

# Fonctionnalisation de surfaces de silicium

Introduction .....	19
A. Préparation de surfaces hydrogénées .....	20
1. Choix du substrat.....	20
2. Hydrogénation de la surface.....	22
a) Introduction .....	22
b) Mode opératoire .....	23
c) Caractérisation par microscopie à force atomique .....	24
d) Caractérisation par spectroscopie infrarouge .....	24
B. Préparation de surfaces acides.....	27
1. Greffage chimique.....	27
a) Introduction .....	27
b) Mode opératoire .....	28
c) Caractérisation par microscopie à force atomique .....	29
d) Caractérisation par spectroscopie infrarouge .....	30
C. Préparation de surfaces activées.....	33
1. Introduction .....	33
2. Mécanisme réactionnel.....	33
3. Etude quantitative de la réaction d'activation .....	38
a) Optimisation des concentrations et de la température.....	38
b) Effet de la température .....	40
c) Etude cinétique de l'activation par mesure infrarouge in situ.....	41
4. Conclusion : Mode opératoire choisi .....	47
D. Réaction d'amidation .....	48
1. Introduction .....	48
2. Amidation par l'hexylamine.....	48
3. Amidation par l'éthanolamine.....	49
Conclusion.....	52
Bibliographie.....	53

« Patience et longueur de temps font plus que force ni que rage »  
La Fontaine

# Introduction

Les années 1990 ont connu deux progrès spectaculaires dans la préparation des surfaces de silicium. Les travaux initiés par Chabal<sup>1</sup> ont permis de mettre au point des techniques de préparation de surfaces (111) de silicium, hydrogénées (vierges d'oxyde), atomiquement planes et ordonnées à grande échelle. Par ailleurs, les travaux de Chidsey<sup>2</sup> ont initié un vaste effort ayant abouti à la mise au point de nombreuses techniques de greffage de monocouches de molécules organiques sur la surface hydrogénée du silicium, permettant ainsi sa fonctionnalisation. Aujourd'hui, le silicium est donc considéré comme un substrat idéal pour des études de chimie de surface contrôlées. Parmi les différentes possibilités de le fonctionnaliser, l'hydrosilylation est apparue comme une méthode de greffage particulièrement intéressante grâce à la formation de la liaison Si-C, très robuste, et à la grande versatilité de la méthode.

Dans ce chapitre, nous présenterons les différentes étapes de fonctionnalisation qui permettent l'accrochage de biomolécules sur une surface de silicium. Nous décrirons dans un premier temps les surfaces hydrogénées et les surfaces terminées par des monocouches acides, avant de nous intéresser aux étapes d'activation et d'amidation.

La microscopie à force atomique et la spectroscopie infrarouge seront utilisées pour caractériser nos surfaces après chaque étape. Cela nous permettra de disposer de procédures opérationnelles validées quantitativement pour la modification de surface de silicium cristallin.

# A. Préparation de surfaces hydrogénées

## 1. Choix du substrat

Depuis le milieu des années 90, la modification des surfaces de silicium hydrogénées a été largement étudiée en raison de ses divers domaines d'application, de la microélectronique aux biocapteurs.<sup>3-7</sup> Le silicium (100) est largement utilisé pour la microélectronique en raison des très bonnes propriétés électroniques de l'interface Si(100)/SiO<sub>2</sub>. Dans le cadre de notre travail, nous privilégierons la face cristallographique (111) qui permet, par dissolution anisotrope du silicium dans NH<sub>4</sub>F, d'obtenir des surfaces atomiquement planes à l'échelle atomique facilement caractérisables par Microscopie à Force Atomique (AFM).<sup>8</sup> Ces surfaces planes constituent un substrat idéal pour des études de chimie de surface bien contrôlées. Le silicium cristallise suivant le système cubique diamant. Son réseau possède donc une symétrie cubique, et on peut le représenter comme deux sous-réseaux cubiques à faces centrées décalés de  $\frac{1}{4}$  l'un de l'autre le long d'une des diagonales principales du cube. Ce réseau possède une famille de plans denses orientés selon la direction [111] dont un exemple est représenté en rouge sur la figure 1.

Dans notre cas, la coupe du cristal est légèrement désorientée par rapport à une telle face. Un mode opératoire bien précis, qui sera détaillé par la suite, nous permet d'obtenir une surface vicinale, structurée en réseau de marches régulières dont la hauteur (3,14 Å) correspond exactement à la distance entre 2 bicouches atomiques. Ces marches atomiques, rectilignes et parallèles, séparent les terrasses atomiquement planes. La figure 2 représente le schéma de la « désorientation » (miscut), c'est-à-dire le plan de coupe du cristal par rapport à la face cristallographique (111). Le miscut est défini par 2 angles. L'angle  $\alpha$  entre la normale au plan optique et la direction [111] est l'angle de la désorientation. L'angle  $\theta$  qui définit l'azimut du miscut est formé par la projection des vecteurs [111] et  $[1\bar{1}\bar{2}]$  dans le plan de la surface. Nous travaillons donc avec des substrats présentant une désorientation  $\alpha$  faible mais finie de manière à contrôler soigneusement l'azimut de celle-ci (par exemple, pour une désorientation de 0,2°, les terrasses présentent une largeur d'environ 100 nm). Le contrôle de l'azimut pour avoir  $\theta = 180^\circ$  est crucial pour obtenir des marches rectilignes, alors orientées parallèlement à la direction  $[1\bar{1}0]$ .<sup>8</sup>

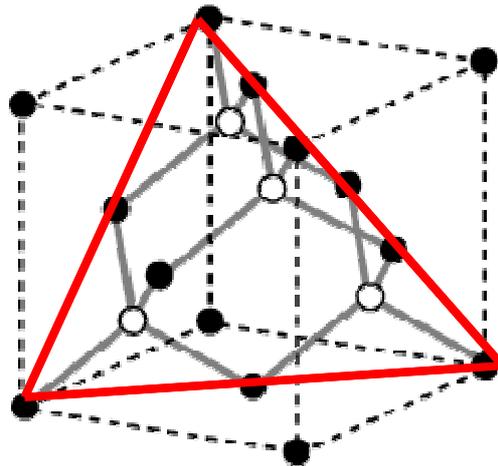


Figure 1 : Maille cubique du réseau de silicium cristallin : les 2 réseaux cubiques à faces centrées sont représentés en noir et en blanc, une face dense (111) est représentée en rouge.

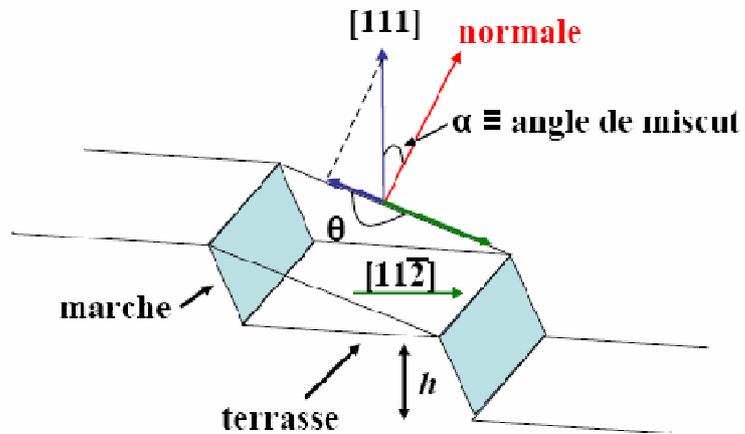


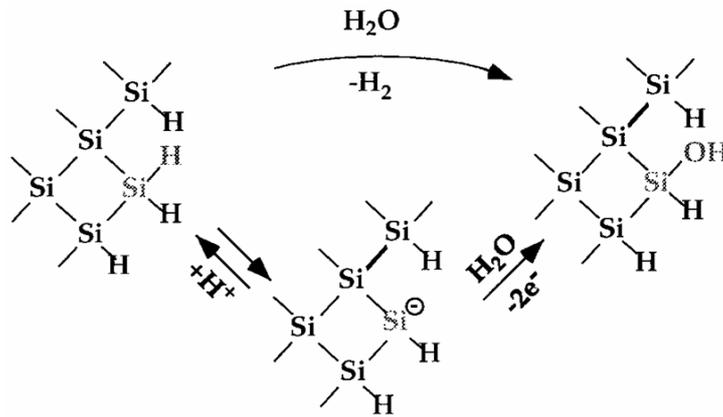
Figure 2 : Schéma d'une surface vicinale montrant la désorientation de la face vicinale par rapport au plan dense (111).

## 2. Hydrogénation de la surface

### a) Introduction

Depuis la fin des années 60, on sait qu'après un traitement désoxydant dans l'acide fluorhydrique HF, le silicium est passivé par une couche contenant des liaisons SiH.<sup>9,10</sup> De nombreuses équipes de recherche se sont ensuite intéressées à la caractérisation de ces couches, mettant en évidence la présence d'une monocouche de liaisons Si-H à la surface.<sup>11-17</sup> Beaucoup de travaux ont été réalisés pour comprendre le mécanisme de dissolution du silicium.<sup>1,15,18-20</sup> En 1995, Allongue a mis en évidence la coexistence de deux voies réactionnelles de dissolution dans NH<sub>4</sub>F, présentées sur la figure 3.<sup>21</sup> La cinétique de la réaction chimique est beaucoup plus rapide sur les sites de crans et de bords de marche que sur les terrasses. Cette réaction est très anisotrope et dépend peu du potentiel électrochimique. Elle consiste à oxyder le silicium par les molécules d'H<sub>2</sub>O qui réagissent préférentiellement sur les sites de crans et les bords de marche pour des raisons stériques. La seconde réaction, électrochimique, a en revanche lieu de façon presque aléatoire sur la surface et consiste en la rupture électrochimique de la liaison Si-H. L'hydrogène est alors remplacé par un groupement hydroxyle pour former une liaison Si-OH. Le fluor attaque ensuite la liaison Si-OH formée. Des molécules d'eau s'insèrent alors dans les liaisons arrières Si-Si, rendues réactives par la polarité de la liaison Si-F. Ainsi un atome de silicium est détaché de la surface et les liaisons Si-H se reforment à la surface. Afin de favoriser la réaction chimique le traitement doit se faire à des pH compris entre 8 et 9, favorisant ainsi la formation d'une surface atomiquement plane.<sup>1,18,19</sup> Il a enfin été montré que l'oxygène dissous affecte notablement la topographie de surface en initiant la formation de piqûres sur les terrasses. L'ajout d'ions sulfites SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> dans la solution, réduisant l'oxygène dissous, permet de s'affranchir de ce problème.<sup>22</sup>

L'étape d'hydrogénation du silicium est une étape critique, qui nécessite des substrats et produits de grande qualité. Dans le cadre de cette étude, nous avons travaillé avec des échantillons de silicium Si(111) désorientés de 0,2° selon la direction  $[11\bar{2}]$  de type n, dopés au phosphore. Ce silicium présente une résistivité de 5 à 10 Ω cm et une épaisseur comprise entre 500 et 550 μm. Des produits de qualité semi-conducteur ou VLSI Selectipur sont utilisés pour le décapage.



**Figure 3 : Etape initiale de la dissolution du silicium par voie chimique (en haut) et par voie électrochimique (en bas).<sup>21</sup>**

La qualité des couches obtenues a été contrôlée par AFM et par spectroscopie infrarouge en mode ATR (Attenuated Total Reflection). Le silicium utilisé pour l'AFM ne présente qu'une face polie, pour favoriser la réaction électrochimique sur l'autre face dépolie qui sert alors d'anode sacrificielle. Pour les mesures FTIR (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier), le silicium a les deux faces polies, la zone supérieure de l'échantillon est alors dépolie pour y privilégier l'attaque électrochimique et ainsi garder la planéité atomique lors de l'hydrogénation de la partie polie. Dans le cas des mesures FTIR, on utilise des cristaux de silicium purifiés par le procédé de zone fondue « Float Zone » (FZ), pour minimiser la quantité d'oxygène contenue dans le volume.<sup>23-26</sup>

## b) Mode opératoire

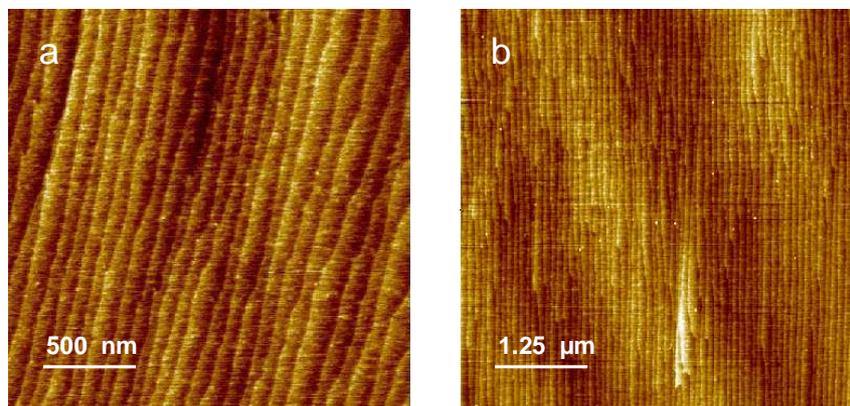
L'étape d'hydrogénation se fait en deux étapes :

- Une étape de nettoyage, durant laquelle l'échantillon et la verrerie sont nettoyés à 100°C dans une solution dite de Piranha, 1 : 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 96% fournis par Carlo Erba). Cette étape permet de supprimer toutes les impuretés organiques et de former une couche d'oxyde à la surface. Le tout est soigneusement rincé à l'eau ultra pure (MilliQ, 18,2 MΩ cm à 25°C), afin d'éviter toute contamination organique pouvant limiter la dissolution du silicium.
- Une étape de décapage, qui consiste ensuite à enlever la couche d'oxyde obtenue à la surface du silicium et à former la monocouche Si(111)-H par dissolution du silicium. L'attaque s'effectue dans une solution de fluorure d'ammonium NH<sub>4</sub>F 40% (Carlo Erba, pH 8-9). La solution de NH<sub>4</sub>F dans laquelle une faible quantité

de sulfite d'ammonium a été dissoute est préalablement homogénéisée aux ultrasons, pendant 10 mn, dans un bécher en polytétrafluoroéthylène (PTFE). L'échantillon y est ensuite immergé 15 mn, puis retiré et abondamment rincé à l'eau ultra pure. Il est aussi possible de procéder à l'hydrogénation du silicium par immersion de l'échantillon de silicium pendant 10 s dans une solution d'acide fluorhydrique HF 50% (Carlo Erba). La surface obtenue est tout aussi hydrophobe mais présente une rugosité de surface à l'échelle de quelques angström.

### c) Caractérisation par microscopie à force atomique

La topographie particulière des surfaces de silicium structurées en marches et terrasses est observable par AFM. La figure 4 montre des images AFM à différentes échelles obtenues par dissolution du silicium dans une solution de  $\text{NH}_4\text{F}$  à 40% pendant 15 minutes. On retrouve comme prévu la structure en marches d'escalier, on peut y distinguer les terrasses atomiquement planes séparées par des marches monoatomiques, d'une hauteur d'environ 3,14 Å, correspondant à une bicouche de silicium.<sup>27</sup> Ces images montrent que le procédé de préparation permet d'obtenir des surfaces de haute qualité, où aucun défaut de surface n'est apparent.

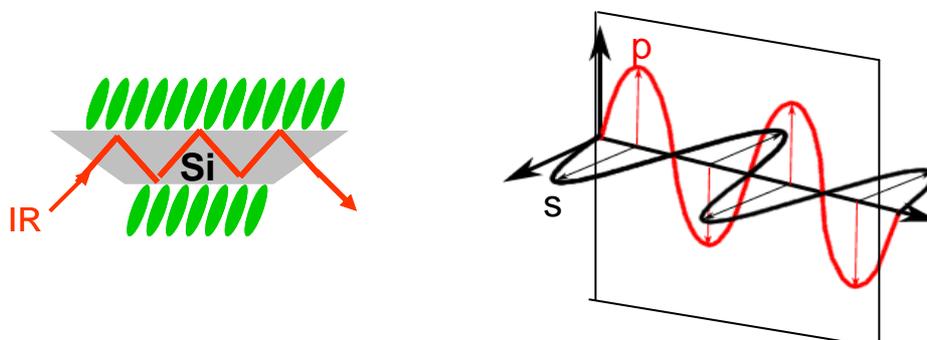


**Figure 4 : Images AFM d'une surface H-Si (111) préparée dans  $\text{NH}_4\text{F}$  (a)  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  (b)  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ .**

### d) Caractérisation par spectroscopie infrarouge

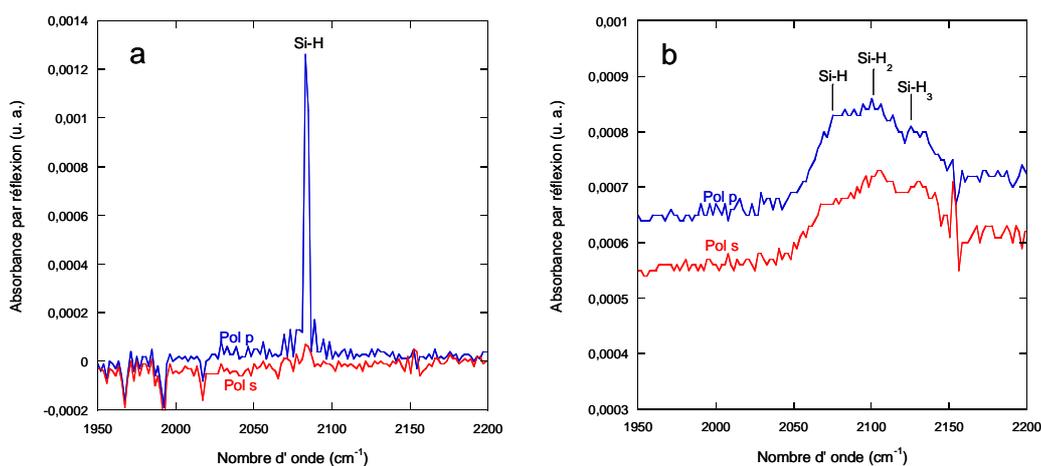
La spectroscopie infrarouge nous permet d'identifier les fonctions chimiques présentes dans un matériau via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques. Grâce à des substrats de silicium polis sur les deux faces et biseautés manuellement à  $45^\circ$  sur les 2

bords, il est possible de procéder à une caractérisation en mode ATR, bénéficiant ainsi d'une meilleure sensibilité. Le faisceau infrarouge peut être polarisé en p ou en s selon la direction du champ électrique, parallèle ou perpendiculaire au plan d'incidence (figure 5).



**Figure 5 : Représentation schématique d'un prisme de silicium caractérisé par infrarouge en ATR (Attenuated total reflection).**

Dans le cas d'une surface idéalement préparée, des monohydrures avec une liaison Si-H perpendiculaire à la surface sont obtenus.<sup>1</sup> La figure 6a montre les spectres d'une surface hydrogénée dans  $\text{NH}_4\text{F}$  en polarisation p et s, la référence étant la surface oxydée obtenue après nettoyage dans le piranha. L'observation de la vibration d'élongation  $\nu\text{SiH}$  à  $2083\text{ cm}^{-1}$  en polarisation p seulement, l'intensité et la finesse du pic (ici limitée par le spectromètre), confirment la perpendicularité des liaisons Si-H. L'aire de ce pic correspond à une concentration d'atomes en surface égale à  $7,8 \cdot 10^{14}\text{ cm}^{-2}$ .



**Figure 6 : Spectres infrarouges en polarisation p (bleu) et s (rouge) de surfaces de silicium hydrogénées dans  $\text{NH}_4\text{F}$  (a) et  $\text{HF}$  (b).**

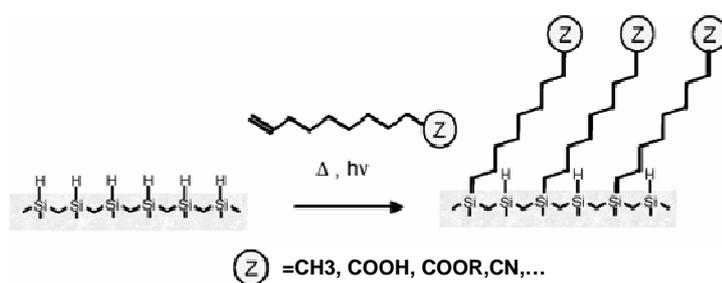
La figure 6b montre une surface préparée dans HF. Le signal obtenu est visible pour les deux polarisations et l'on peut distinguer différents modes de vibration dus aux différents types d'hydrures présents (les monohydrures SiH, les dihydrures SiH<sub>2</sub> et les trihydrures SiH<sub>3</sub>). Ceci confirme la rugosité de surface à l'échelle atomique et l'influence du pH sur la présence en surface des différents types d'hydrures.<sup>1,18,19,28,29</sup>

## B. Préparation de surfaces acides

### 1. Greffage chimique

#### a) Introduction

Les surfaces hydrogénées présentent des propriétés électroniques et chimiques bien meilleures que les interfaces Si/SiO<sub>2</sub>,<sup>30</sup> pouvant être passivées par l'attachement covalent de monocouches sur une surface de silicium via la liaison Si-C. Ceci permet l'incorporation à la surface d'une grande variété de groupements fonctionnels qui ouvrent de nombreuses applications dans les domaines de la micro-électronique ou des biocapteurs.<sup>3-7,31</sup> Dans le cadre des biocapteurs et donc de notre étude, les surfaces terminées par des groupements carboxyles sont particulièrement intéressantes. Elles peuvent en effet être facilement activées pour accrocher à la surface une biomolécule de façon covalente via une réaction d'amidation en deux étapes.<sup>32,33</sup> Il est possible d'obtenir par hydrosilylation des monocouches d'acides bien contrôlées et compactes, avec une densité de sondes connue.<sup>34</sup> Comme le montre la figure 7, la réaction d'hydrosilylation consiste à insérer une double liaison carbone-carbone sur une liaison silicium-hydrogène. Le groupe fonctionnel Z doit toutefois être choisi de manière à posséder une réactivité chimique limitée vis-à-vis de la surface hydrogénée. Par exemple, les groupes amines ou alcool ne sont pas utilisés pour éviter la compétition entre la formation de liaisons Si-O-C ou Si-N-C et l'addition sur la double liaison C=C.<sup>35</sup>



**Figure 7 : Représentation schématique de l'hydrosilylation.**<sup>34</sup>

L'équipe de Chidsey a obtenu la première couche organique greffée de façon covalente par réaction d'un alcène sur une surface de silicium préalablement hydrogénée en présence d'un peroxyde à 100°C pendant 1 heure.<sup>2</sup> Le mécanisme proposé est un mécanisme

radicalaire. Ces premiers travaux ont largement contribué à l'essor du greffage moléculaire sur silicium. De nombreuses recherches ont permis de mieux comprendre et d'améliorer l'hydrosilylation. D'autres voies ont été exploitées comme l'hydrosilylation par voie catalytique mise au point par Buriak et Allen<sup>36</sup> ou les greffages électrochimiques développés par les groupes de Chazalviel et Allongue.<sup>37,38</sup>

Le groupe de Zuilhof a montré qu'il était possible de procéder à l'hydrosilylation à une température comprise entre 150 et 200°C en fonction de la longueur des chaînes utilisées.<sup>39,40</sup> Le groupe de Chidsey a par la suite mis au point une méthode photochimique permettant le clivage homolytique de la liaison Si-H par irradiation UV ( $\lambda < 352$  nm) en présence d'alcènes aliphatiques en s'affranchissant de l'utilisation de hautes températures.<sup>41</sup>

Au laboratoire PMC, Fauchoux et coll. ont montré l'importance des rinçages des surfaces acides avec l'acide acétique pour enlever les molécules d'acide undécylénique en solution qui, n'ayant pas réagi, forment des dimères via des liaisons hydrogènes avec les acides greffés à la surface.<sup>34</sup>

## b) Mode opératoire

Comme pour les surfaces hydrogénées, la qualité des produits et la propreté de la verrerie sont primordiales. Les produits de greffage : l'acide undécylénique  $C_{11}H_{20}O_2$  est fourni par Acros avec un taux de pureté de 99% et le décène est fourni par Aldrich avec un taux de pureté de 97%, nécessitant une purification par passage sur colonne de silice, afin d'éliminer l'eau et les impuretés éventuelles. Le Florisil, qui contient du  $MgO_3Si$ , est alors utilisé pour retenir les dérivés polaires. Les solvants de rinçage (tétrahydrofurane THF, dichlorométhane, acide acétique glacial) sont de qualité HPLC. Afin d'éliminer toutes les contaminations organiques, la verrerie est soigneusement et successivement lavée à l'éthanol, à l'eau avec un dégraissant, à l'eau osmosée (15 M $\Omega$  cm) contenant du détergent TFD4 puis enfin abondamment rincée à l'eau MilliQ (ultrapure 18,2 M $\Omega$  cm). Il est important de travailler en milieu sec pour éviter la formation d'une couche d'oxyde sur la surface de silicium. Les produits sont donc séchés à l'étuve une nuit à 75°C. Afin de prévenir la formation d'oxyde, l'ensemble de la verrerie et des solutions est dégazé à chaud sous argon.

Dans un tube de Schlenk préalablement dégazé 5 minutes à 100°C, la solution d'acide undécylénique est introduite puis dégazée à son tour pendant 30 minutes. Le tube de Schlenk est ensuite refroidi à température ambiante pendant 15 minutes avant d'y introduire la surface

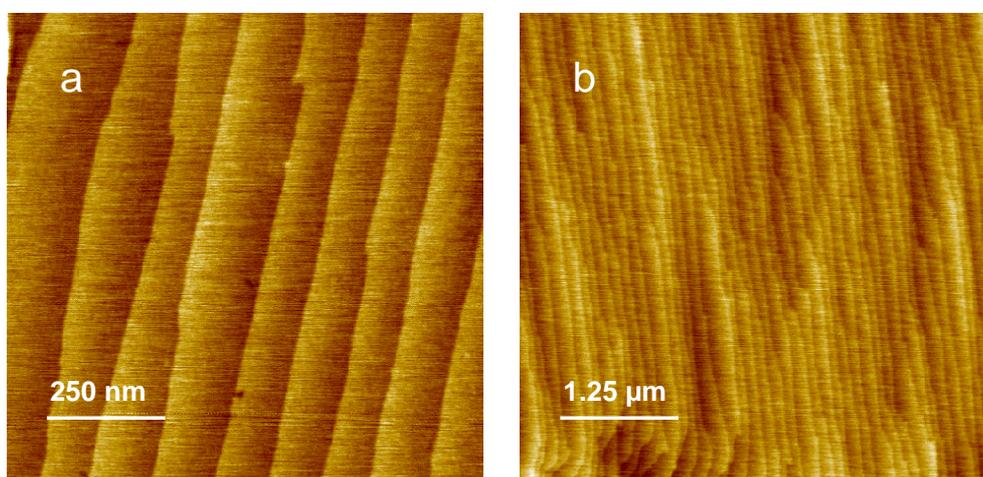
hydrogénée fraîchement préparée. Une fois l'échantillon introduit, le dégazage continue quinze minutes avant de fermer le tube de Schlenk.

Lors d'un greffage thermique, le tube de Schlenk est chauffé à 180°C de 16 à 20 heures, alors que pour un greffage photochimique le tube de Schlenk est placé 3 heures dans un réacteur sous irradiation UV ( $\lambda=312\text{ nm}$  ;  $6\text{ mW cm}^{-2}$ ).

Après le temps imparti, en fonction du type de greffage, le tube de Schlenk est refroidi à température ambiante. L'échantillon est ensuite rincé 2 fois pendant 15 mn à l'acide acétique chauffé à 75°C sous argon.

### c) Caractérisation par microscopie à force atomique

Pour pouvoir déterminer la densité de sondes présentes à la surface, il est nécessaire de vérifier la propreté des surfaces. Celles-ci sont imagées par AFM afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'espèces physisorbées sur la surface, dues à des contaminations ou à un mauvais rinçage. La figure 8 représente les images obtenues après fonctionnalisation par voie photochimique avec l'acide undécylénique et rinçage à l'acide acétique. On note que la structure en marches d'escalier est comparable à celle d'une surface hydrogénée. La présence de terrasses planes confirme la formation d'une monocouche homogène sur la surface.

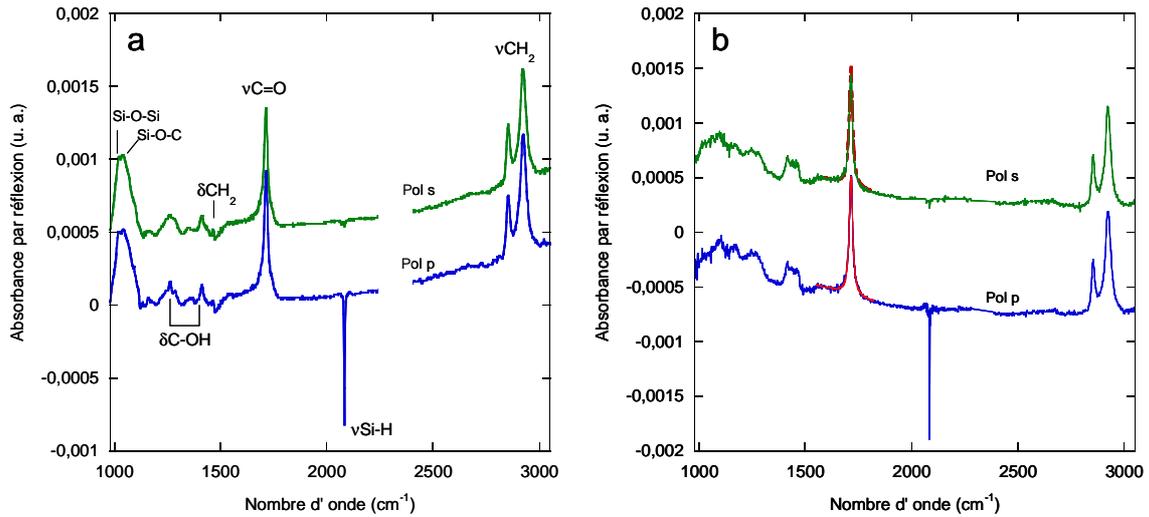


**Figure 8 : Images AFM d'une surface Si(111)-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>COOH préparée par un greffage photochimique (a) 1×1μm<sup>2</sup> (b) 5×5μm<sup>2</sup>.**

## d) Caractérisation par spectroscopie infrarouge

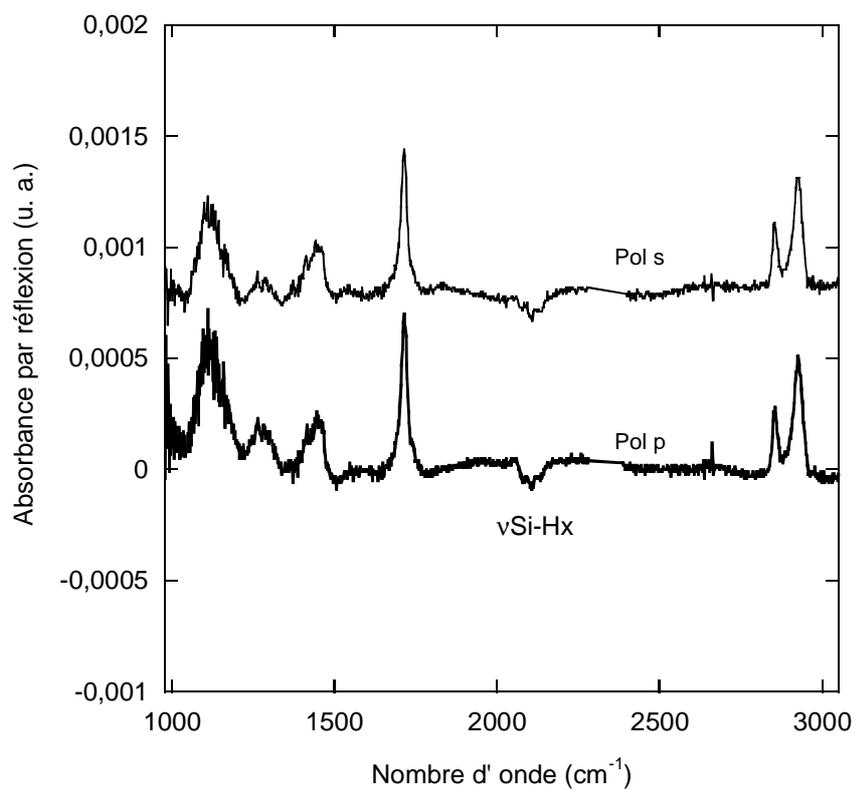
Les couches acides ont été caractérisées par infrarouge en mode ATR. La figure 9 montre les spectres en polarisation p et s dans la zone  $980\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$ , de surfaces acides obtenues par greffage thermique ou photochimique. La référence étant la surface hydrogénée, le pic négatif à  $2083\text{ cm}^{-1}$  en polarisation p indique la disparition de liaisons Si-H. L'encombrement stérique des molécules ne permet pas la substitution complète des liaisons Si-H. En effet, le diamètre des molécules que l'on souhaite greffer à la surface est environ égal à  $4,3\text{ \AA}$ , alors que la distance entre 2 liaisons Si-H est de  $3,84\text{ \AA}$ .<sup>42,43</sup> Théoriquement 50% des groupements Si-H peuvent être substitués. Les groupements SiH restants sont responsables de la contribution positive large mais de faible amplitude de part et d'autre du pic négatif SiH.

La fonctionnalisation de la surface est confirmée par la présence des pics associés aux vibrations des différentes liaisons du groupement  $-\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{COOH}$ . Le pic intense à  $1710\text{ cm}^{-1}$  est caractéristique du mode de vibration de la liaison C=O, alors que les petits pics à  $1290$  et  $1415\text{ cm}^{-1}$  sont associés aux vibrations du groupement fonctionnel C-OH. Les pics situés à  $2850$  et  $2920\text{ cm}^{-1}$  correspondent aux modes de vibration d'élongation symétrique et antisymétrique des groupements  $\text{CH}_2$ . La déformation de cette liaison dans le plan H-C-H  $\delta\text{CH}_2$  est aussi visible à  $1465\text{ cm}^{-1}$ . Dans la région située entre  $1000$  et  $1300\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique de l'oxyde de silicium ou des liaisons Si-O-C, on note une différence entre le greffage thermique et photochimique. L'intensité du pic plus élevée pour la surface greffée thermiquement suggère que de l'oxyde peut se former lors du greffage ou que la double liaison C=O peut réagir sur la surface hydrogénée pour former des liaisons Si-O-C. Ainsi, dans notre étude, afin de limiter la formation de l'oxyde et d'avoir des surfaces acides reproductibles, nous utiliserons de préférence la voie photochimique.



**Figure 9 : Spectres infrarouges en polarisation p (bleu) et s (vert) de surfaces acides préparées par voie thermique (a) et voie photochimique (b). Le spectre de référence est une surface atomiquement plane préparée dans  $\text{NH}_4\text{F}$ . Les courbes rouges correspondent aux ajustements du pic  $\text{C}=\text{O}$ .**

Il est par ailleurs possible de déterminer quantitativement la composition de la couche, comme l'ont montré Fauchaux et coll. et d'en déduire le taux de greffage. En intégrant l'intensité du pic  $\text{C}=\text{O}$ , nous retrouvons comme dans la littérature que les surfaces acides préparées à partir de surfaces hydrogénées dans  $\text{NH}_4\text{F}$  ( $\text{SiH}$ ) présentent une densité de sondes égale à  $2,8 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ , ce qui correspond à un taux de recouvrement de 36%.<sup>34</sup> En procédant au même greffage sur des surfaces hydrogénées dans  $\text{HF}$  ( $\text{SiH}_x$ ), on note la présence des mêmes pics sur la figure 10, ce qui confirme ainsi l'efficacité du greffage. Par une analyse quantitative des spectres obtenus, une densité de sondes moyenne de  $2 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$  et donc un taux de recouvrement d'environ 25%, sont obtenus. La rugosité de la surface  $\text{SiH}_x$  est la raison pour laquelle le taux de greffage est moins important. Afin de pouvoir transposer le protocole de greffage sur des surfaces de silicium amorphe, l'étude des réactions ultérieures (activation et amidation) se fera aussi sur des surfaces rugueuses, qui représentent une configuration atomique locale plus proche de celle d'un matériau désordonné (amorphe).



**Figure 10 : Spectres infrarouges en polarisation p et s d'une surface acide préparée par voie photochimique. La référence est une surface hydrogénée dans HF.**

## C. Préparation de surfaces activées

### 1. Introduction

Comme il a été dit précédemment, les surfaces terminées par des monocouches homogènes d'acides sont très intéressantes pour des applications biologiques. En effet, la fonction chimique acide carboxylique peut être transformée en ester portant un bon groupe partant afin de rendre le carbone de la liaison carbonyle très réactif (figure 11). Pour accrocher des biomolécules de façon covalente dans des conditions douces à un substrat (or, silicium, verre,...), des surfaces terminées par un ester de succinimide (« ester NHS ») sont utilisées pour réagir avec la molécule comportant un groupement amine.<sup>33,44-46</sup> Une autre stratégie consiste à greffer directement un alcène qui contient le groupement fonctionnel ester NHS sur la surface hydrogénée.<sup>47-51</sup> Cependant cette méthode nécessite une synthèse organique spécifique et coûteuse en temps. En général, la surface est obtenue par réaction de la surface acide avec un carbodiimide soluble dans l'eau tel que le N-éthyl-N'-(3-(diméthylamino)propyl)carbodiimide (EDC) en présence du N-hydroxysuccinimide (NHS). D'autres agents de couplage peptidique similaires peuvent néanmoins être utilisés.<sup>46,52</sup>

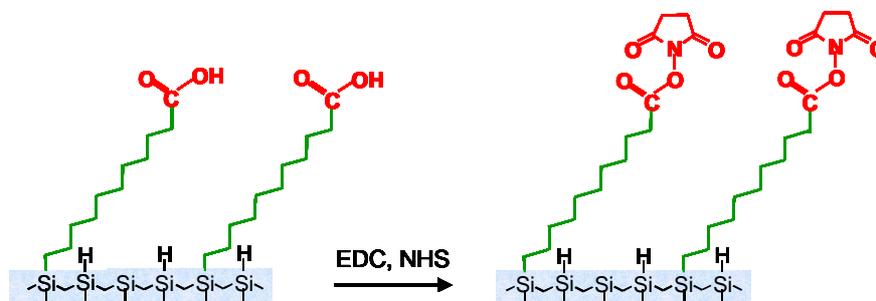


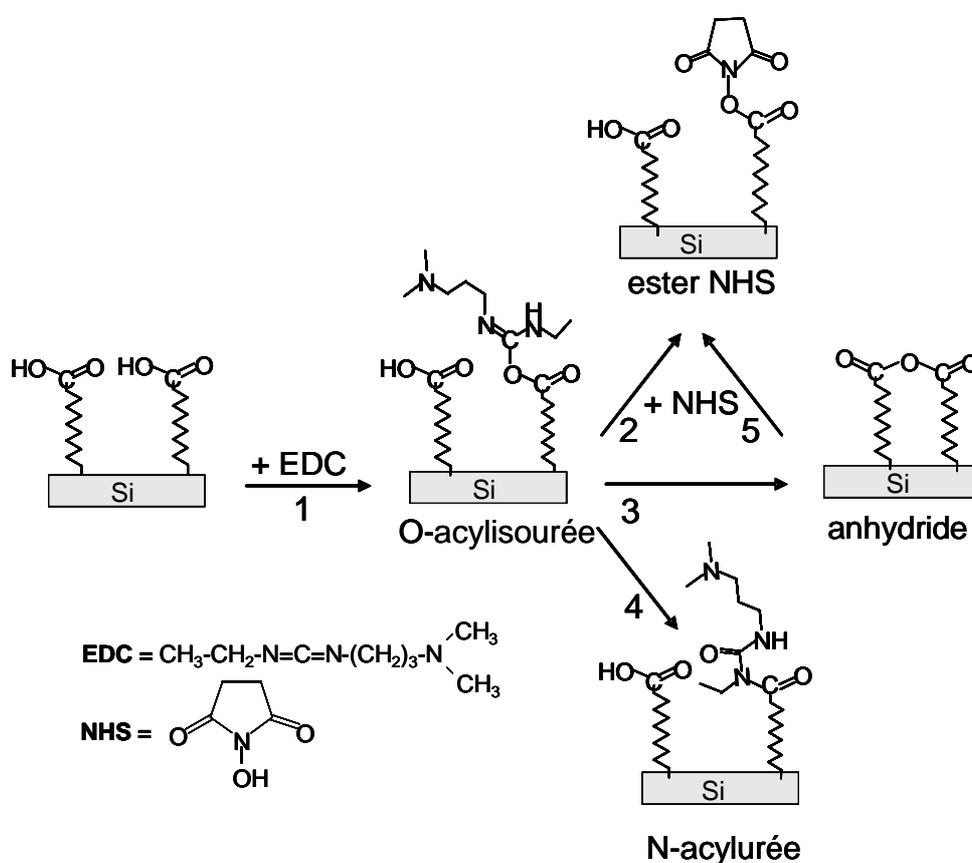
Figure 11 : Représentation schématique de la réaction d'activation.

### 2. Mécanisme réactionnel

Cette étape d'activation a largement été utilisée pour mettre au point plusieurs protocoles d'accrochage covalent de biomolécules. Elle peut être décrite à l'échelle moléculaire par le schéma réactionnel présenté sur la figure 12.<sup>53</sup> Ce schéma correspond aux différents chemins réactionnels établis en phase homogène.<sup>52</sup> La première étape est la

formation de l'O-acylisourée par réaction d'addition du groupement OH de l'acide carboxylique sur le carbone électrodéficient de l'EDC. Après la formation de cet intermédiaire trois réactions sont en compétition :

- une attaque nucléophile par le NHS pour former l'ester NHS (2),
- une réaction de l'O-acylisourée avec un groupement carboxylique voisin pour former un anhydride (3),
- un réarrangement irréversible par transfert d'acyl intramoléculaire pour former la N-acylurée (4).



**Figure 12 : Schéma réactionnel de l'étape d'activation. L'EDC réagit sur la surface acide pour former l'O-acylisourée (1) ; différents chemins réactionnels sont en compétition pour former l'ester NHS (2;5), l'anhydride (3) ou l'urée (4).**

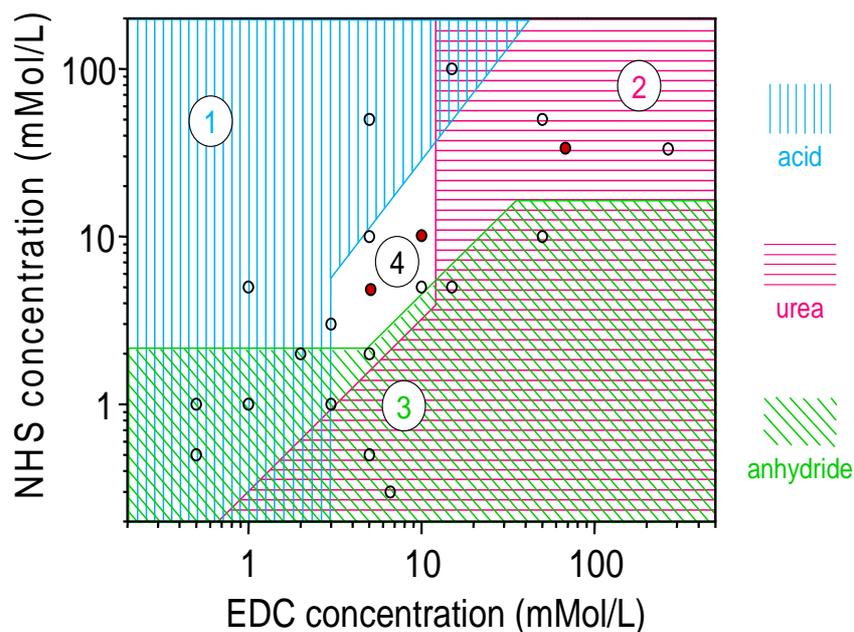
Alors que les conditions ont été précautionneusement optimisées en solution, il apparaît à l'inverse que l'activation de surfaces d'or ou de silicium n'a pas fait l'objet d'une telle optimisation, tant les conditions d'activation sont très différentes d'une étude à l'autre.<sup>32,33,54-57</sup> Etant donné la complexité de la réaction, l'influence des concentrations en

EDC et NHS sur les cinétiques des différentes réactions et l'effet des gênes stériques, il est difficile de prévoir comment activer les groupements acides de manière quantitative. En effet, dans la littérature, les concentrations en EDC ou NHS sont comprises entre 0,1 mM et 0,4 M et le rapport des concentrations entre les deux produits varie fortement. D'autres paramètres peuvent influencer la réaction comme la température ou le pH de la solution.<sup>58,59</sup> Nous avons décidé de mener une étude approfondie sur des surfaces acides afin de mieux comprendre le mécanisme et d'améliorer le rendement de la réaction.<sup>53,60</sup> Ces résultats viennent en complément d'une étude détaillée de l'influence des concentrations menée sur le silicium poreux par Sam et coll..<sup>61</sup>

Dans cette étude, le silicium poreux a été analysé par infrarouge en transmission grâce à sa très grande surface spécifique. De cette façon, on caractérise aisément l'acide restant à la surface en cas de réaction incomplète, et les divers produits de réaction (anhydride, urée, ester de succinimidyde). La figure 13 résume les résultats obtenus après activation à 15°C pendant 90 minutes pour différentes concentrations des réactifs EDC / NHS. Ce diagramme a été construit à partir de points expérimentaux pour définir les régions où l'on peut déterminer par infrarouge la présence de produits secondaires à la fin de la réaction d'activation :

- l'acide résiduel dans la zone 1,
- l'urée dans la zone 2,
- l'anhydride dans la zone 3.

Il existe des zones de recouvrement lorsque, pour les mêmes conditions, différents produits sont détectés. Les conditions optimales pour l'activation correspondent à la zone 4, particulièrement lorsque les concentrations équimolaires en EDC et NHS se trouvent comprises entre 5 et 10 mM. Dans ces conditions, sur le silicium poreux, la réaction d'activation est totale.



**Figure 13 : Diagramme montrant la composition d'une surface poreuse après activation 90 minutes à 15°C avec différentes concentrations en EDC et NHS. Les frontières entre les zones ont été dessinées en fonction des résultats expérimentaux. Dans Les zones (1 ;2 ;3) on peut distinguer les différents produits indiqués à droite du diagramme. La zone 4 correspond aux conditions optimales.<sup>61</sup>**

La fonctionnalisation de la surface lors de l'activation est caractérisée par infrarouge (figure 14). En effet, en comparant les modes de vibration entre 1500 et 1800  $\text{cm}^{-1}$  dus aux liaisons carbonyles C=O, on peut facilement distinguer une surface acide d'une surface activée. Alors que, pour une surface acide, un seul pic apparaît à 1710  $\text{cm}^{-1}$ , la surface activée par l'ester NHS se caractérise par trois pics à 1745, 1785 et 1820  $\text{cm}^{-1}$ . Ces vibrations correspondent essentiellement aux modes de vibration antisymétrique et symétrique  $\nu\text{C}=\text{O}$  des deux groupes carbonyles du succinimide et au mode de vibration  $\nu\text{C}=\text{O}$  de l'ester.<sup>61</sup>

Afin d'optimiser la réaction et d'obtenir les rendements d'activation les plus élevés sur des surfaces planes, une étude quantitative sur des surfaces de silicium hydrogénées  $\text{SiH}_x$  a été menée. Comme pour les surfaces acides, il est possible de déterminer précisément le nombre de molécules activées par  $\text{cm}^2$ . D'après la procédure d'ajustement des surfaces activées décrite par Morailon et coll., nous avons intégré l'intensité des deux petits pics à 1785 et 1820  $\text{cm}^{-1}$  pour calculer la densité de sites actifs (figure 15). En comparant le nombre de molécules activées par rapport au nombre de sites acides, nous déterminons le rendement de la réaction.<sup>32</sup> Les résultats sont rassemblés dans la partie suivante.

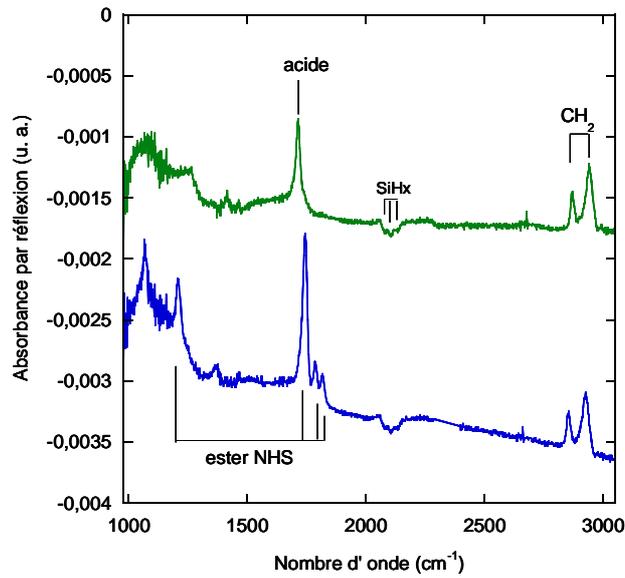


Figure 14 : Spectres infrarouges d'une surface acide (vert) et d'une surface activée (bleu).

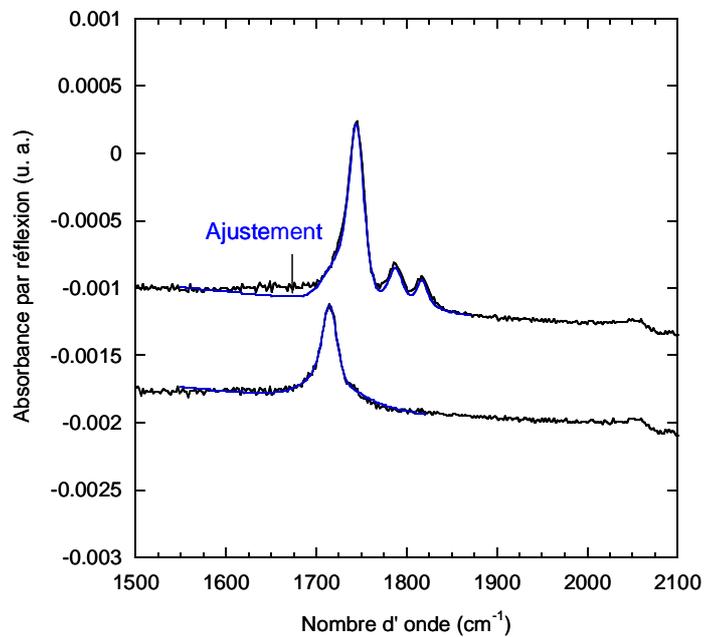


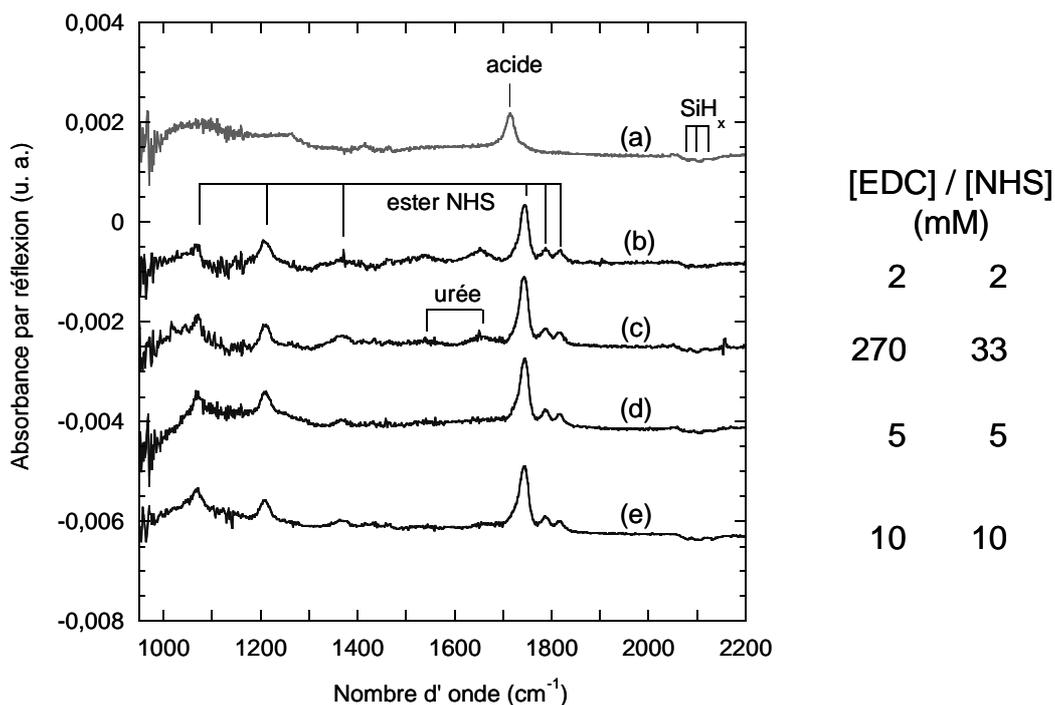
Figure 15 : Spectres infrarouges et ajustements des pics carbonyles d'une surface acide (en bas) et d'une surface activée (en haut). La référence est une surface SiHx.

### 3. Etude quantitative de la réaction d'activation

#### a) Optimisation des concentrations et de la température

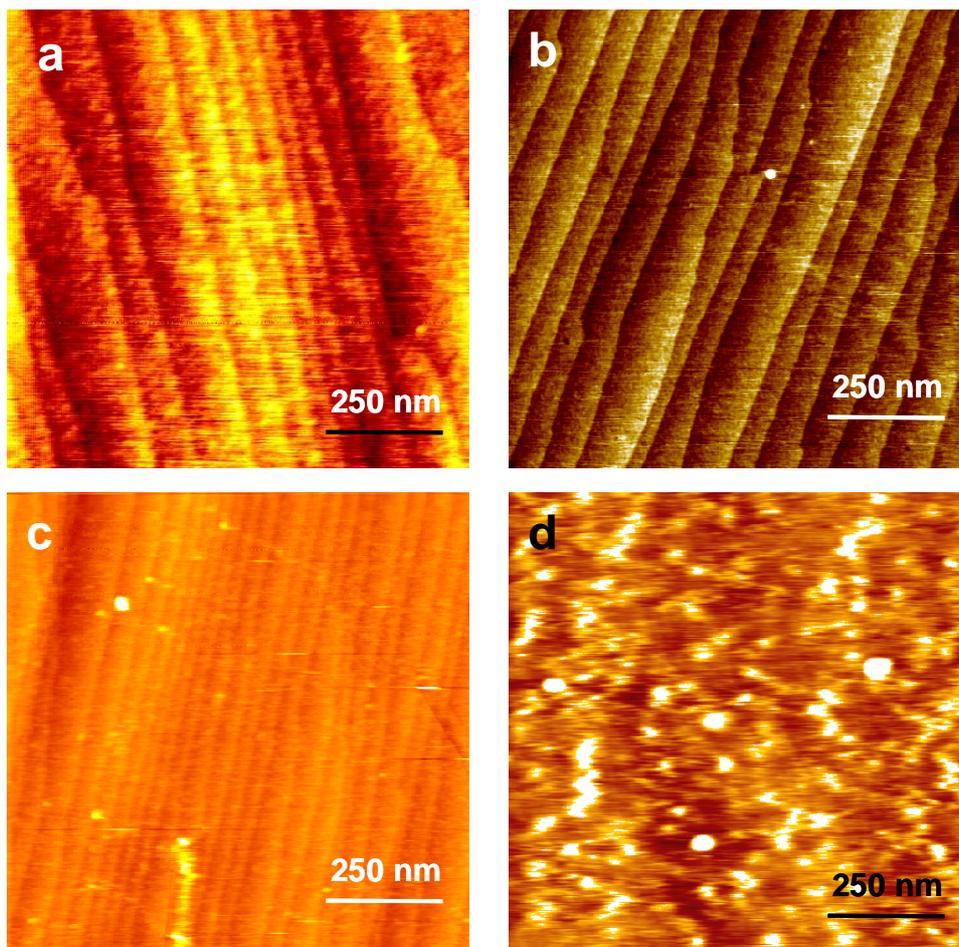
##### (1) Etude de l'influence des concentrations [EDC] et [NHS]

Comme dans le cas du silicium poreux, nous avons dans un premier temps étudié l'effet de la concentration. La figure 16 montre les spectres d'une surface acide ( $2 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ ) et de 4 surfaces activées pendant 90 minutes à  $15^\circ\text{C}$  avec différentes concentrations en EDC et NHS. Dans le cas de faibles concentrations, l'activation n'est pas complète et le rendement calculé dans ce cas est égal à 65%. On note par ailleurs la présence de bandes amides à  $1550$  et  $1650 \text{ cm}^{-1}$  caractéristiques de la formation de N-acylurée (étape 4 figure 12) ou d'urée soluble physisorbée à la surface formée lors de la réaction (étapes 2 et 3 figure 12). En augmentant les concentrations on voit une augmentation des pics NHS. En effet pour des concentrations élevées  $[\text{EDC}] = 270 \text{ mM}$  et  $[\text{NHS}] = 33 \text{ mM}$ ,<sup>33</sup> on note que la réaction peut être quantitative mais les deux bandes amides de l'urée demeurent. Cela suggère un état de surface peu contrôlé où l'urée serait physisorbée sur la surface. Un bon compromis est obtenu pour des concentrations équimolaires en EDC et NHS comprises entre 5 et 10 mM comme sur le silicium poreux. Dans cette gamme de concentrations, les rendements d'activation sont compris en moyenne entre 85 et 95% sur des surfaces SiHx, mais restent plus faibles sur des surfaces SiH, variant de 60 à 80%. Cette différence peut s'expliquer par un effet de gênes stériques, dans la mesure où les surfaces acides sont bien plus denses lorsqu'elles sont préparées à partir de surfaces SiH qu'à partir de surfaces SiHx. Le même argument peut expliquer pourquoi sur le silicium poreux, où l'irrégularité de la topographie de la surface ne permet pas la formation d'une couche moléculaire localement très dense, la réaction effectuée dans ces conditions est quantitative.



**Figure 16 : Spectres infrarouges d'une surface acide (a) et activée dans différentes conditions à 15°C pendant 90 mn (b-e). Le spectre de référence est une surface hydrogénée dans HF.**

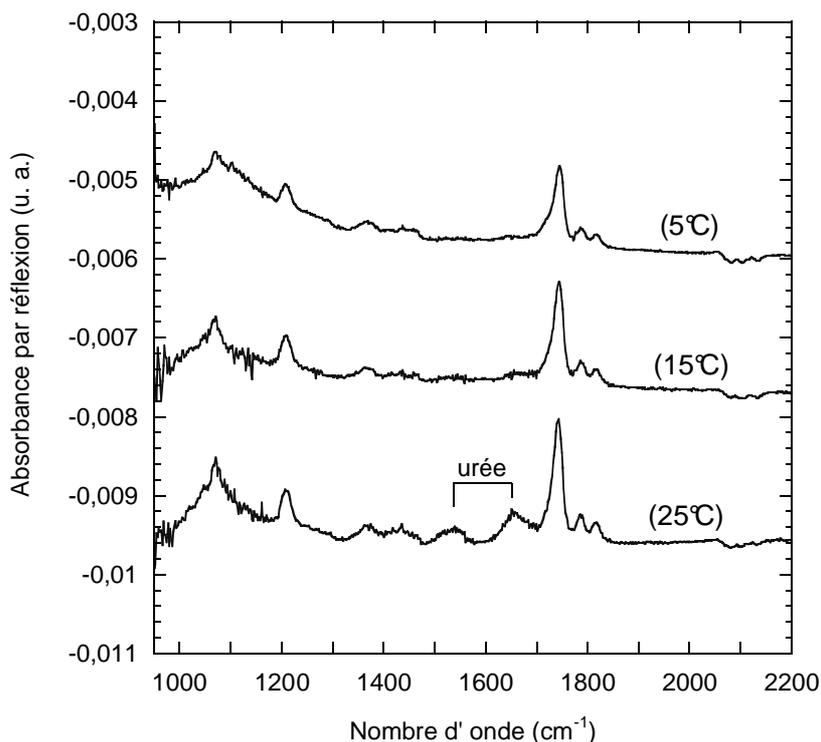
Après avoir déterminé la densité de sites activés présents à la surface, il est nécessaire de vérifier la propreté des surfaces. Celles-ci sont imagées par AFM afin de s'assurer qu'il n'y ait pas d'espèces physisorbées sur la surface, dues à des contaminations ou à un mauvais rinçage. La figure 17 représente les images obtenues après activation de surfaces acides préparées sous différentes conditions. On note que, dans le cas des concentrations diluées ([EDC]= 7 mM et [NHS]=0,33 mM) ou équimolaires à 5 mM en réactifs, la structure est comparable à celle d'une surface hydrogénée. La présence de terrasses planes confirme la formation d'une monocouche homogène sur la surface. Dans le cas des concentrations élevées ([EDC]= 266 mM et [NHS]= 33 mM, voir figure 17 c et d), il est plus difficile d'obtenir des surfaces reproductibles. Cela peut être corrélé avec les mesures en infrarouge, où en dépit d'un bon rendement d'activation, la présence d'urée a été mise en évidence. Pour leur part, les surfaces activées avec des concentrations équimolaires autour de 5 mM sont très bien contrôlées d'un point de vue topographique tout en conduisant à des rendements d'activation élevés.



**Figure 17 : Images AFM de surfaces activées 90 min à 15°C avec différentes concentrations : [EDC]=7 mM , [NHS]= 0,33mM (a) ; [EDC]=5 mM , [NHS]= 5mM (b) ; [EDC]=266 mM , [NHS]= 33 mM (c, d)**

### b) Effet de la température

Afin d'étudier l'influence de la température sur la réaction, des activations à des températures différentes ont été réalisées. La figure 18 montre les spectres obtenus à 5, 15 et 25°C. Alors qu'à 5°C la réaction n'est pas complète avec un rendement égal à 60%, le rendement de la réaction est plus élevé (~85%) à 15°C et approche l'unité à 25°C. Cependant, à 25°C, les bandes amides à 1550 et 1650  $\text{cm}^{-1}$  apparaissent, comme dans le cas des concentrations élevées, suggérant ainsi la formation d'urée à la surface. Ainsi, afin de favoriser le contrôle de la chimie de surface, la réaction se fera à 15°C. De même, pour prévenir la formation d'urée, nous avons décidé d'utiliser les réactifs à 5mM.

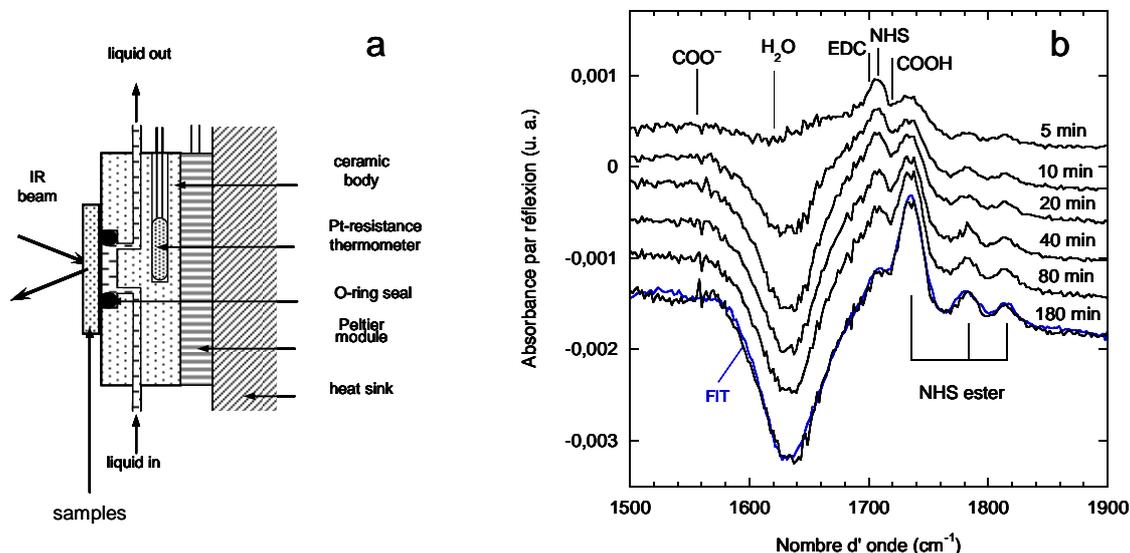


**Figure 18 : Spectres infrarouges de surfaces activées à différentes températures (5°C, 15°C °, 25°C) pendant 90 min avec [EDC]= [NHS]= 10 mM.**

### c) Etude cinétique de l'activation par mesure infrarouge in situ

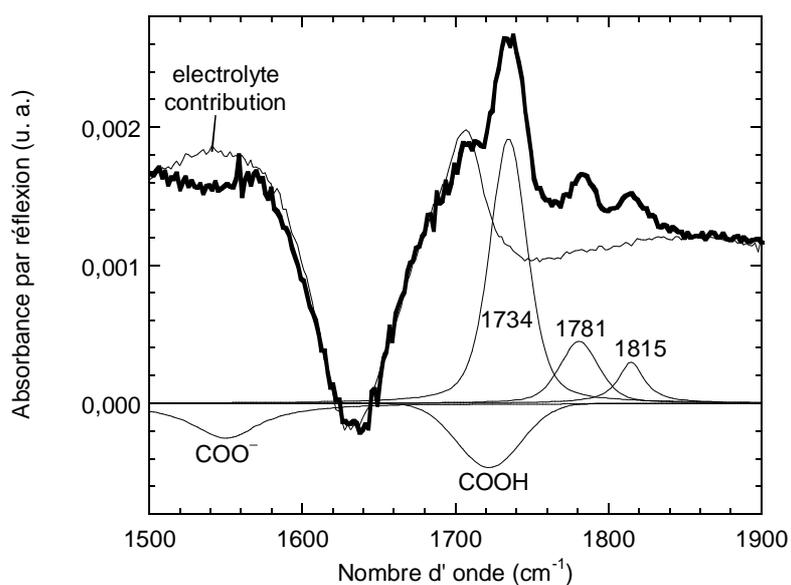
Afin de mieux comprendre la cinétique complexe de la réaction, des mesures in situ ont été effectuées à l'aide d'une cellule infrarouge décrite sur la figure 19a, qui permet de contrôler la température.<sup>60</sup> Ces mesures ont été effectuées avec des concentrations de 5 mM ou 10 mM et analysées quantitativement dans la région comprise entre 1500 et 2000  $\text{cm}^{-1}$ . La figure 19b montre une succession de spectres mesurés à différents stades lors d'une activation à 5°C avec  $[\text{EDC}] = [\text{NHS}] = 5 \text{ mM}$ , le spectre de référence étant la surface acide. Dans cette région, l'évolution des spectres est complexe. Dès les premières minutes, un pic négatif caractéristique de l'acide à  $1720 \text{ cm}^{-1}$  est observable et son évolution se corrèle très bien avec l'augmentation des trois pics caractéristiques de l'ester NHS. D'autres contributions rendent l'analyse quantitative plus complexe, la plus importante est celle de l'eau observable par un pic de plus en plus large à  $1650 \text{ cm}^{-1}$ . D'autres contributions, de l'EDC ( $1700 \text{ cm}^{-1}$ ) et du NHS ( $1707 \text{ cm}^{-1}$ ) sont aussi discernables. Enfin une contribution due à l'absorption des

carboxylates à  $1550\text{ cm}^{-1}$  apparaît également dans le dernier spectre : le pH ayant varié au cours de la réaction, les fonctions acides s'ionisent partiellement.



**Figure 19 : (a) Schéma de la cellule utilisée pour les mesures infrarouges in-situ ; (b) succession de spectres in situ mesurés à différents temps pour une surface acide activée à 5°C avec [EDC]=[NHS]=5mM. On tient compte de plusieurs contributions pour analyser les spectres lors de la réaction in situ. L'ajustement du spectre à 180 minutes est superposé en bleu au spectre mesuré.**

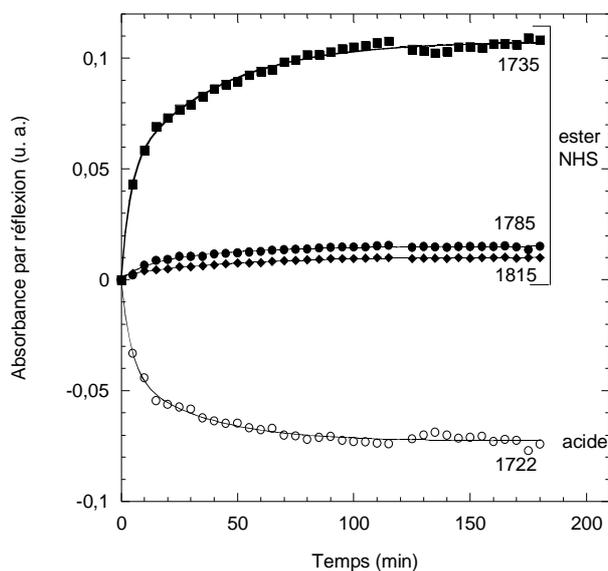
Afin d'analyser au mieux les spectres, les 5 pics (3 pics de l'ester NHS ; le pic de l'acide et un pic pour les carboxylates) ont été ajustés par des fonctions de Voigt. Pour permettre l'analyse, l'ajustement inclut également une ligne de base quadratique, une contribution de l'électrolyte (eau, EDC, NHS) et un spectre de vapeur d'eau (l'atmosphère dans la chambre infrarouge ne reste pas parfaitement stable au cours du temps). La figure 20 montre un exemple de décomposition pour un spectre donné, l'ajustement obtenu en combinant toutes ces fonctions se trouve superposé au spectre du bas sur la figure 19. Une telle analyse nous permet de suivre quantitativement l'évolution des différents pics.



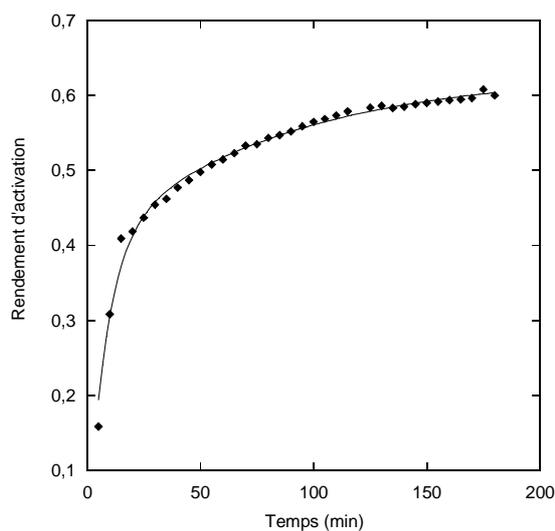
**Figure 20 : Différentes contributions prises en considération pour ajuster les données expérimentales. 5 pics sont calculés pour ajuster les modes de vibration des espèces présentes à la surface. Les contributions additionnelles de l'électrolyte, de la vapeur d'eau et une ligne de base permettent d'ajuster le spectre expérimental (figure 19).**

La figure 21 montre l'évolution du pic acide et celle des trois pics de l'ester NHS en temps réel. La perte de groupements acides se fait au profit de l'apparition des pics caractéristiques de l'ester. Toutefois en raison de la multiplicité des contributions ajustées indépendamment les unes des autres, cette analyse demeure délicate. Son conditionnement mathématique insuffisant rend les détails incertains au vu de la complexité du spectre dans la région 1500-2000  $\text{cm}^{-1}$ . Nous avons donc vérifié ces résultats par une autre méthode d'ajustement. On peut analyser les spectres comme une combinaison linéaire du dernier spectre obtenu, des spectres de l'électrolyte (eau liquide, EDC, NHS) et du spectre de vapeur d'eau. On obtient ainsi un indicateur (non calibré) de l'avancement de la réaction. Afin de corriger la ligne de base, une fonction linéaire et une constante sont ajustées avec les autres contributions lors de la procédure. Après avoir normalisé le résultat obtenu par le rendement d'activation déterminé ex situ, on peut représenter l'avancement de la réaction au cours du temps (figure 22). On remarque que l'évolution ne suit pas une loi exponentielle. La réaction n'est donc pas régie par une cinétique du premier ordre. En effet, les différentes courbes peuvent toutes être ajustées par une loi bi-exponentielle. Une première exponentielle nous

permet d'ajuster la première partie de la courbe, la plus rapide, la seconde reproduit la deuxième partie qui correspond à une évolution plus lente.



**Figure 21 : Evolution des bandes de l'ester NHS et de l'acide en fonction du temps pour une surface acide (SiH) activée à 5°C. Ces points résultent de l'analyse des différents spectres par la méthode décrite en figure 19. On peut remarquer la coïncidence parfaite entre l'apparition des bandes ester et la disparition de la bande acide.**



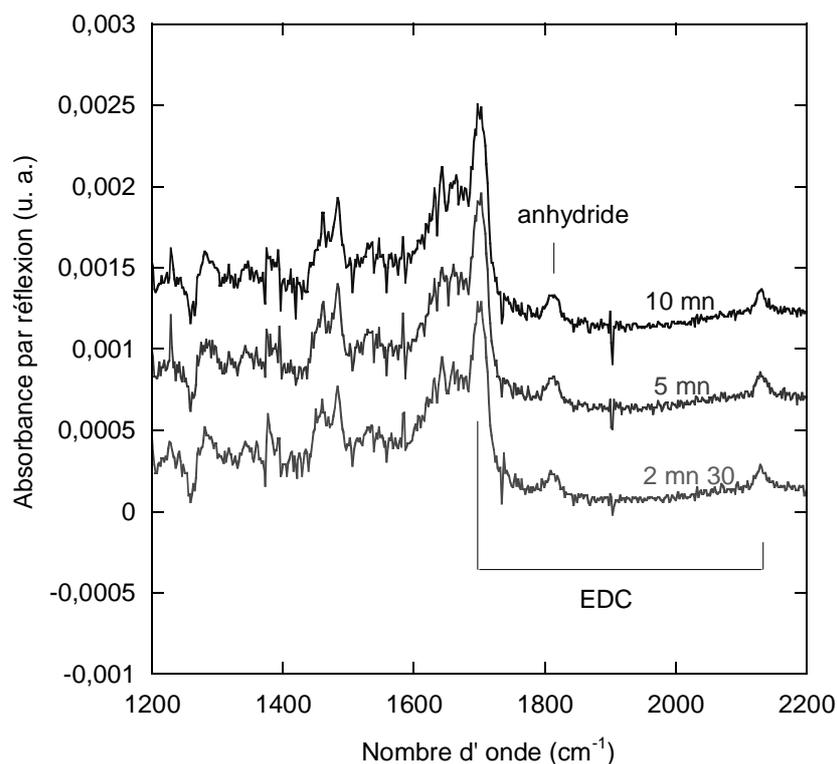
**Figure 22 : Rendement d'activation en fonction du temps pour une surface acide (SiH) activée à 5°C avec [EDC]=[NHS]= 5mM.**

Ces méthodes d'analyse nous ont permis d'interpréter les expériences réalisées dans différentes conditions : concentrations en EDC et NHS de 5 et 10 mM, températures de 5 et 15°C sur SiH et SiHx. Le tableau 1 récapitule les résultats obtenus en ajustant les différentes évolutions avec une loi bi-exponentielle. Ainsi deux temps caractéristiques sont déterminés :  $\tau_1$  (le plus rapide) et  $\tau_2$  (le plus lent) pour chaque expérience. Les temps obtenus et présentés ci-dessous sont des moyennes faites à partir des résultats obtenus par les différentes méthodes d'ajustement. La pertinence des valeurs déterminées pour le temps  $\tau_1$  peut se poser dans la mesure où il faut plus de 2 minutes pour prendre un spectre. Concernant le temps  $\tau_2$ , l'incertitude n'excède pas 10 minutes. On peut se rendre compte que la cinétique dépend peu du type de surface hydrogénée et de façon plus surprenante de la concentration en EDC et NHS. Le temps  $\tau_2$  se trouve légèrement diminué lorsque les concentrations sont multipliées par deux. Par contre, diminuer la température de 15 à 5°C permet d'avoir un effet notable sur la cinétique puisque les valeurs des temps caractéristiques augmentent de façon significative.

Surface hydrogénée	SiH	SiH	SiH	SiHx
Température	15°C	15°C	5°C	15°C
[EDC]/[NHS] mM	5/5	10/10	5/5	5/5
$\tau_1$ (mn)	3	4	9	4
$\tau_2$ (mn)	50	40	80	50

**Tableau 1 : Temps caractéristiques déterminés par un ajustement bi-exponentiel.**

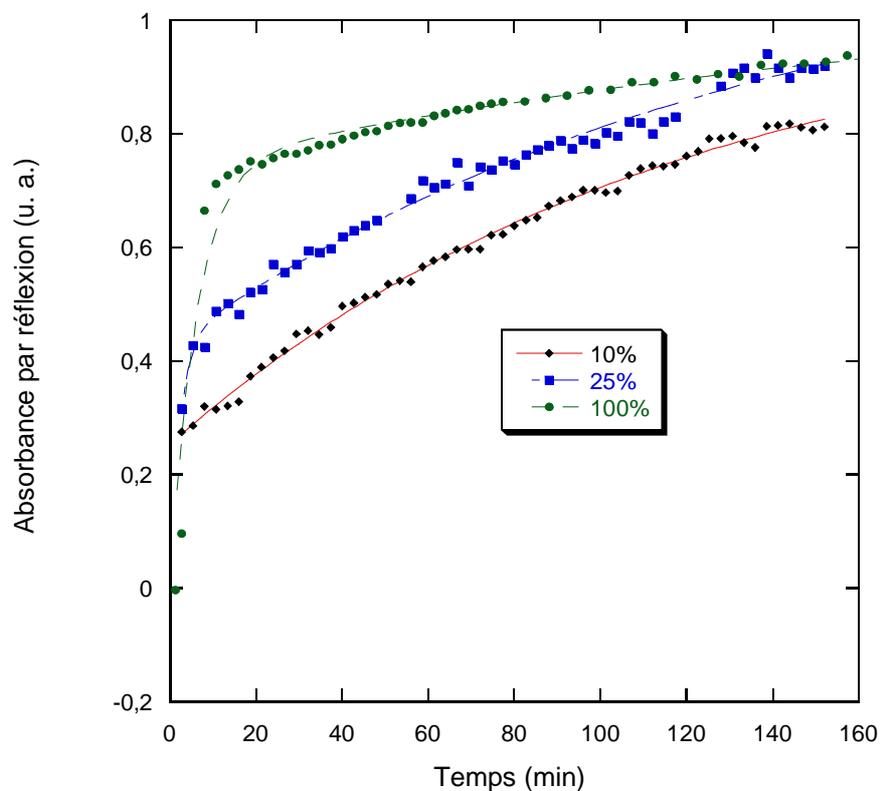
La complexité de la réaction présentée précédemment (figure 12) permet de comprendre le caractère non exponentiel de la cinétique et de proposer une interprétation pour expliquer le caractère bi-exponentiel. Après réaction de l'EDC sur la surface acide pour former l'O-acylisourée (1), il y a deux voies pour former l'ester NHS : les chemins notés (2) et (3+5) sur la figure 12, ce qui peut expliquer la présence de 2 temps caractéristiques. La molécule NHS peut en effet réagir directement avec l'O-acylisourée (2) ou réagir sur l'anhydride (5). Des mesures complémentaires in situ ont permis de montrer la formation très rapide d'anhydride lorsque la surface acide est en présence d'EDC seul (figure 23). Ceci suggère que la réaction rapide associée à la constante de temps  $\tau_1$  pourrait impliquer la formation d'anhydride.



**Figure 23 : Spectre infrarouge d'une surface acide modifiée en solution par l'EDC (10 mM). La référence est une surface acide dans l'eau milliQ.**

Afin de confirmer cette hypothèse et d'associer sans ambiguïté les deux chemins réactionnels (2) et (3+5) aux réactions lente et rapide révélées par les mesures cinétiques, nous avons préparé des surfaces acides où les chaînes acides greffées sont diluées parmi les chaînes alkyles (25% et 10% d'acide en solution). Ces surfaces diluées permettent de limiter la formation de l'anhydride, car l'O-acylisourée ne peut pas trouver facilement un groupement acide suffisamment proche pour réagir. Ainsi par suivi in situ de l'activation on peut se rendre compte (figure 24) que plus la surface est diluée plus la contribution de la partie rapide diminue. Ceci nous permet de conclure que le chemin réactionnel rapide est celui qui correspond à l'attaque du NHS sur l'anhydride (3+5) et que le processus lent correspond à l'action directe du NHS sur l'O-acylisourée (2).

Cette étude nous a permis de comprendre et d'optimiser les conditions d'activation. Nous avons par la suite essayé d'agir sur le temps pour arriver à des rendements d'activation de 100%, mais nous nous sommes aperçu que faire des activations de plus de 90 minutes pouvait engendrer une compétition entre l'hydrolyse de l'ester NHS et l'activation des sites acides. Ainsi nous avons décidé d'adopter le mode opératoire suivant pour les activations sur silicium poreux, cristallin ou amorphe.



**Figure 24 : Rendement d'activation à 15°C avec [EDC]=[NHS]= 5mM pour différentes surfaces : 100%, 25% et 10% acide.**

#### 4. Conclusion : Mode opératoire choisi

Comme pour la préparation de surfaces acides, la verrerie est lavée au détergent, copieusement rincée à l'eau MilliQ puis séchée à l'étuve. Les réactifs EDC et NHS (98% de pureté) sont fournis par Sigma Aldrich. Des solutions sont fraîchement préparées pour chaque réaction avec de l'eau MilliQ à 4°C et stockées dans la glace. Dans un tube de Schlenk préalablement dégazé sous argon pendant 5 minutes dans un bain thermostaté à 15°C, un volume égal des solutions d'EDC ( $10^{-2}$  M) et de NHS ( $10^{-2}$  M) est introduit et dégazé 10 minutes pour atteindre la température du bain thermostaté. L'échantillon y est enfin introduit puis laissé pendant 90 minutes. La surface est enfin abondamment rincée à l'eau MilliQ puis séchée sous un flux d'azote.

## D. Réaction d'amidation

### 1. Introduction

La dernière réaction du protocole pour attacher une biomolécule de façon covalente à la surface est l'étape d'amidation. Comme le montre la figure 25, une (bio)molécule contenant une amine primaire peut réagir avec l'ester activé pour former une liaison amide très robuste.<sup>32,33</sup> Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi d'étudier l'amidation en utilisant de l'hexylamine ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH}_2$ ) et de l'éthanolamine ( $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ).

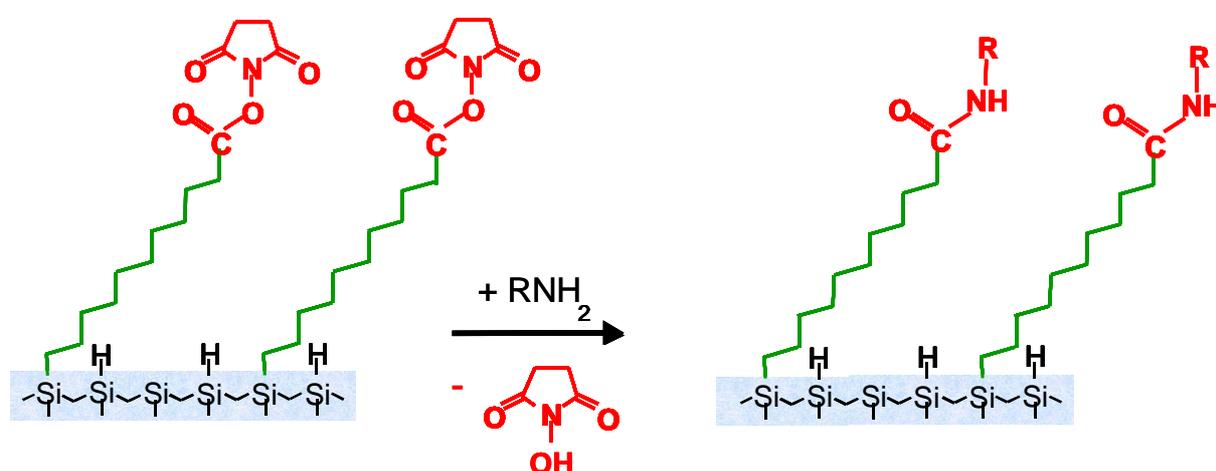


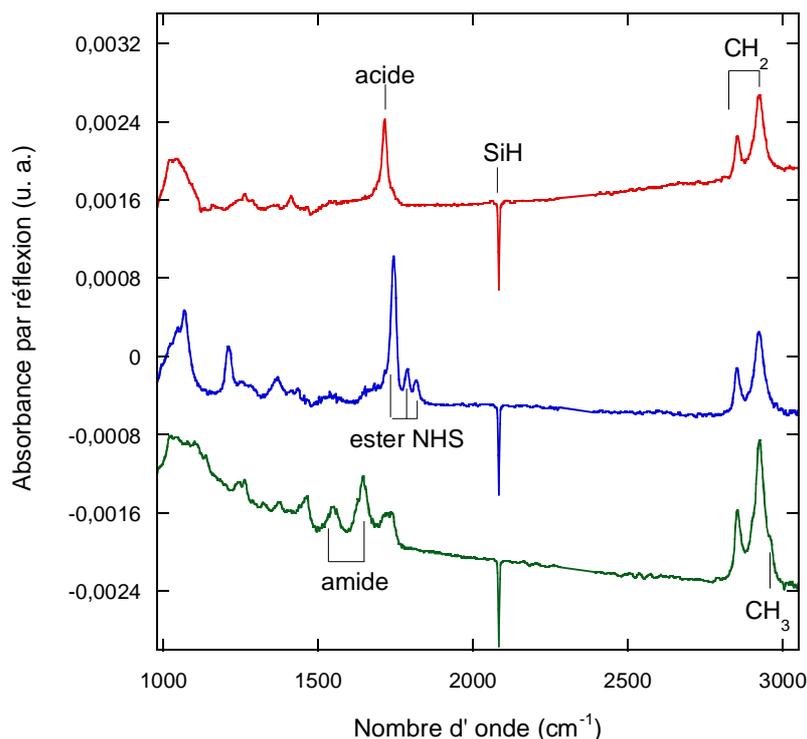
Figure 25 : Représentation schématique de l'amidation.

### 2. Amidation par l'hexylamine

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'accrochage de l'hexylamine sur des surfaces activées dans les conditions décrites précédemment. Pour ce faire, nous avons suivi le protocole décrit par A. Moraillon et coll.<sup>32</sup>:

On laisse réagir une surface activée dans une solution d'hexylamine à  $10^{-3}$  M dans un tampon phosphate PBS 1X ( $[\text{NaCl}] = 0,137$  M ;  $[\text{KCl}] = 0,002$  M ;  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 0,008$  M ;  $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0,002$  M) à pH 7. La figure 26 montre les spectres d'une surface acide, activée et amidée. Le spectre de référence est une surface hydrogénée atomiquement plane. Les bandes caractéristiques de l'ester NHS disparaissent au bénéfice des bandes de vibration des liaisons amides I et II ( $1550$  et  $1650$   $\text{cm}^{-1}$ ). On note aussi que les bandes de vibration des  $\text{CH}_2$  sont

nettement plus intenses et qu'un épaulement apparaît à  $2960\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique de la vibration des liaisons  $\text{CH}_3$ . La disparition complète des bandes caractéristiques de l'ester de succinimide nous montre que la réaction d'amidation est totale. On peut noter la présence d'acide résiduel à la surface grâce au pic élargi entre  $1710$  et  $1740\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de groupements carboxyles isolés. Ceci est en accord avec ce que Morailon et coll. ont observé dans le cadre de leur étude quantitative de l'amidation de surfaces de silicium.<sup>32</sup>

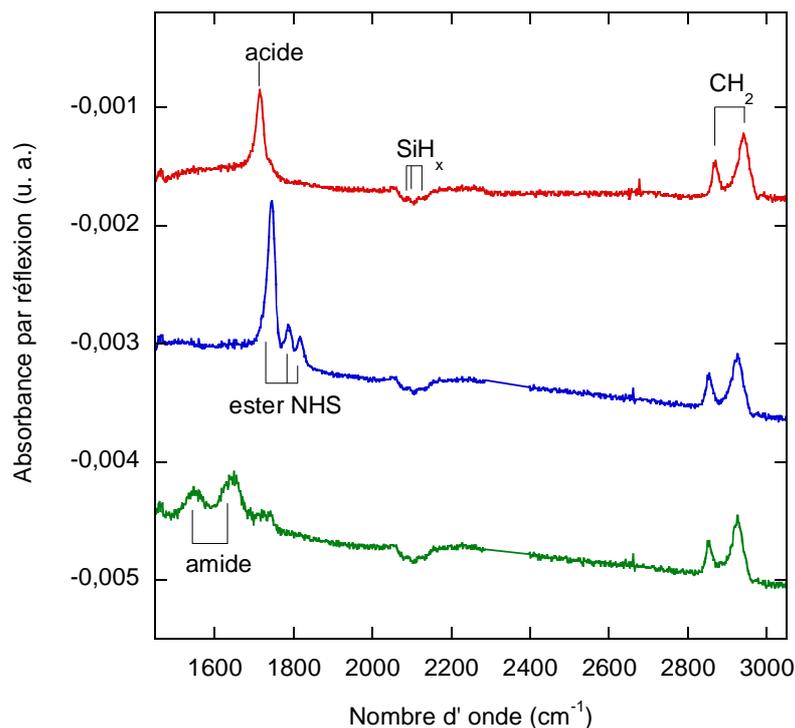


**Figure 26 : Spectres infrarouges d'une surface acide (rouge), activée (bleu) et amidée avec l'hexylamine  $10^{-3}\text{ M}$  dans le PBS 1X (vert) en polarisation p. Le spectre de référence est une surface SiH.**

### 3. Amidation par l'éthanolamine

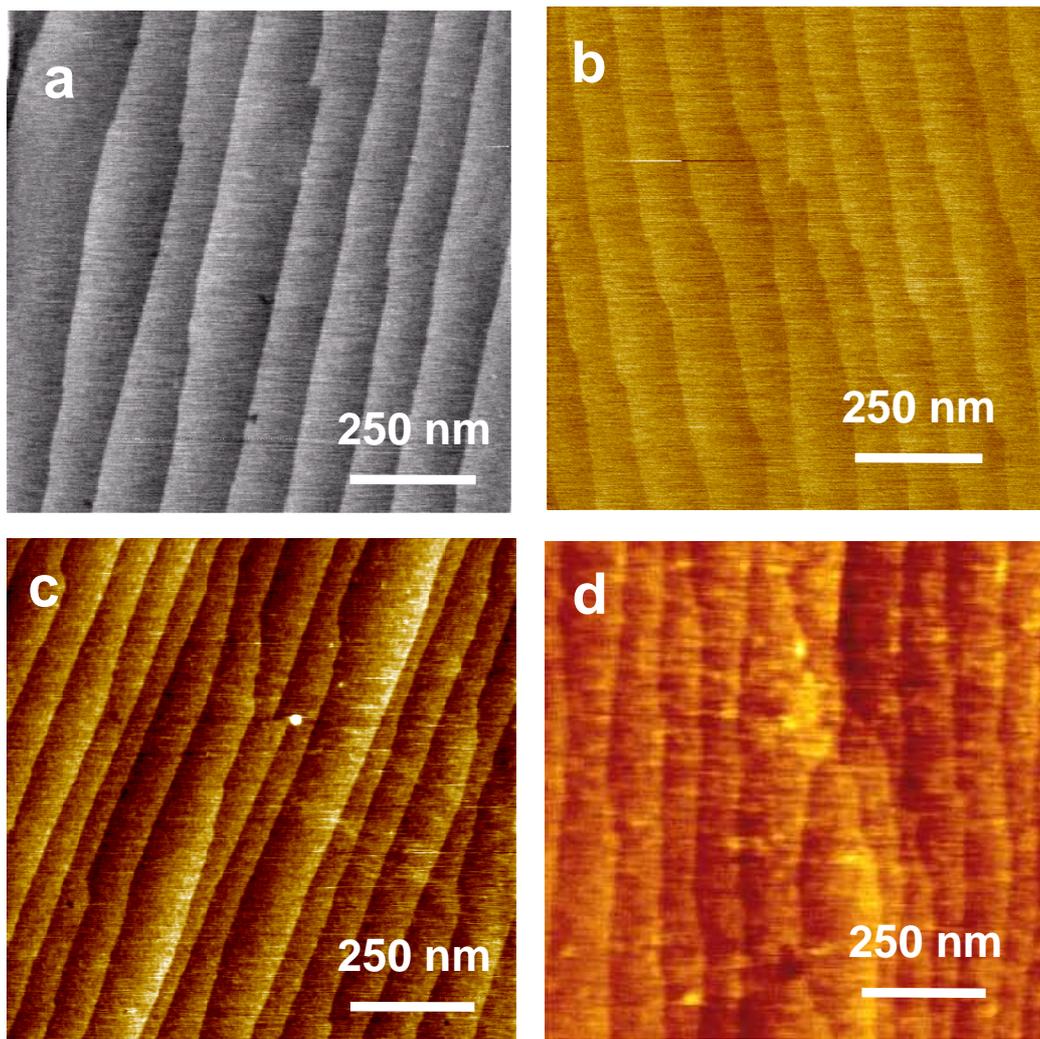
Nous avons étudié l'amidation par l'hexylamine car dans la suite de nos travaux, nous utiliserons des brins d'ADN terminés par des groupements aminohexyles pour les accrocher de façon covalente à la surface. Cependant nous ne déposerons pas des brins d'ADN sur toute la surface, nous procéderons à l'amidation par « spotting » (étape décrite au chapitre suivant). Afin de limiter l'adsorption non spécifique et de favoriser l'hybridation entre les brins d'ADN complémentaires lors de l'utilisation de la biopuce, les sites non amidés par l'ADN sont

bloqués par réaction pendant 15 minutes avec une amine primaire, l'éthanolamine.<sup>62</sup> La solution utilisée est une solution à  $5 \cdot 10^{-2}$  M préparée dans l'eau MilliQ à partir d'une solution d'éthanolamine stock à 99,5% fournie par Sigma-Aldrich. La figure 27 montre les spectres obtenus à chaque étape de fonctionnalisation d'une surface hydrogénée dans HF (SiH<sub>x</sub>). Comme dans le cas d'une surface atomiquement plane et amidée par l'hexylamine, on se rend compte du caractère quantitatif de la réaction d'amidation.



**Figure 27 : Spectres infrarouges d'une surface acide (rouge), activée (bleu) et amidée avec l'éthanolamine  $5 \cdot 10^{-2}$  M (vert) en polarisation p. Le spectre de référence est une surface SiH<sub>x</sub>.**

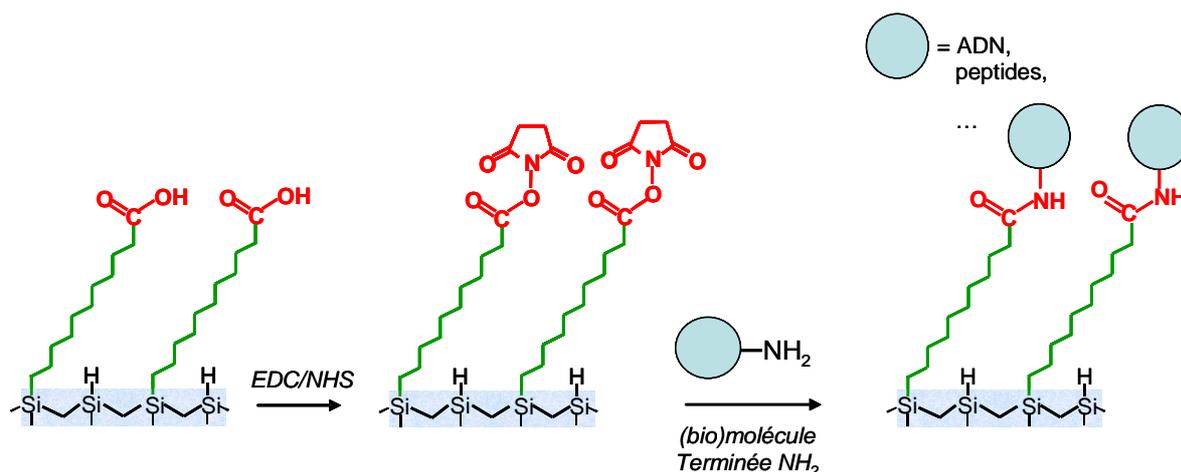
La figure 28 montre les images AFM d'une surface hydrogénée atomiquement plane (a), successivement fonctionnalisée par l'acide undécylénique (b), activée dans les conditions optimales ( $[EDC] = 5 \text{ mM} / [NHS] = 5 \text{ mM}$ , 90 min à 15°C) (c) et amidée dans l'éthanolamine (d). Ces images AFM nous permettent de voir qu'à chaque étape du traitement, la topographie de la surface est comparable à celle de l'état initial. La présence des terrasses atomiquement planes et l'absence de résidus sur la surface indiquent la formation de couches homogènes à la surface.



**Figure 28 : Images AFM  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  d'une surface : hydrogénée (a) ; acide (b) ; activée (c) et amidée avec l'éthanolamine  $10^{-2}$  M (d).**

# Conclusion

Nous avons montré comment accrocher de façon covalente des molécules organiques à une surface de silicium, à partir de monocouches terminées acides. Ceci est possible par un mécanisme en deux étapes (activation / amidation) résumé sur la figure 29. Grâce à des caractérisations par microscopie à force atomique et des mesures en spectroscopie infrarouge en mode ATR (ex situ et in situ), nous avons pu optimiser chaque étape du protocole. Les surfaces acides ayant fait l'objet de nombreuses études détaillées,<sup>23,24,26</sup> nous les avons donc utilisées comme substrat de départ pour étudier de façon quantitative la réaction d'activation. Ceci nous a permis de comprendre le mécanisme et d'établir quelles étaient les meilleures conditions d'activation. Nous avons pu aussi montrer le caractère contrôlé de l'étape d'amidation.



**Figure 29 :** Représentation schématique du mécanisme d'accrochage covalent de biomolécules à une surface de silicium fonctionnalisée par des groupements carboxyles.

Au terme de cette première partie, nous disposons donc d'une procédure de fonctionnalisation de surface du silicium cristallin, robuste et validée quantitativement. En l'absence de gênes stériques des sondes immobilisées lors de l'étape d'amidation, le rendement d'immobilisation sera limité par l'étape d'activation. De façon intéressante, si ce rendement est limité à des valeurs de l'ordre de 2/3 sur des surfaces atomiquement planes pour lesquelles les couches greffées sont très denses, il atteint des valeurs élevées de l'ordre de 85% sur les surfaces SiH<sub>x</sub>, rugueuses à l'échelle atomique.

# Bibliographie

- (1) Higashi, G. S.; Chabal, Y. J.; Trucks, G. W.; Raghavachari, K. *Applied Physics Letters* **1990**, *56*, 656-658.
- (2) Linford, M. R.; Fenter, P.; Eisenberger, P. M.; Chidsey, C. E. D. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 3145-3155.
- (3) Buriak, J. M. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 1271-1308.
- (4) Wayner, D. D. M.; Wolkow, R. A. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **2002**, 23-34.
- (5) Boukherroub, R. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2005**, *9*, 66-72.
- (6) Shirahata, N.; Hozumi, A.; Yonezawa, T. *Chemical Record* **2005**, *5*, 145-159.
- (7) Stutzmann, M.; Garrido, J. A.; Eickhoff, M.; Brandt, M. S. *Physica Status Solidi a* **2006**, *203*, 3424-3437.
- (8) Munford, M. L.; Cortès, R.; Allongue, P. *Sensors and Materials* **2001**, *13*, 259-269.
- (9) Beckmann, K. H. *Surface Science* **1965**, *3*, 314-&.
- (10) Harrick, N. J.; Beckmann, K. H. *éd. par P.F. Kane et G. R. Larrabee* **1974**, 242-243.
- (11) Burrows, V. A.; Chabal, Y. J.; Higashi, G. S.; Raghavachari, K.; Christman, S. B. *Applied Physics Letters* **1988**, *53*, 998-1000.
- (12) Chabal, Y. J. *Surface Science* **1986**, *168*, 594-608.
- (13) Chabal, Y. J.; Higashi, G. S.; Raghavachari, K.; Burrows, V. A. *Journal of Vacuum Science & Technology a* **1989**, *7*, 2104-2109.
- (14) Tardella, A.; Chazalviel, J.-N. *Applied Physics Letters* **1985**, *47*, 334-336.
- (15) Ubara, H.; Imura, T.; Hiraki, A. *Solid State Communications* **1984**, *50*, 673-675.
- (16) Yablonovitch, E.; Allara, D. L.; Chang, C. C.; Gmitter, T.; Bright, T. B. *Physical Review Letters* **1986**, *57*, 249-252.
- (17) Weinberger, B. R.; Peterson, G. G.; Eschrich, T. C.; Krasinski, H. A. *Journal of Applied Physics* **1986**, *60*, 3232-3234.
- (18) Jakob, P.; Chabal, Y. J. *Journal of Chemical Physics* **1991**, *95*, 2897-2909.
- (19) Jakob, P.; Chabal, Y. J.; Raghavachari, K.; Becker, R. S.; Becker, A. J. *Surface Science* **1992**, *275*, 407-413.
- (20) Trucks, G. W.; Raghavachari, K.; Higashi, G. S.; Chabal, Y. J. *Physical Review Letters* **1990**, *65*, 504-507.
- (21) Allongue, P.; Kieling, V.; Gerischer, H. *Electrochimica Acta* **1995**, *40*, 1353-1360.
- (22) Fukidome, H.; Matsumura, M. *Applied Surface Science* **1998**, *130*, 146-150.
- (23) Aureau, D. *Thèse (PMC, Ecole Polytechnique)* **2008**, <http://pastel.paristech.org/>.
- (24) Douarche, C. *Thèse (IRI, Université de Lille 1)* **2007**.
- (25) Dusciac, D. *Thèse (PMC, Ecole Polytechnique)* **2008**, <http://pastel.paristech.org/>.
- (26) Fauchoux, A. *Thèse (PMC, Ecole Polytechnique)* **2005**.

- (27) Allongue, P.; Henry de Villeneuve, C.; Morin, S.; Boukherroub, R.; Wayner, D. D. M. *Electrochimica Acta* **2000**, *45*, 4591-4598.
- (28) Jakob, P.; Chabal, Y. J.; Kuhnke, K.; Christman, S. B. *Surface Science* **1994**, *302*, 49-56.
- (29) Raghavachari, K.; Jakob, P.; Chabal, Y. J. *Chemical Physics Letters* **1993**, *206*, 156-160.
- (30) Aureau, D.; Rappich, J.; Moraillon, A.; Allongue, P.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, accepted.
- (31) Schöning, M. J.; Luth, H. *Physica Status Solidi a* **2001**, *185*, 65-77.
- (32) Moraillon, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 7158-7167.
- (33) Voicu, R.; Boukherroub, R.; Bartzoka, V.; Ward, T.; Wojtyk, J. T. C.; Wayner, D. D. M. *Langmuir* **2004**, *20*, 11713-11720.
- (34) Faucheux, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N. *Langmuir* **2006**, *22*, 153-162.
- (35) Boukherroub, R.; Morin, S.; Sharpe, P.; Wayner, D. D. M.; Allongue, P. *Langmuir* **2000**, *16*, 7429-7434.
- (36) Buriak, J. M.; Allen, M. J. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 1339-1340.
- (37) Henry de Villeneuve, C.; Pinson, J.; Bernard, M. C.; Allongue, P. *Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 2415-2420.
- (38) Ozanam, F.; Vieillard, C.; Warntjes, M.; Dubois, T.; Pauly, M.; Chazalviel, J. N. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **1998**, *76*, 1020-1026.
- (39) Sieval, A. B.; Demirel, A. L.; Nissink, J. W. M.; Linford, M. R.; van der Maas, J. H.; de Jeu, W. H.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R. *Langmuir* **1998**, *14*, 1759-1768.
- (40) Sieval, A. B.; Vleeming, V.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R. *Langmuir* **1999**, *15*, 8288-8291.
- (41) Cicero, R. L.; Linford, M. R.; Chidsey, C. E. D. *Langmuir* **2000**, *16*, 5688-5695.
- (42) Sieval, A. B.; Linke, R.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R. *Advanced Materials* **2000**, *12*, 1457-1460.
- (43) Sieval, A. B.; van den Hout, B.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R. *Langmuir* **2000**, *16*, 2987-2990.
- (44) Hermanson, G. T. *Academic Press: San Diego* **2008**.
- (45) Strother, T.; Cai, W.; Zhao, X. S.; Hamers, R. J.; Smith, L. M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 1205-1209.
- (46) Valeur, E.; Bradley, M. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 606-631.
- (47) Bocking, T.; James, M.; Coster, H. G. L.; Chilcott, T. C.; Barrow, K. D. *Langmuir* **2004**, *20*, 9227-9235.
- (48) Dordi, B.; Schonherr, H.; Vancso, G. J. *Langmuir* **2003**, *19*, 5780-5786.
- (49) Taratula, O.; Galoppini, E.; Mendelsohn, R.; Reyes, P. I.; Zhang, Z.; Duan, Z.; Zhong, J.; Lu, Y. *Langmuir* **2009**, *25*, 2107-13.
- (50) Wojtyk, J. T. C.; Morin, K. A.; Boukherroub, R.; Wayner, D. D. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 6081-6087.
- (51) Yang, M.; Teeuwen, R. L. M.; Giesbers, M.; Baggerman, J.; Arafat, A.; de Wolf, F. A.; van Hest, J. C. M.; Zuilhof, H. *Langmuir* **2008**, *24*, 7931-7938.
- (52) Staros, J. V.; Wright, R. W.; Swingle, D. M. *Analytical Biochemistry* **1986**, *156*, 220-222.

- (53) Touahir, L.; Sam, S.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N.; Allongue, P.; Henry de Villeneuve, C.; Gabouze, N.; Djebbar, S.; Gouget-Laemmel, A. C.; *Sensor Letters* **2010**, accepted.
- (54) Briand, E.; Salmain, M.; Compere, C.; Pradier, C. M. *Colloids and Surfaces B* **2006**, *53*, 215-224.
- (55) Chi, Y. S.; Jung, Y. H.; Choi, I. S.; Kim, Y. G. *Langmuir* **2005**, *21*, 4669-4673.
- (56) Lahiri, J.; Isaacs, L.; Tien, J.; Whitesides, G. M. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 777-790.
- (57) Wei, F.; Sun, B.; Liao, W.; Ouyang, J. H.; Zhao, X. S. *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, *18*, 1149-1155.
- (58) Jang, L. S.; Keng, H. K. *Biomedical Microdevices* **2008**, *10*, 203-211.
- (59) Mirsky, V. M.; Riepl, M.; Wolfbeis, O. S. *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, *12*, 977-989.
- (60) Touahir, L.; Moraillon, A.; Sam, S.; Gouget-Laemmel, A. C.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; Henry de Villeneuve, C.; Ozanam, F. *ECS Trans.* **2009**, *19*, 283-292.
- (61) Sam, S.; Touahir, L.; Salvador Andresa, J.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Gabouze, N.; Djebbar, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 809-814.
- (62) Touahir, L.; Moraillon, A.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; de Villeneuve, C. H.; Ozanam, F.; Solomon, I.; Gouget-Laemmel, A. C. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *25*, 952-955.