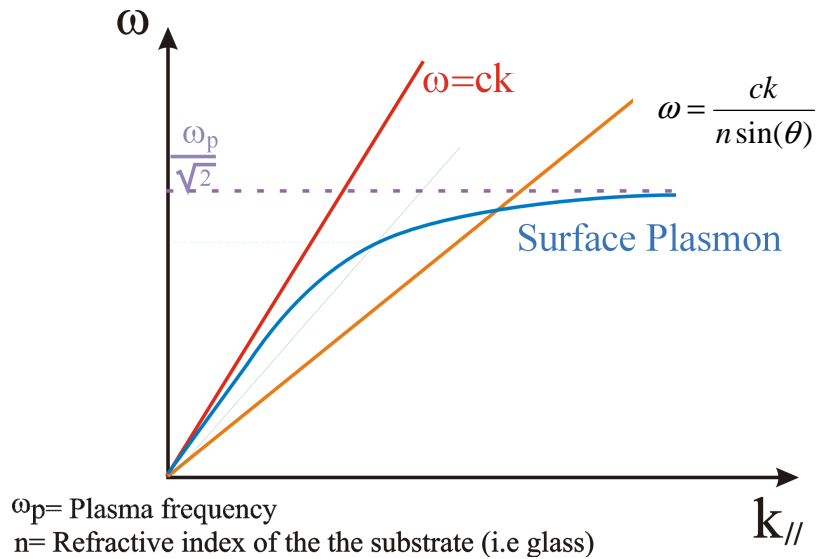


Figure 63 : Relations de dispersion de la lumière émise (rouge) ; d'un plasmon de surface à l'interface avec l'air (bleu) et d'une onde incidente en configuration de Kretschmann ou d'Otto pour un prisme d'indice n (orange).

La pente de la courbe de dispersion est ainsi divisée par un facteur $1/n_p$ ce qui permet à cette courbe de couper la courbe de dispersion des plasmons pour un angle d'incidence θ appelé angle de résonance plasmon (figure 63). L'équation de couplage est donc :

$$k_{x, photon} = k'_{x, plasmon} \quad (16)$$

$$\frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_p} \sin(\theta) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon'_m \epsilon_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d}} \quad (17)$$

A l'angle de résonance, l'énergie des photons incidents est convertie pour exciter les plasmons de surface, ce qui se traduit par un minimum de réflectivité comme présenté sur la figure 64.^{2,5}

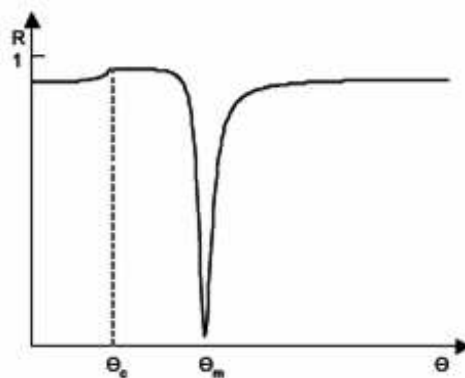


Figure 64 : Courbe de réflectivité en configuration de Kretschmann.

d) Influence de la couche métallique

La fonction diélectrique d'un métal varie en fonction de la pulsation de l'onde incidente. Chaque métal aura donc une résonance plasmon spécifique à un couple longueur d'onde et angle d'incidence (λ , θ) particulier et des caractéristiques de dispersion propres qui vont influencer le couplage entre l'onde incidente et les plasmons de surface.^{5,6}

Pour une excitation dans le rouge, l'or et l'argent présentent les meilleures propriétés. L'argent possède la résonance plasmon la plus étroite et donc la meilleure sensibilité, mais est très peu utilisé du fait qu'il s'oxyde à l'air. Des sous-couches d'adhérence de titane ou de chrome sont utilisées pour l'accrochage du métal sur la lame de verre ou prisme.

L'efficacité du couplage entre excitation et plasmons de surface d'un substrat SPR, maximale lorsque la réflectivité est nulle (c'est à dire à la résonance) dépend de l'épaisseur du métal d_m . En configuration de Kretschmann, l'onde se propageant dans le prisme ne peut en effet qu'exciter le mode plasmon à l'interface métal / diélectrique. Il faut donc éviter que la couche soit trop épaisse et n'atténue l'excitation. Réciproquement, il faut que la couche métallique soit suffisamment épaisse pour que l'oscillation de la densité de charge, qui s'étend sur une épaisseur finie à la surface, puisse se développer. La longueur correspondante est de l'ordre de l'épaisseur de la couche métallique, soit environ 30 nm (en fait 38 nm Ag ; 50 nm Au). Le plasmon reste donc très confiné dans le prisme et il sera sensible à toutes variations qui peuvent se produire à la surface du métal.⁶

e) Fluorescence couplée au plasmon de surface

A l'angle de résonance presque toute l'énergie des photons est utilisée pour exciter les plasmons de surface. Ceci conduit au minimum de réflectivité et à l'exaltation du champ électromagnétique à l'interface métal/diélectrique (air ou eau). Ainsi il sera possible d'exciter plus efficacement des biomolécules marquées par un fluorophore.⁷ La figure 65 montre bien que la bande plasmon centrée sur le minimum de réflectivité est plus étroite dans le cas de l'argent que dans celui de l'or. Le facteur d'exaltation du champ électromagnétique a été calculé pour différentes interfaces (prisme/métal/air ; prisme/métal/eau) pour l'or et l'argent. Comme on peut le voir sur la figure 65, chaque intensité du champ atteint un maximum à un angle proche de la résonance (la valeur indiquée sur l'échelle de droite est normalisée par rapport à l'intensité du champ incident). Les facteurs sont de 58 et 17 pour les interfaces Ag/eau et Au/eau.⁷ L'augmentation significative du facteur pour l'argent s'explique par le fait

que l'argent présente une fonction diélectrique avec une partie imaginaire plus petite. Le facteur d'exaltation est plus faible pour les interfaces immergées dans l'eau que dans l'air parce que le champ associé au plasmon de surface se dissipe davantage dans le métal pour des milieux diélectriques plus denses.

On note par ailleurs que l'angle de résonance correspondant au maximum du facteur d'exaltation du champ électromagnétique et celui associé au minimum de réflectivité ne sont pas strictement égaux. On peut expliquer cela si l'on considère notre système comme un résonateur guidé par la lumière incidente. La partie imaginaire ϵ'' de la fonction diélectrique correspond au facteur de perte du résonateur et entraîne ainsi la séparation entre l'angle de résonance des plasmons et le maximum de l'intensité du champ. Plus ϵ'' est grand, plus la séparation entre les angles est importante, ce qui explique que cette séparation est plus faible dans le cas de l'argent que dans celui de l'or.⁷

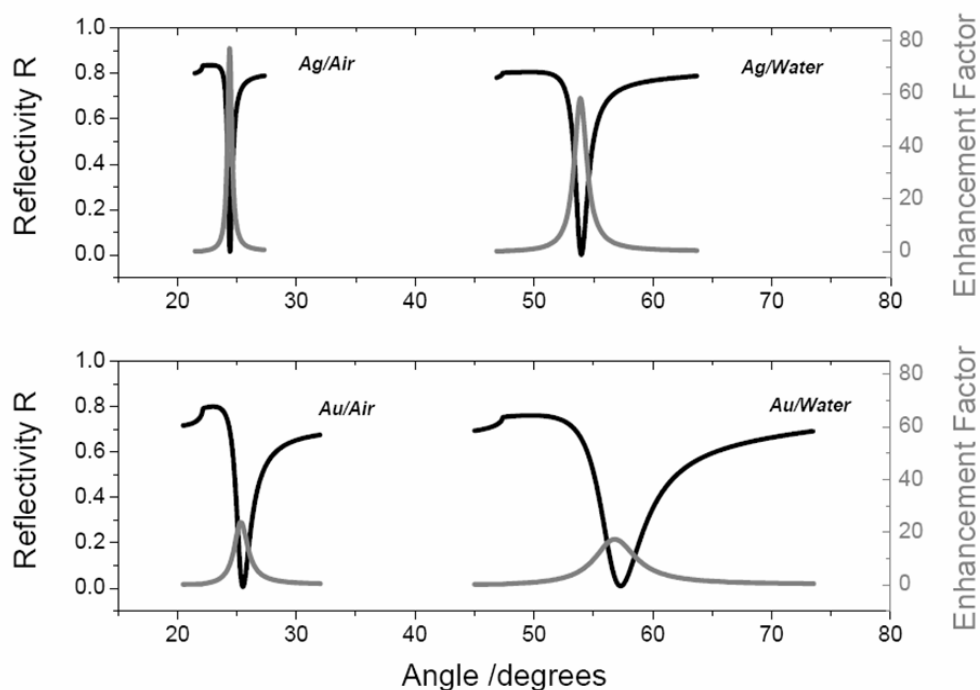


Figure 65 : Courbes théoriques de réflectivité et de l'intensité du carré du champ en fonction de l'angle d'incidence pour différents substrats (prisme/Ag/air ; prisme/Ag/eau ; prisme/Au/air ; prisme/Au/eau).

f) Biocapteurs basés sur la résonance de plasmon de surface

Pour la plupart des biocapteurs basés sur la résonance de plasmon de surface, les sondes sont souvent immobilisées sur la couche métallique (or) et permettent une reconnaissance cible-sonde. L'accrochage de biomolécules à l'interface induit un changement de l'indice de réfraction, ce qui modifie la constante de propagation des plasmons de surface et change donc le couplage lumière émise / plasmons de surface. Ainsi les interactions moléculaires peuvent être suivies en mesurant les variations de la courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence comme le montre la figure 66a. Il est par ailleurs possible de faire des études cinétiques en mesurant la réflectivité à un angle donné pendant une réaction moléculaire (figure 66b).¹

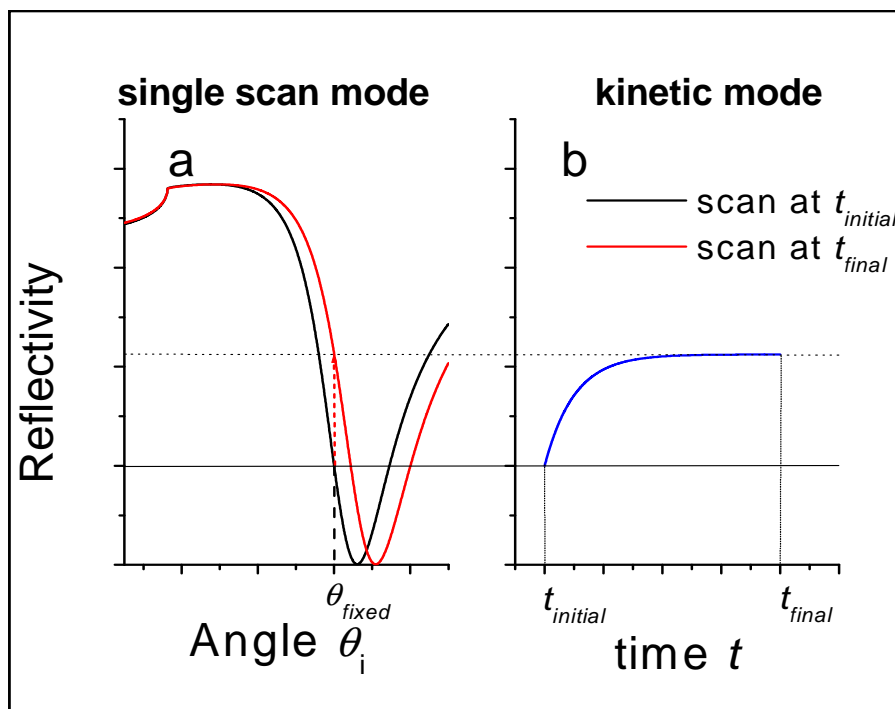


Figure 66 : (a) Mesure de réflectivité avant (noir) et après (rouge) une reconnaissance moléculaire ; (b) cinétique d'une réaction de reconnaissance moléculaire à un angle donné θ_{fixed} .

B. Utilisation des couches minces de silicium amorphe carboné

1. Intérêt des couches minces a-Si_{1-x}C_x:H

L'or est plus couramment utilisé pour ses propriétés optiques et chimiques. En effet, de nombreuses expériences de reconnaissance moléculaire par SPR sont réalisées sur des substrats d'or sur lesquels des groupements fonctionnels ou ligands sont immobilisés via la chimie des thiols.⁸⁻¹⁰ Même si les liaisons Au-S sont relativement fortes, elles sont sujettes à l'oxydation et à la désorption thermique.¹¹ Ainsi de nombreuses autres techniques de fonctionnalisation ont été développées.¹²⁻¹⁴ Le groupe de Livache s'est par exemple intéressé à l'utilisation de polymères comme le polypyrrole pour immobiliser des brins d'ADN.^{12,13} Comme pour la détection par fluorescence, la silanisation permet l'accrochage de biomolécules comme l'ADN, des carbohydrates ou des protéines sur des substrats recouverts d'une couche d'oxyde de silicium.¹⁵⁻¹⁹ Cependant, comme montré précédemment, l'or n'est pas le meilleur matériau pour une détection par plasmon de surface très sensible. Des modèles théoriques réalisés par Franzen et coll. ont montré que les substrats à base d'ITO sont plus sensibles mais nécessitent une excitation et une détection dans l'infrarouge.^{20,21} Dans le visible, l'argent présente les meilleures propriétés pour une très bonne sensibilité concernant la détection du plasmon de surface ou de la fluorescence couplée au plasmon de surface.^{7,22-24} Les substrats d'argent peuvent être fonctionnalisés de façon similaire aux substrats d'or par les thiols ou les molécules disulfures qui permettent d'obtenir des monocouches compactes et denses.^{25,26} Cependant l'argent ne présente pas une très bonne stabilité chimique (oxydation à l'air), ce qui altère son utilisation pour la détection par SPR. Plusieurs stratégies ont été mises au point pour l'utilisation de l'argent. Zynion et coll. ont par exemple montré qu'il était possible d'utiliser une bicouche métallique (Ag/Au), et d'accrocher par des thiols des sondes à la surface du capteur.²⁷ Szunerits et Boukherroub ont aussi montré qu'il était possible d'utiliser des couches d'oxyde (SiO_x, ITO, SnO₂) pour protéger l'argent et immobiliser des sondes à la surface de ces capteurs.^{23,28-30}

Dans cet esprit Smith et coll. ont transféré sur des couches d'argent la stratégie mise au point sur or qui consiste à déposer une couche de carbone amorphe. Dans ce cas, une chimie de surface très stable utilisant la liaison C-C pour accrocher de façon covalente des

biomolécules a été utilisée. De l'imagerie par SPR a pu être réalisée sur de tels substrats, cependant la sensibilité est plus faible que celle mesurée sur des substrats de verre à cause de l'absorption dans le visible, montrant qu'il est préférable d'utiliser des couches minces non absorbantes dans le visible.^{31,32}

De ce point de vue, les alliages silicium-carbone amorphes ($a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$) étudiés au chapitre 2 peuvent être particulièrement intéressants pour la fabrication des substrats SPR multicouches. Il est possible de contrôler l'indice optique de la couche en faisant varier le taux de carbone.^{33,34} Ils peuvent être déposés en couches minces. Les surfaces hydrogénées peuvent enfin être fonctionnalisées par hydrosilylation en utilisant la liaison Si-C pour permettre un accrochage covalent des molécules biologiques (biotine, ADN...).³⁵⁻⁴⁰ Nous allons montrer comment ces couches nous permettent d'optimiser la sensibilité des capteurs SPR pour des mesures de réflectivité (SPR) et de fluorescence (SPFS). Nous comparerons la sensibilité pour des couches métalliques d'or et d'argent d'épaisseurs optimales (50 nm or, 38 nm argent) pour le signal SPR et SPFS.

2. Mode opératoire

a) Préparation des interfaces SPR

(1) Évaporation du film métallique

Sur des substrats de verre soigneusement rincés, une couche mince de 5 nm de **Fin de formule inattendue** itane est déposée par évaporation thermique. Des couches de 50 nm d'or ou 38 nm d'argent sont ensuite déposées par évaporation en utilisant un bâti MEB 500 (Passys, France).

(2) Dépôt de la couche de $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$

Des films de silicium amorphe carboné sont déposés comme décrit au chapitre 2 par PECVD en régime « basse puissance ». Le taux final en carbone (C) dans le matériau est ajusté en variant la proportion de méthane dans le mélange gazeux ($[\text{CH}_4] / \{[\text{CH}_4] + [\text{SiH}_4]\}$). Pour le dépôt d'un film mince avec la stoechiométrie suivante : $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$, on utilise un taux de méthane de 97 at.% dans le mélange gazeux, tandis que pour un film $a\text{-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}\text{:H}$, un taux de 81 at.% est nécessaire. L'épaisseur est ajustée en contrôlant le temps de dépôt et vérifiée par ajustement des mesures SPR à l'aide du logiciel Winspall 2.0.³

Lors des dépôts sur argent, il s'est avéré que la couche métallique s'oxyde à cause du chauffage prolongé (pour atteindre la température de dépôt à 250°C et laisser le système dégazer) de la couche avant le dépôt du silicium amorphe. Ainsi, un prétraitement de l'échantillon juste avant dépôt par un plasma d'hydrogène (150 mTorr, 0,1 W cm⁻², 5 mn) permet de réduire l'oxyde d'argent formé et de déposer le silicium amorphe carboné directement sur la couche d'argent.

b) Fonctionnalisation de surface

A la sortie du réacteur de dépôt le film a-Si_{1-x}C_x:H s'oxyde. Il est exposé pendant 15 secondes à des vapeurs de HF pour obtenir une surface terminée par des liaisons Si-H. La surface hydrogénée est ensuite immergée dans l'acide undécylénique et soumise à une irradiation photochimique à 312 nm pendant 3 h.

L'activation des fonctions acides en esters de succinimidyle est réalisée comme aux chapitres 1 et 2 à 15°C en présence de l'EDC à 5 mM et du NHS à 5 mM pendant 90 mn. La surface est ensuite soigneusement rincée et séchée à l'azote. Les esters ainsi obtenus réagissent ensuite par réaction d'amidation en conditions physiologiques avec la N-(2-aminoéthyl) biotine (1 mg/ mL PBS) pendant 2h à température ambiante.

Pour l'étude par fluorescence couplée aux plasmons de surface (SPFS), nous détaillerons la procédure d'immobilisation des brins d'ADN dans la partie correspondante.

c) Mesure de la réflectivité

La réflectivité est mesurée à l'aide d'un appareil commercial de type Autolab SPRINGLE (mesure effectuée à une longueur d'onde $\lambda = 670$ nm) (figure 67).^{41,42}



Figure 67 : Appareil de mesure Autolab SPRINGLE pour des études SPR.

3. Optimisation de la sensibilité de capteurs SPR

a) Influence du taux de carbone et de l'épaisseur

L'influence du taux de carbone et de l'épaisseur d'un film de $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ sur le signal SPR a été étudiée pour un taux compris entre 20 et 37 % et une épaisseur comprise entre 0 et 10 nm (figure 68).

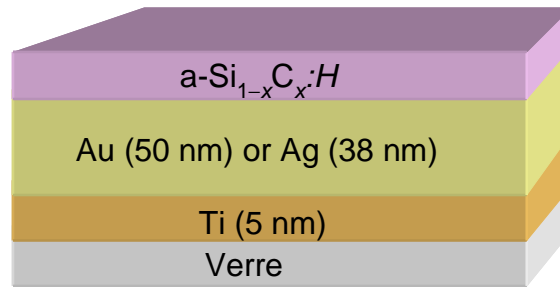


Figure 68 : Schéma de la structure de résonance de surface plasmonique, composée d'une structure multicouche dans laquelle une couche d'or a été revêtue avec une couche mince de $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$.

La Figure 69 montre les courbes SPR expérimentales superposées aux courbes théoriques de Fresnel pour des couches d'or recouvertes de 10 nm (A) et 5 nm (B) de $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ ($x=20\%$; 33% et 37%). Les différences dans les courbes de SPR sont dues à la modification de l'indice de réfraction n ($n = n' - i n''$). En effet, plus le taux de carbone est important, plus l'indice de réfraction est faible : à 633 nm $n = 2,63 - 5 \times 10^{-4}i$ pour une couche $a\text{-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}\text{:H}$ alors que $n = 1,815 - 1,07 \times 10^{-3}i$ pour une couche de $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$. Avec un revêtement possédant un taux de carbone de 20%, on constate une diminution dans l'efficacité de couplage photon-plasmon de surface et un élargissement des courbes SPR en dépit de la faible absorption du matériau (faible partie imaginaire). En fait, en augmentant le taux de carbone on augmente le gap optique mais aussi la densité d'états dans les queues de bandes. On note que les valeurs n'' déterminées par les ajustements des courbes SPR sont plus grandes que celles déterminées par transmission optique (couches de 1 μm déposées directement sur verre).

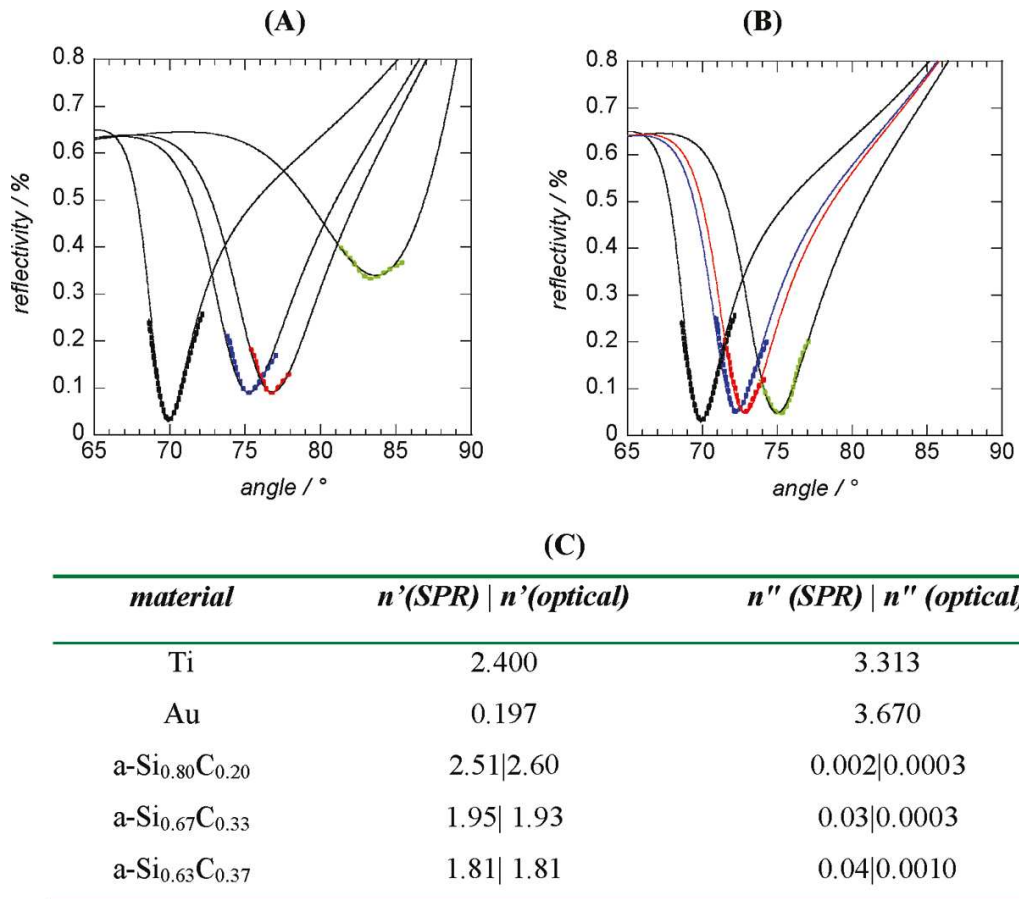


Figure 69 : Courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence (exprimé en degrés) des couches d'or revêtues par des films de a-Si_{1-x}C_x:H épais de 10 nm (A) et 5 nm (B): or non revêtu (noir), ou revêtu par a- Si_{0,80}C_{0,20} (vert), a-Si_{0,67}C_{0,33} (rouge), a-Si_{0,63}C_{0,37} (bleu) dans l'eau. Les valeurs expérimentales obtenues (points) ont été comparées aux courbes théoriques de SPR (courbes) calculées en utilisant WinSpall 2.0. (C) Liste des indices de réfraction à 670 nm déterminés à partir de mesures SPR et de mesures optiques de réflectivité.⁴³

La meilleure structure en termes de signal SPR est obtenue en utilisant une couche de 50 nm d'or déposée sur une couche de 5 nm de titane (5 nm Ti/50 nm Au) et revêtu d'un film de 5 nm de a-Si_{0,63}C_{0,37}:H. Si l'on compare les signaux SPR, on note un faible élargissement du signal après dépôt de l'alliage a-Si_{0,63}C_{0,37}:H.

b) Mesure de la sensibilité

La sensibilité des substrats SPR est une fonction qui dépend de façon complexe à la fois de la largeur à mi-hauteur et de l'angle de réflectivité minimum. Un facteur de sensibilité (FOM *Figure of Merit*) est défini pour évaluer la sensibilité des différents capteurs :⁴⁴

$$FOM = \frac{m \text{ (degreeRIU}^{-1}\text{)}}{fwhm \text{ (degree)}} \quad (18)$$

où m correspond à la pente de la droite du minimum de réflectivité (angle de résonance Θ_{SPR}) en fonction de l'indice de réfraction n du milieu extérieur dans lequel est réalisée la mesure ; $fwhm$ correspond à la largeur à mi-hauteur du signal SPR pour les différentes courbes de réflectivité mesurées dans différentes solutions à indice de réfraction variable ($n_{eau}=1,33$; $n_{éthanol}=1.361$; $n_{butanol}= 1,397$; $n_{propane\ diol}=1,43$).

La figure 70 montre les courbes de sensibilité pour différentes structures. Les droites correspondent au changement d'angle de résonance divisé par la largeur à mi-hauteur en fonction de l'indice du milieu (la variation des angles est mesurée par rapport à l'angle de résonance dans l'eau). La pente de ces droites est donc égale au facteur de sensibilité FOM . Le FOM est égal à 35 RIU^{-1} pour une couche d'or alors qu'il est de 74 RIU^{-1} pour une couche d'or recouverte de 5 nm de a-Si_{0.63}C_{0.37}:H. Ainsi la présence de la couche mince de silicium amorphe carboné apporte une sensibilité plus grande au capteur contrairement à ce que l'on observe avec une couche de carbone amorphe.³² La sensibilité du capteur est même plus importante que pour un capteur à base d'argent recouvert d'ITO, dont le FOM est égal à 47 RIU^{-1} .²³

Comme attendu en remplaçant la couche d'or (50 nm) par une couche d'argent, la sensibilité est augmentée, comme on peut le voir sur la figure 70. Les courbes de réflectivité et courbes d'ajustement de Fresnel (figure 71) permettent d'en comprendre la raison. En comparant les courbes de réflectivité des différentes structures a-Si_{0.63}C_{0.37}:H/Au et a-Si_{0.63}C_{0.37}:H/Ag, on voit que la largeur à mi-hauteur est bien plus faible pour la couche a-Si_{0.63}C_{0.37}:H sur Ag que sur Au.

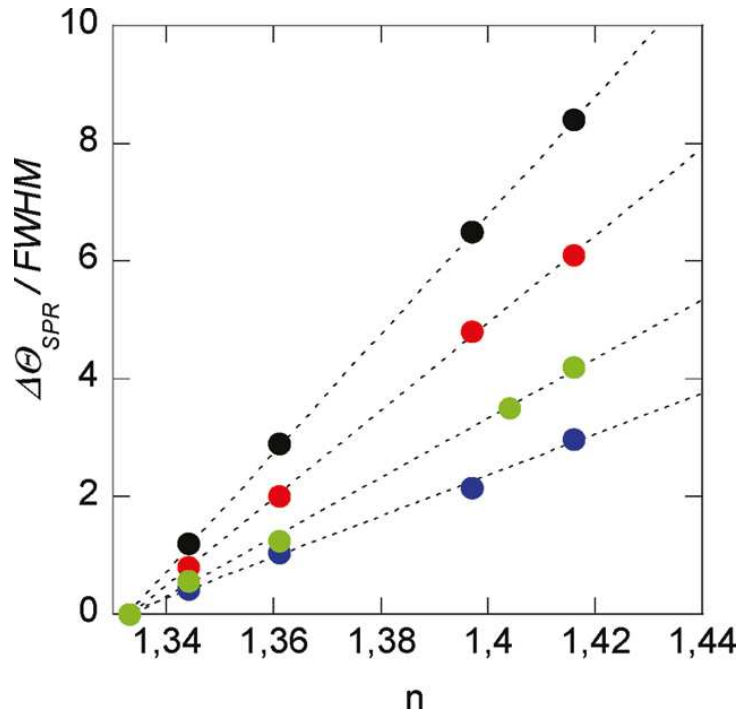


Figure 70 : Courbe de sensibilité ($\Delta\theta_{\text{SPR}}/\text{fwhm}$) en fonction de l'indice de réfraction n : Au (bleu) ; Ag (vert) ; Au/a-Si_{0,63}C_{0,37}:H (5 nm) (rouge) ; Ag/a-Si_{0,63}C_{0,37}:H (5 nm) (noir).

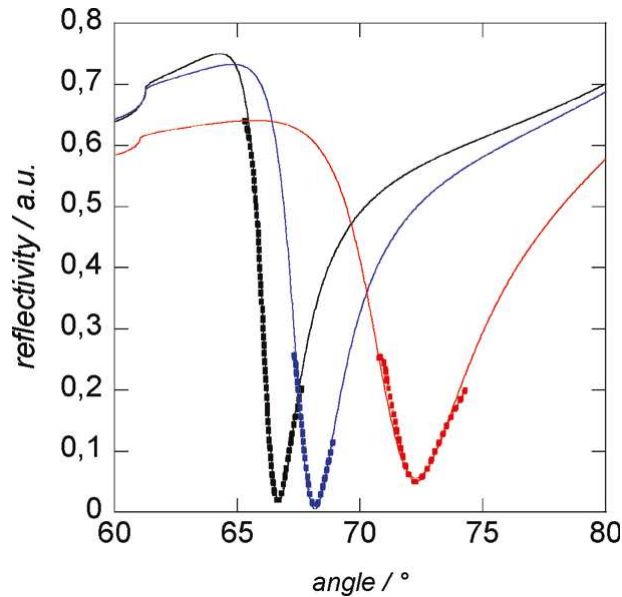


Figure 71 : Courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence (exprimé en degrés) pour différents substrats SPR dans l'eau: Ag (noir), Ag/a-Si_{0,63}C_{0,37}:H (5 nm) (bleu) Au/a-Si_{0,63}C_{0,37}:H (5 nm) (rouge). Les valeurs expérimentales obtenues (points) ont été comparées aux courbes théoriques de SPR (courbes) calculées en utilisant WinSpall 2.0.

La sensibilité de la structure $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}:\text{H}/\text{Ag}$ est de 101 RIU^{-1} , respectivement 2 fois et 2,8 fois plus sensible que pour une simple couche d'argent (51 RIU^{-1}) ou or (35 RIU^{-1}). Finalement, il apparaît ici clairement que le revêtement d'une structure plasmonique active par une couche mince de silicium amorphe carboné transparente dans le visible permet d'augmenter significativement la sensibilité, contrairement à ce qui a été observé pour une couche de carbone amorphe.^{31,32} L'indice de réfraction de la couche doit être suffisamment élevé pour permettre le couplage photons-plasmons de surface mais pas trop élevé pour éviter un élargissement du signal SPR (figure 71). L'épaisseur doit donc être contrôlée pour éviter l'élargissement du signal (figure 69). Ainsi la structure (5 nm) $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}:\text{H}/\text{Ag}$ permet d'obtenir un signal SPR de très bonne qualité (figure 71).

Le facteur de sensibilité défini ci-dessus et utilisé classiquement pour comparer les différentes structures SPR n'est pas pleinement satisfaisant pour l'application aux biocapteurs. En effet, il mesure la sensibilité de la mesure à un changement d'indice de réfraction du liquide adjacent. Pour un biocapteur tel que ceux que nous mettons au point, il vaudrait mieux pouvoir évaluer la sensibilité de la mesure à un (petit) changement d'indice de réfraction au voisinage immédiat (1 à 10 nm) de la surface. Ceci suggérerait de définir un test évaluant la variation du signal lorsqu'on attache diverses quantités bien contrôlées de sondes à la surface du capteur. Lorsqu'on modifie l'architecture d'un capteur, il faudrait être capable de séparer les effets liés à l'architecture optique et ceux liés aux procédures d'immobilisation des sondes comme nous l'avons fait pour les capteurs à fluorescence au chapitre 2. Nous n'avons pas tenté de faire de même ici.

Nous allons nous intéresser maintenant à la stabilité de cette structure pour la fonctionnalisation de surfaces en vue d'une étude de reconnaissance moléculaire (Biotine–streptavidine ou ADN sondes- cibles).

c) Stabilité chimique

La stabilité chimique de l'interface est étudiée par immersion pendant 6 heures dans 0,1 M H_2SO_4 et 0,1 M NaOH. Aucun changement dans le signal SPR n'est enregistré après ces traitements, ce qui indique que le film de $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}:\text{H}$ d'épaisseur 5 nm stabilise efficacement la surface métallique en évitant l'oxydation de la couche d'argent et supportera des étapes de fonctionnalisation chimique ultérieures. Des mesures de réflectivité de tels substrats stockés à l'air ou dans une solution de PBS ont montré une parfaite stabilité au cours du temps (mesures pendant un mois).

d) Caractérisations des couches

(1) Mesures électriques et électrochimiques

Des mesures électriques et électrochimiques ont été réalisées sur différentes structures. Lors de la mesure de la conductivité dans le plan, on mesure la résistance entre deux contacts pris à la surface de l'échantillon comme les contacts 1 et 2 schématisés figure 72. Dans ce cas, la résistance d'une structure multicouche telle que Ti/Ag/ a-Si_{1-x}C_x:H peut être décrite comme la résistance équivalente à la combinaison de trois résistances en parallèle. La résistance R du capteur est alors égale à : $1/R = 1/R_{Ti} + 1/R_{Ag} + 1/R_{a-Si_{1-x}C_x:H}$ (R_{Ti} étant la résistance de la couche de titane, R_{Ag} celle de la couche d'argent et $R_{a-Si_{1-x}C_x:H}$ celle de la couche d'alliage).

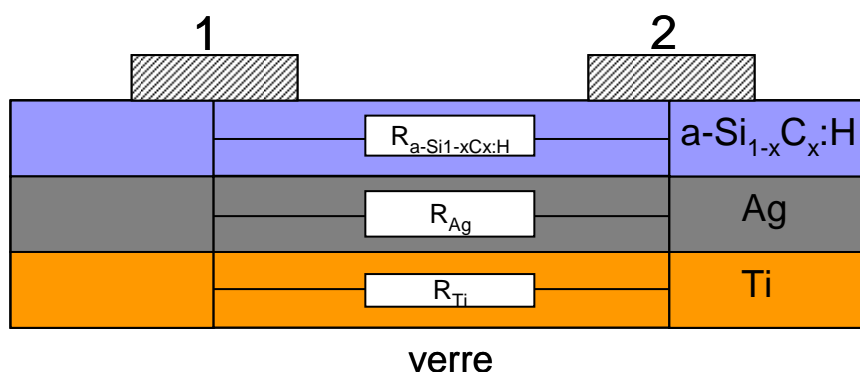


Figure 72 : Représentation schématique du substrat lors de la mesure de résistivité.

La figure 73 (a) montre l'évolution de la résistivité des structures hybrides en fonction de l'épaisseur pour différents taux de carbone (20%, 33% et 37%). La résistivité décroît avec le contenu en carbone et augmente avec l'épaisseur de la couche, atteignant une limite lorsque la couche est épaisse d'environ 20 nm. Ceci suggère que la résistivité globale est déterminée par la résistivité de la couche d'argent plutôt que par la résistivité du revêtement et que la conductivité de l'alliage est négligeable. Étant donné que la résistivité d'un film mince métallique est gouvernée par la diffusion aux joints de grains,⁴⁵ l'augmentation de la résistivité peut être attribuée à la dissolution du silicium amorphe carboné dans la couche d'argent durant le dépôt par PECVD. Les propriétés électrochimiques des différentes surfaces ont été mesurées par voltampérométrie cyclique en utilisant Fe(CN)₆⁴⁻ comme une sonde redox (Figure 73 b).

L'argent revêtu de 5 nm de $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$ présente une cinétique de transfert de charges similaire à celle de l'argent seul, tandis que lorsqu'il est revêtu de 5 nm de $a\text{-Si}_{0,67}\text{C}_{0,33}\text{:H}$ ou de $a\text{-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}\text{:H}$ la cinétique de transfert de charges de l'électrode est partiellement bloquée. L'effet bloquant peut être attribué au caractère semi-conducteur des alliages silicium-carbone amorphes et à la barrière de l'interface plutôt qu'à la valeur de la résistance que la couche rajoute en série dans le circuit (négligeable pour une couche de 5 nm). Dans le cas de la couche $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$, le faible effet bloquant pourrait être attribué à la présence de trous dans la couche et expliquer ainsi le comportement similaire à l'électrode d'argent. Cependant ceci n'est pas en accord avec la stabilité de ces substrats décrite précédemment. Nous avons aussi mesuré les propriétés électrochimiques de ces différents substrats après immersion pendant 6h dans des solutions d'acide (0,1M H_2SO_4) et de base (0,1M NaOH). Les cyclovoltamogrammes mesurés ne présentent aucune différence significative. Ceci permet de confirmer la stabilité de ces structures. L'augmentation de la résistivité suggère qu'il y a de l'interdiffusion entre la couche $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$ et l'argent lors du dépôt par PECVD.

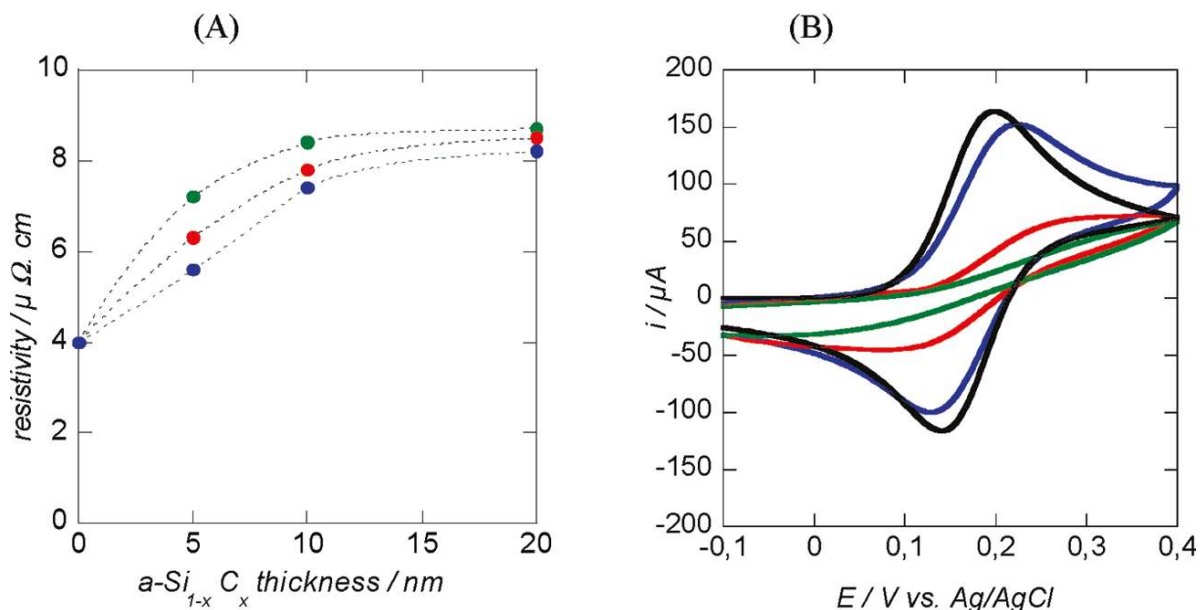


Figure 73 : (A) Mesures de résistivité des substrats en fonction de l'épaisseur de la couche de $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$; (B) les courbes de voltampérométrie cyclique dans une solution aqueuse de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (10 mM)/PBS (0,1 M) pour un film d'argent de 38 nm déposé sur du verre avec une sous-couche d'adhérence de titane de 5 nm, non revêtu (ligne noire) et revêtu de 5 nm d' $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$ (bleu), $a\text{-Si}_{0,67}\text{C}_{0,33}\text{:H}$ (rouge) et $a\text{-Si}_{0,80}\text{C}_{0,20}\text{:H}$ (vert) ; vitesse de balayage: $0,05 \text{ V s}^{-1}$, Surface de l'électrode= $0,07 \text{ cm}^2$.

(2) Caractérisation des surfaces par XPS

Comme l'illustre la figure 74, le spectre XPS d'une couche mince de 5 nm de $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$ déposé sur argent montre qu'une quantité limitée d'argent est présente près de la surface (le rapport apparent Ag/Si est égal à 0,37 après correction des facteurs de sensibilité atomique, alors qu'une atténuation complète du signal est attendue dans le cas d'une couche de silicium amorphe carboné exempt d'argent en prenant en compte la profondeur d'échappement des photoélectrons). Dans ce contexte, le faible effet bloquant observé dans les mesures électrochimiques peut être attribué à la densité d'états plus importante lorsque le taux de carbone augmente et à l'interdiffusion avec l'argent. Par ailleurs, nous avons constaté figure 69c, que les valeurs de n'' déterminées pour les structures SPR étaient plus importantes que celles pour des couches déposées directement sur verre, ce qui va dans le sens d'une interdiffusion entre le silicium amorphe carboné et la couche métallique.

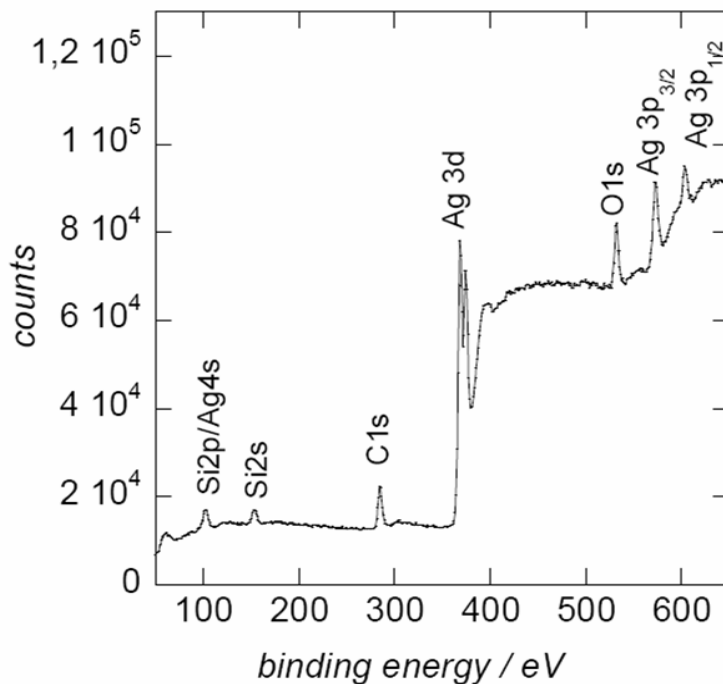


Figure 74 : Spectre d'analyse XPS après dépôt de 5 nm de la couche de $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$ sur une couche métallique d'argent.

En conclusion, en dépit de leurs bonnes performances lorsqu'elles sont utilisées dans les capteurs SPR, les couches $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$ montrent certaines limites. Les mesures électriques montrent un certain degré d'interdiffusion entre argent et silicium amorphe carboné lors du dépôt. Les mesures électrochimiques suggèrent que la couche pourrait être discontinue. Les

mesures XPS sont compatibles avec la présence de trous comme d'interdiffusion entre l'argent et la couche déposée, sans pouvoir faire la part entre ces deux contributions possibles. Toutefois, la bonne stabilité chimique des couches suggère que les trous dans la couche sont en quantité limitée et que l'effet d'interdiffusion domine.

e) Caractérisation du greffage et de l'immobilisation

(1) Caractérisation par XPS

Afin de greffer des biomolécules, l'hydrosilylation de l'acide undécylénique est faite sur des surfaces hydrogénées de 5 nm de $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$. Des mesures d'angle de contact et d'XPS nous ont permis de caractériser les structures avant et après fonctionnalisation.

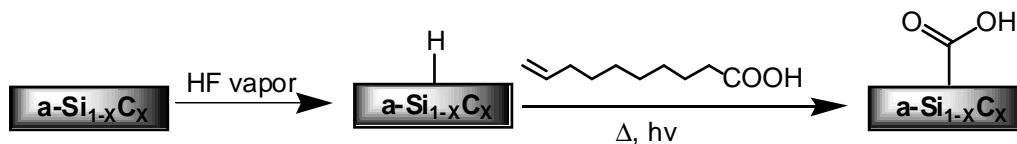


Figure 75 : Hydrogénation en surface d'un film mince de $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ et fonctionnalisation subséquente avec l'acide undécylénique.

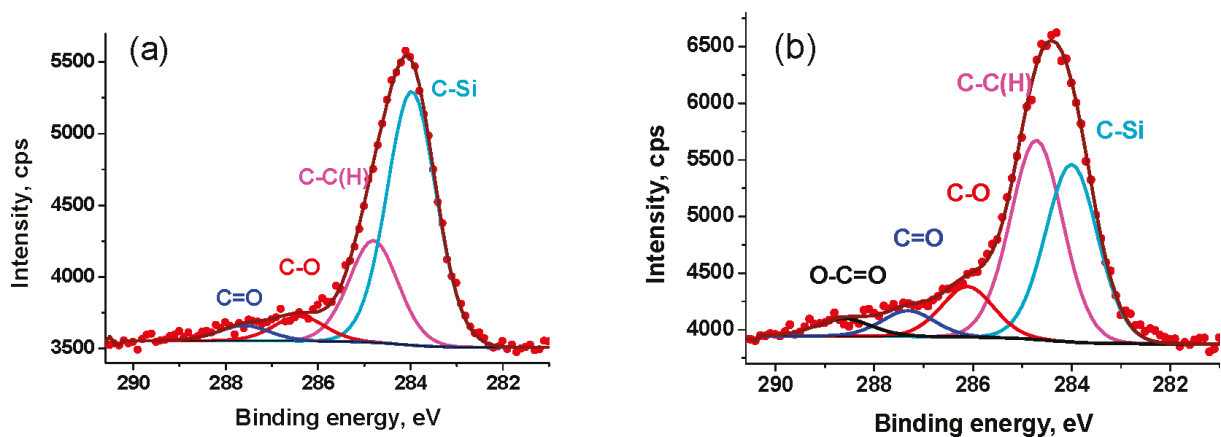


Figure 76 : Spectre XPS haute résolution de C1s d' $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}$ tel que déposé avant (a) et après réaction avec l'acide undécylénique (b).

Le spectre XPS en haute résolution de la bande C 1s est montré sur la figure 76 (a). Cette bande peut être décomposée en 4 composantes. Le pic principal est centré à 283,9 eV (64%), il est caractéristique des liaisons C-Si, tandis que le signal à 284,9 eV (26%) correspond aux liaisons $(\text{CH}_2)_n$. Le processus de formation du film de $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$ utilisant

de fortes concentrations de méthane, on peut penser que le matériau obtenu contient non seulement des groupements Si-CH₃ mais également des groupements (CH₂)_n; en d'autres termes, pour ces fortes proportions de carbone, on arriverait à la limite du régime basse puissance lors du dépôt. Les signaux à 286,4 et 287,6 eV correspondant aux structures C-O (4%) et C=O (6%) révèlent la présence d'une contamination organique de la surface due à l'adsorption d'hydrocarbures. Cette contamination peut aussi expliquer (en bonne partie au moins) la présence du pic à 284,9 eV. La présence de tels produits peut s'expliquer par le fait que la surface a été préparée plusieurs jours avant d'être introduite dans la chambre XPS.

Le spectre C1s en haute résolution de a-Si_{0,63}C_{0,37}H après greffage de groupements carboxydécyles, montré sur la figure 76b, peut être décomposé en cinq composantes différentes. Le pic principal centré à 284,7 eV (43%) est caractéristique des groupements CH₂ des chaînes alkyles et des structures (CH₂)_n, tandis que les autres pics à 284,0 (37%), 286,1 (10%) et 287,3 eV (5%) correspondent aux fonctions C-Si, C-O et C=O. Une bande additionnelle à 288,6 eV caractéristique des liaisons O-C=O est aussi présente. L'attestation de cette contribution et l'augmentation notable de celle à 284,7 eV, maintenant plus importante que celle à 284 eV, sont des signes tangibles de la fonctionnalisation de la surface avec l'acide undécylénique.

Le groupe fonctionnel acide carboxylique est particulièrement utile pour sa réactivité chimique et ses propriétés de mouillage.^{46,47} Les substrats SPR fonctionnalisés par un groupement carboxyle permettent un couplage efficace avec des ligands terminés par une amine suivant le principe montré sur la Figure 77.

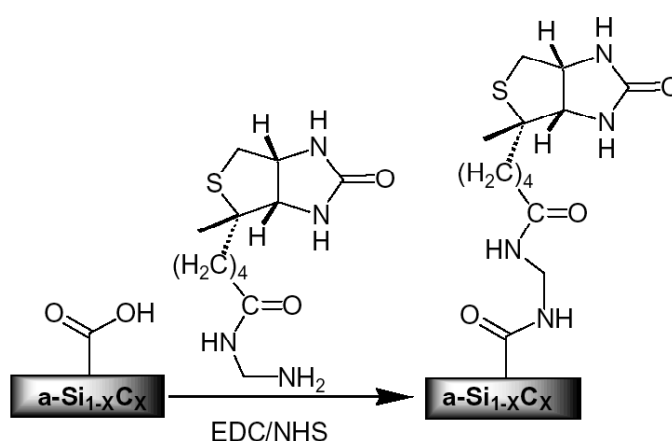


Figure 77 : Représentation schématique du procédé de greffage de la biotine à terminaison NH₂ sur la surface à terminaison acide à l'aide d'un couplage peptidique EDC / NHS.

(2) Caractérisation par IR-ATR

En complément de l'analyse XPS, des mesures IR-ATR ont permis de caractériser les différentes étapes de fonctionnalisation de la couche $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{H}$. La figure 78 (a) montre les spectres infrarouge en polarisations p et s d'une couche mince de $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{H}$ (20 nm) déposée sur prisme ATR. Le pic intense à 2100 cm^{-1} confirme la présence de nombreuses liaisons Si-H dans la masse du matériau. Les pics à 2890 et 2953 cm^{-1} et entre 1250 et 1500 cm^{-1} suggèrent que le carbone présent dans la couche est essentiellement sous forme CH_3 comme attendu pour un matériau déposé en « régime basse puissance ». Après hydrosilylation de l'acide undécylénique, les modes vibrationnels des liaisons C=O à 1711 cm^{-1} et ceux des CH_2 à 2855 et 2930 cm^{-1} sont clairement visibles sur la figure 78 b. Comme pour l'XPS cette analyse permet de confirmer le greffage de groupements carboxyles à la surface. Par une analyse quantitative, on peut déterminer la densité de molécules acides qui est dans ce cas égale à $2 \cdot 10^{13}\text{ cm}^{-2}$. Cette valeur est plus faible que celle obtenue dans le cas du silicium cristallin.^{36,48}

L'apparition des pics à 1744 , 1788 et 1816 cm^{-1} caractéristiques des modes de vibration des liaisons C=O de l'ester de succinimidyle montre que les groupements acides sont ensuite activés en ester de succinimidyle (ester NHS) (figure 78). La quantité d'ester, égale à $1 \cdot 10^{13}\text{ cm}^{-2}$, a été déterminée aussi de manière quantitative. Nous avons montré que l'activation se faisait plus rapidement par la voie anhydride (chapitre 1, figure 12). Pour de telles couches de silicium amorphe carboné, la formation de l'anhydride est plus difficile du fait de la présence des groupements CH_3 , qui éloigne les chaînes acides greffées les unes des autres comme lors des expériences représentées figure 24. Le rendement n'est donc pas optimal pour de telles interfaces (~50%). L'amidation des sites esters par la molécule N-(2-aminoéthyl) biotine permet l'accrochage covalent de la biotine à la surface, caractérisé par la présence des pics à 1650 et 1550 cm^{-1} .

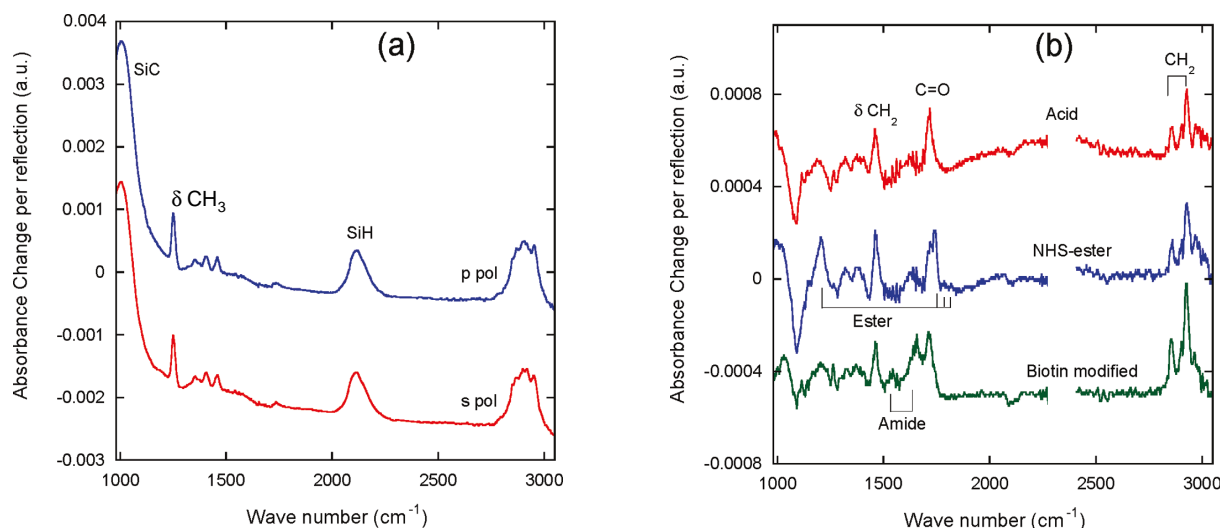


Figure 78 : (A) Spectres ATR-FTIR d'un film de $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{H}$ 20 nm déposé sur un prisme de silicium, enregistré avec des polarisations p (bleu) et s (rouge), le spectre de référence étant la surface du prisme nu hydrogéné; (B) Spectres ATR-FTIR du même film de $a\text{-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}\text{H}$ modifié avec l'acide undécylénique (rouge), réaction avec EDC/NHS (bleu), et amidation avec la N-(2-aminoéthyl)biotine (vert).

f) Mesure par SPR de l'interaction biotine-streptavidine

Les systèmes avidine-biotine ont souvent été utilisés comme systèmes d'assemblage par affinité pour le développement de biocapteurs.⁴⁹ De tels systèmes peuvent être facilement utilisés ici en couplant un groupement biotine situé en position terminale sur un groupement amino-alkyle (biotine-NH₂).

D'après les courbes de réflectivité (Figure 79a), la liaison de la biotine modifiée NH₂ à la surface résulte en un changement d'angle de la résonance de plasmons de surface de 0,12° que l'on sait modéliser par une variation d'épaisseur équivalente de 3,1nm, ce qui est cohérent avec la dimension moléculaire de la biotine non modifiée (0,52 nm x 1,00 nm x 2,10 nm). La reconnaissance moléculaire biotine-streptavidine (5,4 nm x 5,8 nm x 4,8 nm)^{50,51} est suivie par SPR et la cinétique de la réaction de couplage est montrée sur la Figure 79b. Comme attendu, une forte hausse (changement d'angle de 0,25°) est observée pour les interfaces modifiées par la biotine tandis que seulement une petite augmentation a été observée pour celles non modifiées. Le changement d'angle de 0,25° correspond à l'épaisseur de la couche de streptavidine d'environ 6,3 nm ou 2,5 ng/mm².⁵² En répétant l'expérience pour diverses concentrations une limite de détection 6 ng/mL a été déterminée.

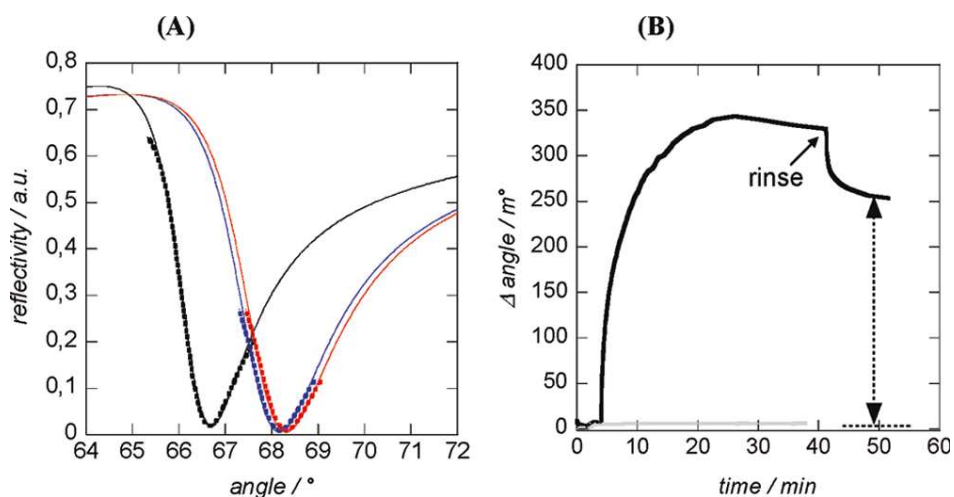


Figure 79 : (A) Courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence de substrats en argent (noir) revêtus avec 5 nm d'a-Si_{0,63}C_{0,37} à terminaison acide (bleu) et modifiés avec la biotine (rouge) dans du PBS. Valeurs obtenues expérimentalement (courbes en pointillés) comparées aux courbes de RPS théoriques (courbes en trait plein) calculées grâce à WinSpall 2.0, (B) Cinétique associée à l'interaction de l'avidine (10 $\mu\text{g/mL}$) avec une surface Ag/a-Si_{0,63}C_{0,37}:H modifiée par la biotine (noir), et avec une surface Ag/a-Si_{0,63}C_{0,37} non modifiée (gris).

C. Fluorescence couplée au plasmon de surface : Applications aux puces à ADN

1. Contrôle de la chimie de surface

En vue d'étudier l'interaction entre brins d'ADN, nous avons optimisé la structure pour bénéficier de la sensibilité requise et d'une chimie de surface bien contrôlée. Les couches minces $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ ne sont parfaitement homogènes ni au plan macroscopique (figure 45), ni au plan microscopique (voir B.3.d). Pour combiner les avantages d'une couche de faible indice (favorable pour la détection SPR) et d'une couche homogène et performante pour l'immobilisation des sondes, des structures multicouches (37% et 20%) ont été étudiées puis caractérisées par SPR. La figure 80a montre les courbes de réflectivité pour différentes structures (Ag ; 5nm $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}/\text{Ag}$; 2 nm $a\text{-Si}_{0.8}\text{C}_{0.2}\text{:H}/3$ nm $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}/\text{Ag}$; 3 nm $a\text{-Si}_{0.8}\text{C}_{0.2}\text{:H}/3$ nm $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}/\text{Ag}$). On note que les courbes de réflectivité pour les structures avec les couches minces sont semblables, seul l'angle de résonance varie. Au vu de ces résultats, nous privilégierons la structure 3 nm $a\text{-Si}_{0.8}\text{C}_{0.2}\text{:H}/3$ nm $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}/\text{Ag}$ (figure 80 B), qui nous permet de pouvoir bien contrôler le plasma (9 s de temps de dépôt).

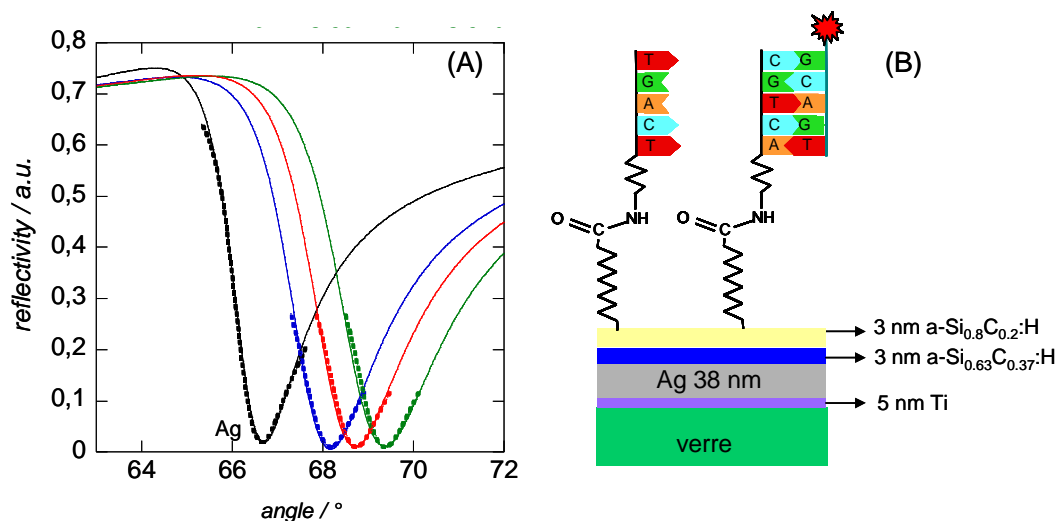


Figure 80 : (A) Courbes de réflectivité pour différentes structures : Ag (noir); 5nm $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H} / \text{Ag}$ (bleu); 2 nm $a\text{-Si}_{0.8}\text{C}_{0.2}\text{:H} / 3$ nm $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H} / \text{Ag}$ (rouge); 3 nm $a\text{-Si}_{0.8}\text{C}_{0.2}\text{:H} / 3$ nm $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H} / \text{Ag}$ (vert). (B) Représentation schématique du capteur choisi pour la suite de l'étude.

2. Calcul théorique de la réflectivité et du gain en fluorescence

Afin de bénéficier de la sensibilité nécessaire pour mesurer des constantes d'interaction de la réaction d'hybridation entre brins d'ADN, nous avons exploité l'exaltation de la fluorescence couplée au plasmon de surface, technique couramment appelée SPFS (Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy).⁷ De nombreuses recherches ont montré que les capteurs SPFS étaient bien plus sensibles que les capteurs SPR. Knoll a montré qu'il était possible d'atteindre une limite de détection de 500 attomolaires par SPFS.⁵³ Nous avons d'abord modélisé l'intensité du champ électromagnétique pour la structure décrite figure 80 pour un capteur à base d'or (50 nm) ou d'argent (38 nm). La figure 81 montre les courbes de réflectivité et le facteur d'augmentation de la fluorescence identifié au carré du champ excitateur pour les capteurs à base d'argent (vert) et or (bleu). Comme pour des capteurs sans silicium amorphe, le facteur d'exaltation calculé pour des couches minces déposées sur argent est 3,5 fois plus important que pour des couches déposées sur or (voir figure 65). On note aussi que pour ces structures le signal plasmon est de meilleure qualité sur argent que sur or. Ainsi avons-nous décidé de faire les mesures SPFS essentiellement sur des substrats d'argent.

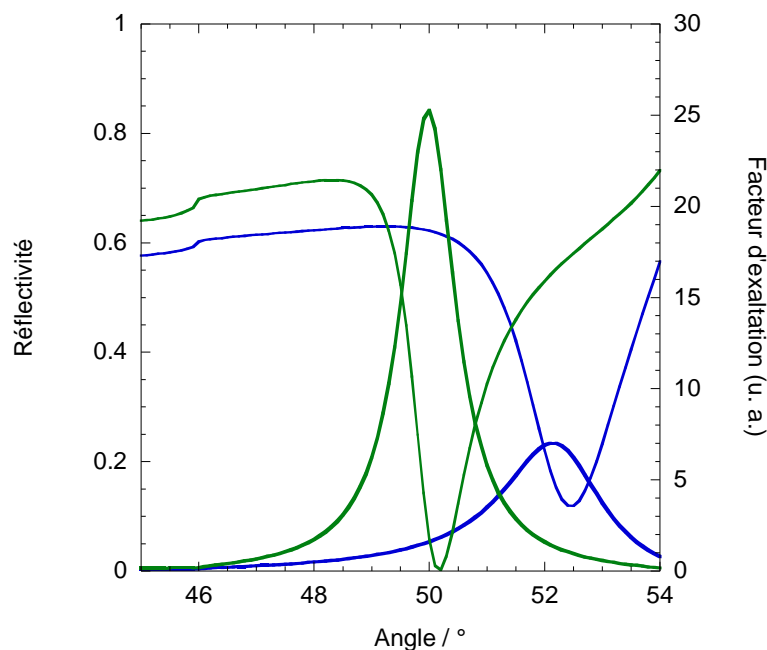


Figure 81 : Courbes théoriques de la réflectivité et de l'intensité du carré du champ dans l'eau pour 2 capteurs, 3 nm $a\text{-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}:\text{H}$ / 3 nm $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}:\text{H}$ / Ag (vert) et 3 nm $a\text{-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}:\text{H}$ / 3 nm $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}:\text{H}$ / Au (bleu).

3. Modes opératoires

a) Immobilisation des sondes

En partant de surfaces activées, la sonde G-ON (non marquée 25-mer [5' (CH₂)₆-NH₂-AAC-GCC-CAT-CTT-AAA-ATC-GAC-GCC-T 3']) est diluée à 5 μM ou 500 nM 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 μL par cm⁻² pendant 14-16 h. Après dépôt, les sites activés non amidés sont bloqués avec de l'éthanolamine (5 10⁻² M, pendant 15 min), puis dans de l'eau ultrapure (Millipore) et les lames sont séchées sous un flux d'azote.

b) Hybridation

La surface est alors exposée successivement à des solutions de concentration de 5 nM à 500 nM contenant l'oligonucléotide Cy5- \overline{ON} , complémentaire des sondes, G-ON (5'Cy5 [AGG-CGT-CGA-TTT-TAA-GAT-GGG-CGT-T 3']) à température ambiante pendant 20 minutes dans un tampon 150 mM de phosphate. De la même manière, des cibles contenant des mésappariements ont été utilisées, une séquence avec un seul mésappariement 5'Cy5 [AGG-CGT-CGA-TTT-AAA-GAT-GGG-CGT-T 3'] nommée Cy5- \overline{ON} ' et une séquence en contenant 4, 5'Cy5 [AGG-CGT-GCA-TTT-TAA-GTA-GGG-CGT-T 3'] nommée Cy5- \overline{ON} '.

c) Mesure de la fluorescence

Les mesures de réflectivité et de fluorescence sont réalisées à l'aide du montage ci-dessous. Afin de mesurer une constante d'affinité K_d , nous avons mesuré des cinétiques d'hybridation en temps réel que nous avons pu analyser selon le modèle de l'isotherme de Langmuir.⁵⁴⁻⁵⁶

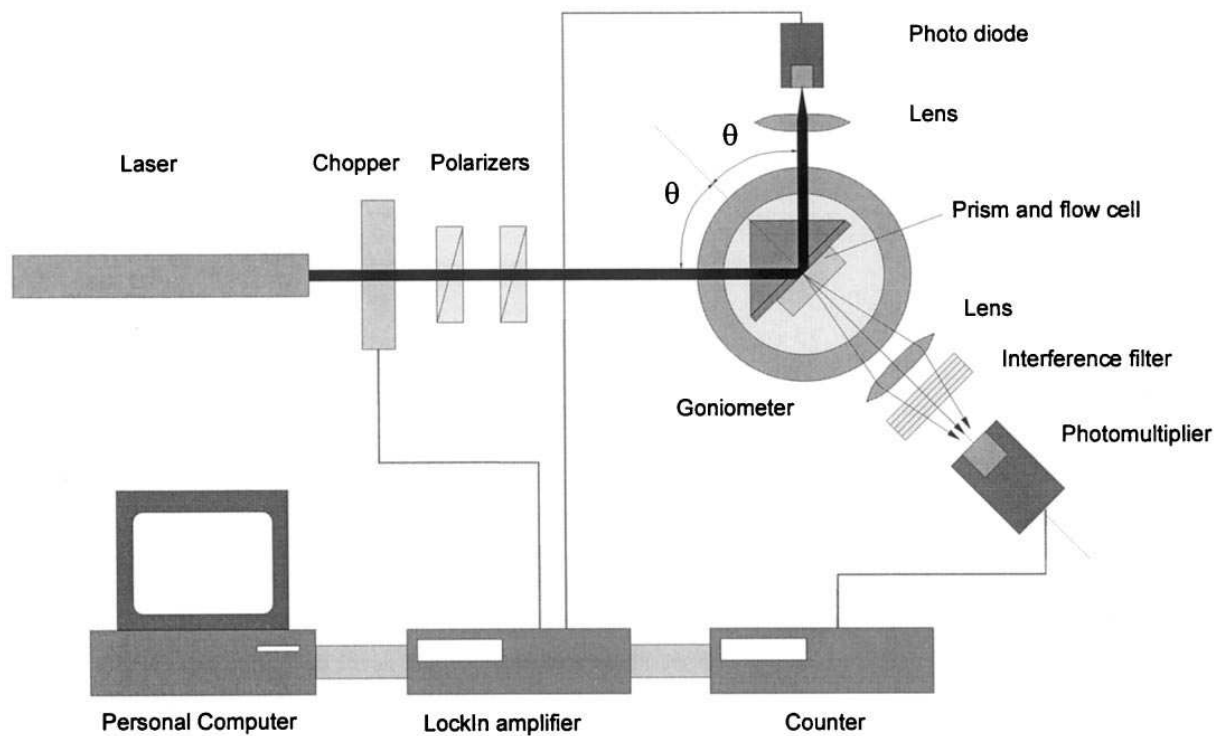


Figure 82 : Représentation schématique du montage expérimental permettant la mesure simultanée de la réflectivité en configuration Kretschmann grâce à la photodiode et de la fluorescence via le photomultiplicateur.⁷

4. Détermination de constantes de dissociation

a) Isotherme de Langmuir

Dans le cadre de cette étude, nous avons analysé nos données d'après l'isotherme de langmuir, largement adoptée pour de telles études.⁵⁷⁻⁶¹ On suppose l'adsorption d'espèces neutres sur une surface présentant une quantité finie de site d'adsorption pouvant recevoir chacun une seule espèce. Si on considère une concentration N_c d'ADN cible C, une concentration superficielle N_s d'ADN sonde S, et une concentration superficielle N_h d'ADN double brin H, nous avons :

$$\frac{\partial N_h}{\partial t} = k_{on} N_c (N_s - N_h) - k_{off} N_h \quad (19)$$

avec k_{on} et k_{off} les constantes d'association et de dissociation de la réaction



A l'équilibre thermodynamique $\frac{\partial N_h}{\partial t} = 0$, atteint après un temps de l'ordre de $1/(k_{on}N_C + k_{off})$, nous obtenons l'isotherme de Langmuir :

$$\frac{N_h}{N_s} = \frac{K_a N_c}{1 + K_a N_c} \quad (20)$$

où K_a est la constante d'affinité et est égale à k_{on}/k_{off} . On peut aussi inverser l'expression ci-dessus et, plutôt qu'une constante d'équilibre d'association (K_a), obtenir une constante de dissociation (K_d) qui a l'avantage de s'exprimer en (mol L^{-1}). Cette constante est souvent utilisée pour exprimer l'affinité d'un ligand pour son récepteur, indication importante pour l'emploi thérapeutique des agonistes et antagonistes : un faible K_d se traduit par une forte affinité du récepteur pour son ligand, ce qui signifie également qu'une très faible concentration du ligand (agoniste ou antagoniste) sera efficace.

b) Etude de l'hybridation par SPFS

(1) surface 100% acide

A partir de surfaces 100% acides, nous avons immobilisé les sondes G-ON à partir d'une solution concentrée à $5 \mu\text{M}$ et mesuré l'intensité de la fluorescence au cours du temps pour des hybridations successives dans des solutions de cibles Cy5- $\overline{\text{ON}}$ de différentes concentrations (5, 25, 50, 100 et 250 nM), sans lavages intermédiaires (figure 83 a). A l'équilibre, nous avons à chaque fois mesuré le signal de réflectivité et de fluorescence (figure 83b). On peut se rendre compte ici de la différence de sensibilité entre le SPR et le SPFS. En effet la différence entre les courbes de fluorescence est bien plus appréciable que celle observée pour les courbes de réflectivité.

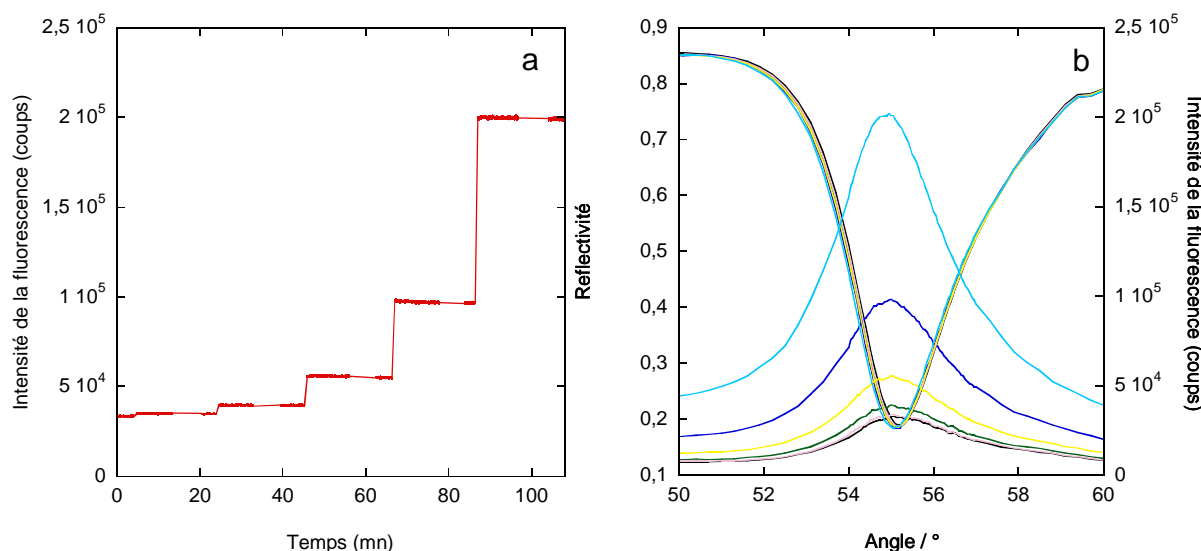


Figure 83 : (a) Cinétique d'hybridation mesurée par fluorescence pour les sondes G-ON (5 μ M) hybridées successivement avec les cibles Cy5- $\overline{\text{ON}}$ (5 , 25, 50, 100 et 250 nM) ; (b) courbes de réflectivité et de fluorescence pour chaque étape de l'hybridation: PBS (noir), 5 nM (rose), 25 nM (vert), 50 nM (jaune), 100 nM (bleu) et 250 nM (cyan).

Sur la figure 83, on note que l'équilibre est atteint très rapidement pour chaque hybridation. La figure 84 (courbe rouge) montre la variation du signal de fluorescence (cinétique d'hybridation) mesurée dans une solution de cibles concentrée à 5 nM. Le régime transitoire est difficilement résolu, et après 30 secondes le palier est atteint. Ce temps correspond à la durée nécessaire pour remplacer la solution tampon par la solution contenant les brins complémentaires, ce qui signifie que dans ces conditions l'hybridation est quasi-instantanée. Pour une concentration en sondes plus faible obtenue en immobilisant les sondes à partir d'une solution concentrée à 500 nM, la cinétique est ralentie et l'on retrouve un comportement proche de celui observé au chapitre 2 figure 57 (quasi premier ordre). De façon surprenante, l'intensité de fluorescence pendant l'hybridation est plus faible lorsque les sondes ont été immobilisées à partir d'une solution à 5 μ M plutôt qu'à 500 nM. Cela suggère que dans le premier cas, seule une partie des sondes est hybridée et qu'ensuite les gênes stériques limitent la réaction, alors que dans le second cas le rendement d'hybridation est bien plus élevé. Par conséquent, nous avons par la suite décidé d'immobiliser les sondes à partir de solutions concentrées à 500 nM.

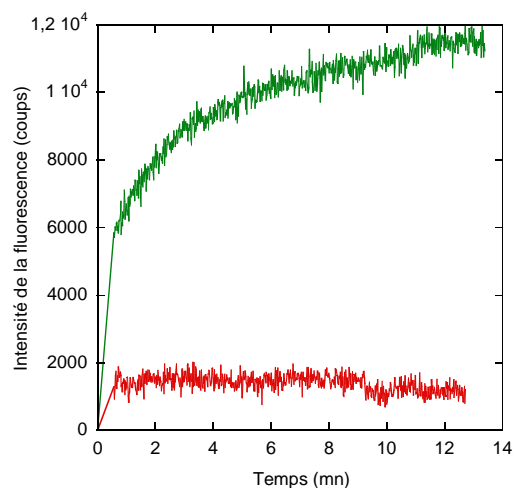


Figure 84 : Cinétique d'hybridation des sondes G-ON 5 μ M (rouge) et 500 nM (vert) avec les cibles Cy5- $\overline{\text{ON}}$ 5 nM.

L'immobilisation des sondes sur une surface 100% acide à partir d'une solution concentrée à 500 nM permet de suivre les hybridations successives avec une sensibilité environ 4 fois plus importante que lorsque les sondes étaient immobilisées à partir de solutions concentrées à 5 μ M, comme le montre la comparaison des figures 83 et 85. En effet pour une hybridation à 250 nM sur une surface avec des sondes immobilisées à 5 μ M, le signal est égal à $2 \cdot 10^5$ coups par seconde alors qu'il est égal à $9 \cdot 10^5$ coups par seconde pour une surface avec des sondes immobilisées à 500 nM.

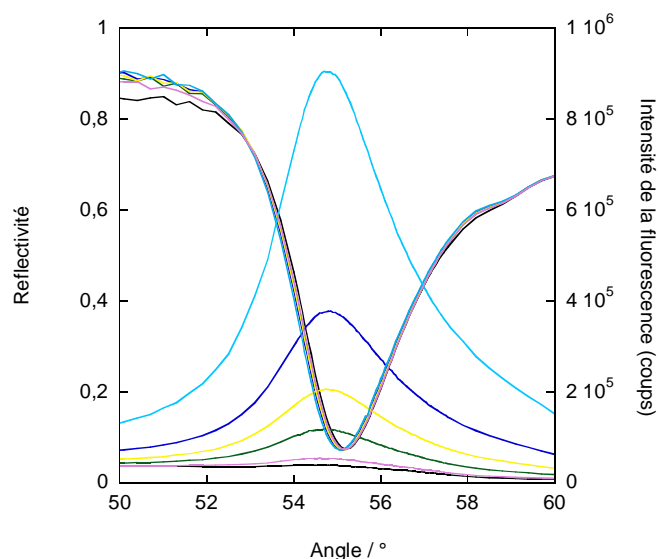


Figure 85 : Courbes de réflectivité et de fluorescence pour une surface avec les G-ON (500 nM) hybridées successivement avec les cibles Cy5- $\overline{\text{ON}}$: 5 nM (rose), 25 nM (vert), 50 nM (jaune), 100 nM (bleu) et 250 nM (cyan).

Comme au chapitre 2, nous avons optimisé les substrats en préparant des surfaces acides diluées dans le décène pour favoriser l'hybridation. La figure 86 montre les différentes cinétiques d'hybridation dans des solutions de cibles concentrées à 5 nM pour des surfaces acides 100%, 33%, 25% et 15%, activées et amidées avec des sondes concentrées à 500 nM. Alors que pour les trois premières surfaces, les hybridations suivent des cinétiques du premier ordre, l'hybridation des sondes immobilisées sur la 15% est instantanée, comme si tous les sites activés avaient été amidés et qu'ensuite tous les sites accessibles soient facilement hybridés. Comme sur la figure 84, le signal ne suit pas une cinétique de premier ordre, mais de façon remarquable l'intensité de la fluorescence obtenue à partir d'une surface acide 15% (cinétique instantanée) est significativement supérieure à celles obtenues à partir de surfaces acides plus concentrées (cinétique de premier ordre). L'effet observé ici est beaucoup plus net que celui observé au chapitre 2 pour des sondes immobilisées à partir de solutions concentrées à 5 μ M (figure 60). Ceci suggère que dans le cas des surfaces préparées à partir de couches acides à 15 %, l'accessibilité des sondes à l'hybridation est meilleure.

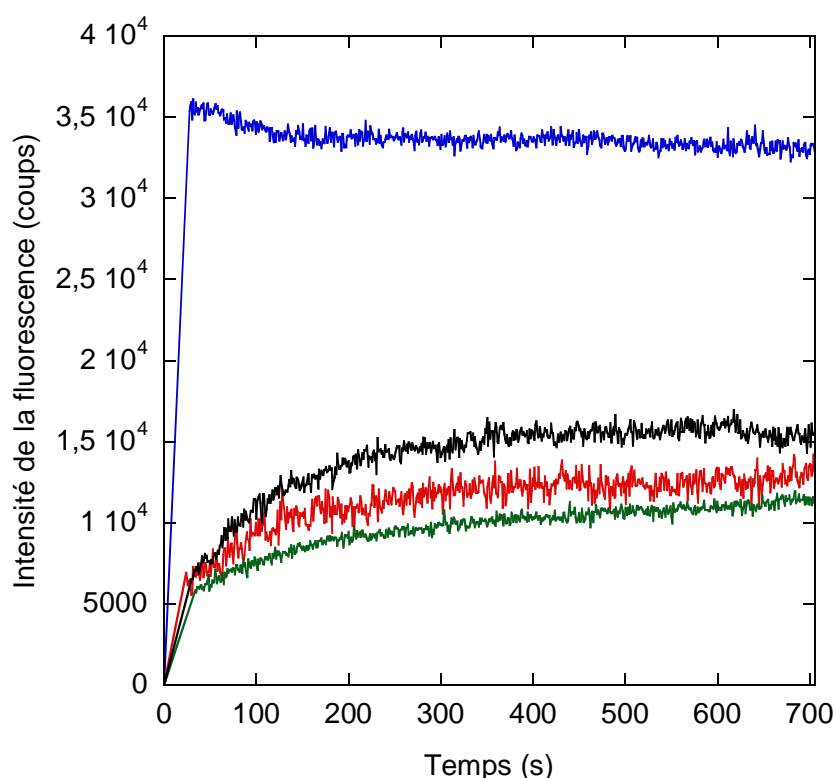


Figure 86 : Cinétique d'hybridation des sondes G-ON 500 nM avec les cibles Cy5- $\overline{\text{ON}}$ 5 nM pour différentes surfaces : 100% acide (vert) ; 33% (rouge) ; 25% (noir) et 15% (bleu).

Nous avons donc réalisé pour le capteur à base d'une couche acide 15% différentes hybridations successives (pour des cibles concentrées de 5 nM à 500 nM). La figure 87 montre les valeurs de fluorescence obtenues à l'équilibre ainsi que la courbe d'ajustement à une isotherme de Langmuir permettant de déterminer la constante d'association. Dans le cas de cette surface la constante K_d est égale à $1,8 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Cette valeur est plus importante que celle observée dans la littérature, ce qui pourrait être lié à la valeur élevée de la densité des sondes sur nos surfaces.⁶¹ Les valeurs de K_d déterminées d'après nos mesures souffrent toutefois de ne couvrir que la partie de la courbe de Langmuir correspondant aux basses concentrations. Elles gagneraient en fiabilité en répétant les expériences dans une gamme de concentrations des cibles supérieures à K_d .

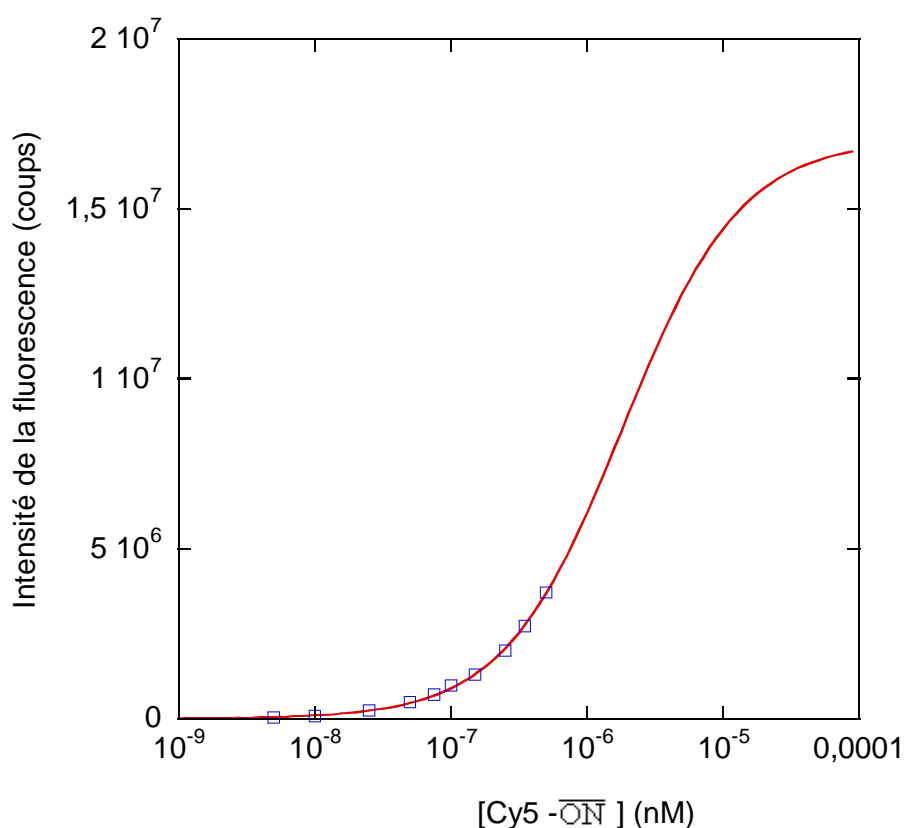


Figure 87 : Intensité de fluorescence maximale atteinte à l'équilibre en fonction de la concentration des cibles Cy5-ON (bleu) et courbe d'ajustement (rouge).

Nous avons ensuite utilisé ces capteurs pour identifier la présence de mésappariements sur les sondes complémentaires. La figure 88 montre les cinétiques d'hybridation des séquences Cy5-ON, Cy5-ON', Cy5-ON'' à 5 nM avec les sondes G-ON (500 nM). On

note que les cinétiques ont la même allure mais la fluorescence dépend du nombre de mésappariements. En effet pour des brins complémentaires la fluorescence est égale à 34000 coups par seconde contre 24000 pour un mésappariement et 10500 pour 4 mésappariements.

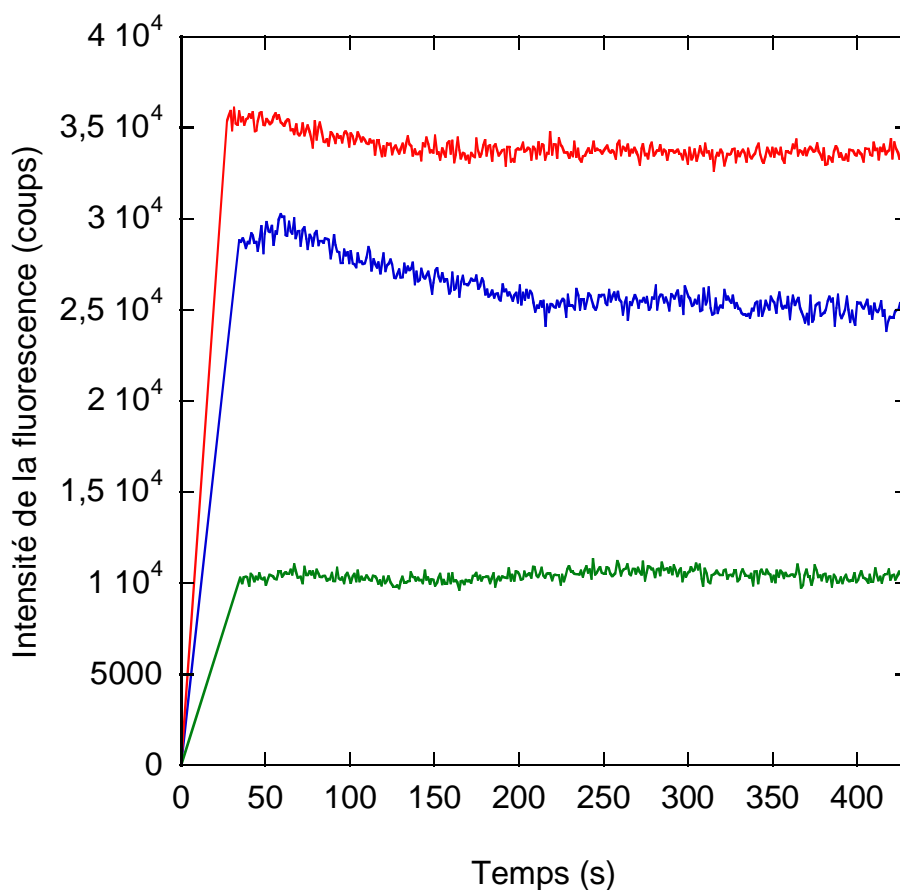


Figure 88 : Cinétiques d'hybridation des sondes G-ON 500 nM (vert) avec les cibles Cy5-ON (rouge) ; Cy5-ON' (bleu) ; Cy5-ON'' (vert) à 5 nM.

Nous pouvons déterminer les constantes de dissociation pour les différentes cibles contenant ou non des mésappariements par des hybridations successives (à des concentrations de cibles croissantes à 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 350 et 500 nM). La figure 89 montre les isothermes pour les différentes cibles. Les constantes de dissociation déterminées par ajustement des valeurs obtenues à l'isotherme de Langmuir sont rassemblées dans le tableau 5. Comme attendu, les constantes de dissociation sont plus grandes lorsqu'il y a des mésappariements (plus il y a de mésappariements dans les séquences, plus il faut augmenter la concentration des cibles pour « forcer » l'appariement). Cependant la valeur théorique de la fluorescence déterminée au palier est aussi plus importante, ce qui n'est pas intuitif (si on

force l'hybridation, on s'attend à trouver un niveau de fluorescence équivalent dans la mesure où les sondes sont immobilisées avec la même concentration superficielle). Dans le cas présent, les valeurs du plateau de fluorescence obtenues à partir des ajustements paraissent même aberrantes, car on voit mal pourquoi le niveau de fluorescence atteint en hybridation de séquences présentant des mésappariements serait plus élevé que lorsque la correspondance est parfaite. Il s'agit sans aucun doute ici d'imprécision de la procédure liée au fait qu'on ne dépose que des valeurs aux faibles concentrations.

Pour obtenir des valeurs réalistes, il faut donc ajuster les courbes en imposant le même niveau de fluorescence final. Si on ajuste les trois courbes en même temps, on trouve un niveau de fluorescence final égal à $2 \cdot 10^7$ coups. On ajuste alors les isothermes indépendamment les unes des autres en imposant pour la valeur palier le même niveau de fluorescence à $2 \cdot 10^7$ coups. Comme avec l'ajustement sur la figure 89, on trouve des constantes de dissociation plus élevées lorsqu'il y a des mésappariements (Tableau 6). La différence dans les constantes de dissociation est plus faible que lors de l'ajustement précédent mais sans doute plus réaliste aussi. Ces valeurs permettent tout de même de différencier les brins complémentaires des brins contenant des mésappariements.

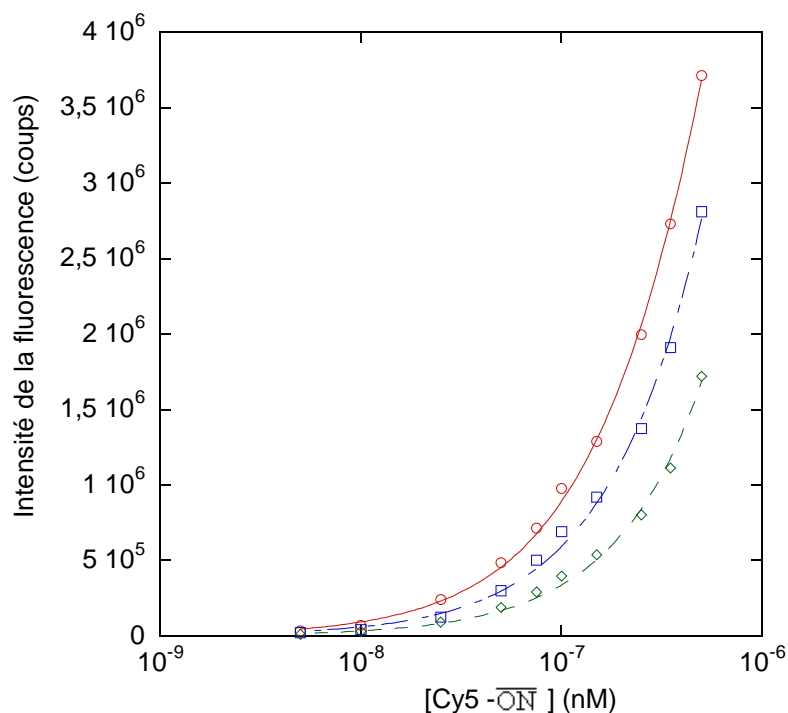


Figure 89 : Intensité de fluorescence maximale atteinte à l'équilibre en fonction de la concentration des cibles avec leur courbe d'ajustement Cy5-ON (rouge), Cy5-ON' (bleu) ; Cy5-ON'' (vert).

	Cy5- $\overline{\text{ON}}$	Cy5- $\overline{\text{ON}}$ '	Cy5- $\overline{\text{ON}}$ ''
K_d (mol/L)	$1,8 \cdot 10^{-6}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
Fluorescence au palier (coups)	$1,7 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^8$

Tableau 5 : Valeur de la constante de dissociation et de la fluorescence théorique au palier de l'isotherme pour les différentes cibles (ajustement libre).

	Cy5- $\overline{\text{ON}}$	Cy5- $\overline{\text{ON}}$ '	Cy5- $\overline{\text{ON}}$ ''
K_d (mol/L)	$2,2 \cdot 10^{-6}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$	$5,6 \cdot 10^{-6}$

Tableau 6 : Valeur de la constante de dissociation pour les différentes cibles (ajustement avec contrainte d'une même valeur au plateau) obtenue en fixant à la même valeur ($2 \cdot 10^7$ coups) la valeur de fluorescence au palier de la courbe de Langmuir.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré comment les alliages silicium-carbone amorphes, déposés en couche mince, permettent d'augmenter la sensibilité des capteurs SPR de façon significative en fonction de l'indice de la couche. En effet, un capteur 5 nm $a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}$ /Ag est 2,8 fois plus sensible qu'un capteur SPR à base d'or et 2 fois plus sensible qu'un capteur à base d'argent seul. Une étude de stabilité chimique a montré qu'il était possible d'utiliser ces substrats pour des applications biologiques. Même si nous suspectons la présence d'interdiffusion entre la couche métallique et la couche de silicium amorphe, nous avons pu démontrer, par XPS et infrarouge, que l'on peut greffer sur la couche amorphe de façon covalente des monocouches acides, qui peuvent ensuite être activées et amidées pour l'étude d'interactions biologiques comme entre la biotine et la streptavidine.

Une étude par fluorescence nous a permis d'optimiser la sensibilité en nous intéressant à l'homogénéité de la chimie de surface et à la densité des sondes. Ainsi nous avons montré qu'un substrat d'argent recouvert d'une double couche d'alliages silicium-carbone amorphes $\text{Ag}/a\text{-Si}_{0,63}\text{C}_{0,37}\text{:H}/a\text{-Si}_{0,8}\text{C}_{0,2}\text{:H}$ fonctionnalisée avec un mélange (15% acide / 85% décène) permet d'augmenter la sensibilité d'un facteur 3.5. Ces substrats, en plus d'être très sensibles, sont suffisamment sélectifs pour différencier aisément des cibles complémentaires de cibles contenant un mésappariement.

Il serait cependant intéressant de procéder à des études de cinétique d'hybridation par SPFS en faisant varier la densité de sondes sur une surface 15% acide, ainsi que la concentration superficielle des molécules cibles. Des mesures de fluorescence couplées à des mesures infrarouge sur silicium amorphe permettraient de mieux comprendre les cinétiques mesurées et les comportements observés.