



HAL
open science

Détection de l'hybridation de l'ADN sur réseaux de transistors à effet de champ avec fixation polylysine

Cédric Gentil

► **To cite this version:**

Cédric Gentil. Détection de l'hybridation de l'ADN sur réseaux de transistors à effet de champ avec fixation polylysine. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT: . tel-00110298

HAL Id: tel-00110298

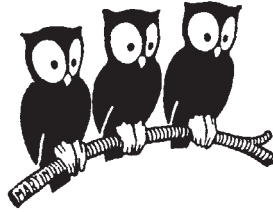
<https://theses.hal.science/tel-00110298>

Submitted on 27 Oct 2006

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

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

DÉPARTEMENT DE PHYSIQUE
DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

(Spécialité Physique des Liquides)

présentée par :

CÉDRIC GENTIL

pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

sujet de la thèse :

**Détection de l'hybridation de l'ADN
sur réseaux de transistors à effet de champ
avec fixation polylysine**

soutenue le 26 Mai de l'an 2005 devant la commission d'examen :

M.	C. Boccaro	Rapporteur
M.	U. Bockelmann	Directeur de thèse
M.	G. Decher	Examineur
M.	P. Fromherz	Examineur
M.	J.F. Joanny	Examineur
M.	E. Sackmann	Rapporteur

Table des matières

1	Introduction	1
2	Ere post-génomique et puces à ADN	3
2.1	De l'ADN aux protéines	4
2.1.1	Les acides nucléiques	4
2.1.2	La structure double hélice de l'ADN	4
2.1.3	Gènes, transcription et traduction de l'information génétique	6
2.2	Le projet génome humain	9
2.2.1	Méthodes de séquençage	9
2.2.2	Les banques d'ADNc	9
2.3	L'ère de l'analyse post-génomique	10
2.3.1	Transcriptome et protéome	10
2.3.2	Les puces à ADN et leurs applications	11
2.3.3	Technologies des puces à ADN	14
2.4	Détection électronique sur structures semi-conductrices	17
2.4.1	EOSFET et nanostructures semi-conductrices	17
2.4.2	Application à la détection de l'hybridation de l'ADN	18
3	Détection électronique sur réseaux de transistors à effet de champ : dispositifs et protocoles expérimentaux	20
3.1	Principe de la détection électronique	20
3.1.1	MOSFETs et EOSFETs	21
3.1.2	Détection différentielle de charges à la surface de transistors à effet de champ	22
3.2	Structures des réseaux de transistors	23
3.2.1	Les puces électroniques	23
3.2.2	Les différents réseaux	24
3.3	Caractéristiques courant-tension des transistors	26
3.3.1	Acquisition des caractéristiques courant-tension	26
3.3.2	Allure des caractéristiques courant-tension	28
3.4	Dispositifs de déposition	30
3.4.1	Réalisation de macrodépôts	30
3.4.2	Microdéposition manuelle à l'aide de pointes à ascension capillaire	31
3.4.3	Microdéposition automatisée à l'aide de pointes piezoélectriques	32
3.5	Acquisition d'images de fluorescence	34
3.5.1	Dispositif de mesure de la fluorescence	34
3.5.2	Réalisation des images de fluorescence	35
3.6	Protocole de greffage des sondes : la fixation polylysine	36
3.7	Expérience de détection de polylysine et d'ADN sur réseaux de transistors	37
3.7.1	Protocole expérimental de détection électronique	38
3.7.2	Modifications des caractéristiques courant-tension lors d'un apport de charges	39
3.7.3	Analyse en tension et analyse en courant	41

4	Détection électronique à faible concentration en sel	44
4.1	Détection électronique de la polylysine	44
4.1.1	Macrodépôts	45
4.1.2	Microdépôts de concentration variable	47
4.1.3	Stabilité de la couche de polylysine déposée	50
4.2	Détection électronique de l'ADN	51
4.2.1	Validation du protocole de fixation des ADN sondes et analyse globale des microdépôts d'ADN	51
4.2.2	Sensibilité de la détection d'ADN	56
4.2.3	Conclusions	61
5	Influence de l'électrolyte de mesure sur la détection électronique	62
5.1	Réseaux partiellement recouverts de polylysine dans la gamme bas sel	63
5.1.1	Observations expérimentales	63
5.1.2	Modélisation des effets de sel : le modèle σ_{eff} constant	65
5.1.3	Ajustement des courbes $\Delta U_{SE} = f([KCl])$ par le modèle σ_{eff} constant	68
5.1.4	Modélisation de l'interface SiO ₂ /électrolyte avec un paramètre σ_{eff} variable	69
5.2	Réseaux partiellement recouverts de polylysine dans la gamme haut sel. Phénomènes d'inversion de pics	74
5.2.1	Observations expérimentales	75
5.2.2	Caractérisation du phénomène d'inversion de pics	76
5.3	Inversions de pics sur le système ADN/polylysine/SiO ₂	79
5.3.1	Mise en évidence du phénomène	79
5.3.2	Evolutions des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([KCl])$ et comparaison au modèle σ_{eff} constant	80
5.3.3	Réorganisation de la structure polylysine/ADN lors de séries d'augmentations de la concentration de l'électrolyte de mesure	83
6	Analyse du phénomène d'inversion de pics de polylysine à haut sel	88
6.1	Structures et propriétés d'une couche de polyélectrolytes déposée sur une surface chargée	88
6.1.1	Structures d'une couche de polyélectrolytes déposée sur une surface chargée	89
6.1.2	Caractérisations de la couche de polylysine déposée	89
6.1.3	Variations de l'épaisseur de couches de polyélectrolytes en fonction de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure	92
6.2	Analyses complémentaires du comportement de la polylysine à haut sel	95
6.2.1	Influence de la charge de canal	95
6.2.2	Influence de la nature de l'électrolyte de mesure	96
6.2.3	Un modèle simple	100
6.3	Conclusions	106
7	Détection électronique de l'hybridation avec fixation polylysine	106
7.1	Réactions et protocoles d'hybridation	108
7.2	Expériences d'hybridation sans étape de blocage	111
7.2.1	Expériences d'hybridation dans un électrolyte de mesure de KCl à 20 mM	111

7.2.2	Augmentation des $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ lors d'hybridations dans $[KCl] = 50$ mM et de mesures à 0,01 mM	119
7.3	Hybridation avec bloqueur	123
7.3.1	Conditions de blocage	125
7.3.2	Expériences d'hybridation avec bloqueur	129
7.4	Interprétations et comparaisons à la littérature	132
7.4.1	Origine des signaux différentiels d'hybridation	132
7.4.2	Comparaison à la littérature	134
8	Conclusion	139
A	Clonage, électrophorèse sur gel et PCR	143
A.1	Quelques techniques expérimentales de base	143
A.1.1	Le clonage de gènes ou technique de l'ADN recombinant	143
A.1.2	L'électrophorèse sur gel	145
A.1.3	La PCR	147
A.2	Les développements de l'analyse des gènes	148
A.2.1	La génétique inverse	149
A.2.2	La prévention des maladies	149
A.2.3	Aspects commerciaux	150
B	Analyse quantitative des densités surfaciques moyennes d'ADN déposées par le nanospotter GESIM	151
B.1	Dispositif expérimental	152
B.1.1	Dispositif de mesure-Scanner-Genepix 4000B	152
B.1.2	Dépôts d'ADN et mesures de fluorescence	152
B.1.3	Traitement de l'image de fluorescence	153
B.2	Résultats	153
B.2.1	Surfaces des microdépôts	153
B.2.2	Volumes des microdépôts et densités surfaciques moyennes de molécules déposées	154
B.3	Conclusions	156
C	Modélisations du système FET/SiO₂/électrolyte	157
C.1	Le système FET/SiO ₂ nu/électrolyte 1:1 : modèle à charge effective constante	158
C.1.1	Le couplage FET/électrolyte	158
C.1.2	Expression de la tension source/électrode en fonction de la concentration en sel de l'électrolyte	159
C.1.3	Ajustement des données expérimentales	161
C.1.4	Corrections d'activité et de concentration	162
C.1.5	Caractéristiques du modèle à charge effective constante	163
C.2	Modélisation de l'interface SiO ₂ /électrolyte avec un paramètre σ_{eff} variable	165

Chapitre 1

Introduction

Développées dans le cadre d'un projet pluridisciplinaire il y a une vingtaine d'années, les puces à ADN sont aujourd'hui devenues un outil majeur dans le domaine de la génétique. Cette nouvelle technique permettant l'étude des profils d'expression des gènes à l'échelle d'un génome entier, elle est de nos jours appliquée aussi bien à la détection et à l'analyse des mutations, que lors de l'établissement de diagnostics médicaux ou encore durant les processus de mise au point de nouveaux médicaments. Le principe des puces à ADN est fondé sur la spécificité de la réaction d'association de brins d'ADN complémentaires, ou hybridation, et permet d'étudier en parallèle plusieurs milliers de séquences d'ADN ou d'ARN. Actuellement, la détection de l'hybridation sur puces requiert un marquage préalable des molécules d'ADN au moyen de fluorophores. Bien que la détection par fluorescence s'avère très sensible, la mise en place d'une technique sans étape de marquage permettrait d'automatiser et de simplifier la lecture des puces, de réduire la durée et le coût des tests et rendrait également possible un suivi temporel de la réaction d'hybridation.

Afin de développer des méthodes alternatives à la fluorescence, des efforts importants ont été engagés ces dernières années et ont débouché sur la mise en place de différents procédés utilisant des techniques de détection aussi bien optiques que mécaniques, électrochimiques ou encore électroniques. Parmi l'ensemble de ces approches, l'application des technologies de type transistor à effet de champ à la détection d'interactions entre molécules chargées, apparaît très prometteuse. Ces capteurs semi-conducteurs, initialement introduits par P. Bergveld [1] dans les années soixante-dix, ont depuis été essentiellement utilisés dans le cadre de la détection de protéines. C'est à la fin des années quatre-vingt-dix que Souteyrand et collaborateurs [2] ont mis en évidence la possibilité d'une détection électronique de l'hybridation de l'ADN sur un unique transistor. Cependant, l'étude des profils d'expression des gènes nécessitant une analyse massivement parallèle, l'intégration d'un grand nombre de capteurs par puce se présente comme une nécessité. Dans ce contexte, l'utilisation de réseaux de transistors à effet de champ dérivés de la technologie CMOS, semble très prometteuse en vue d'une application future à une détection électronique de l'hybridation sur puces à ADN.

C'est dans le but d'étudier la faisabilité d'une telle détection, qu'un nouveau projet de recherche a été lancé au Laboratoire Pierre Aigrain en l'an 2000. En Mai 2004, F.Pouthas a soutenu

une thèse de doctorat démontrant la compatibilité d'un tel système avec la détection d'une couche de polylysine immobilisée sur la surface des capteurs, puis avec celle de courts fragments d'ADN adsorbés sur la couche de polylysine préalablement déposée [3, 4, 5]. Il apparaît que les variations des caractéristiques électroniques des transistors présentent des évolutions contraires, corrélées à un apport de charges positives dans le cas de la polylysine, et négatives lors du dépôt d'oligonucléotides. Par ailleurs, toutes les mesures électroniques s'effectuant dans un environnement aqueux, la concentration en contre-ions de l'électrolyte utilisé influence l'écrantage des biomolécules chargées présentes sur la surface des capteurs et donc la sensibilité de la détection. L'étude de ce paramètre constitue, de manière générale, un aspect clé du système puisque les caractéristiques de la réaction d'appariement entre brins d'ADN complémentaires dépendent de manière importante de la concentration en sel du tampon dans laquelle elle est effectuée.

Les résultats présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité de ce travail. Des analyses complémentaires ont été effectuées afin de préciser la sensibilité des capteurs en fonction de la quantité d'ADN déposée. L'étude des effets induits par des variations de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure a également été poursuivie, notamment en ce qui concerne la mise en évidence et l'analyse de phénomènes inattendus, baptisés inversions de pics, révélant des modifications de la structure de la couche ADN/polylysine lors de son immersion dans une solution de concentration en sel supérieure à dix millimolaires environ. Ces différentes caractérisations ont constitué des étapes préliminaires aux expériences de détection de l'hybridation. La mise en place d'un protocole dérivé de celui classiquement employé dans les puces à ADN avec fixation polylysine, a permis de mettre en évidence un signal électronique différentiel caractérisant la réaction d'hybridation entre simples-brins complémentaires sur une zone déterminée d'un réseau de transistors. Ces résultats seront comparés à ceux publiés ces dernières années et obtenus soit avec des capteurs semi-conducteurs [2, 6, 7, 8, 9], soit à l'aide de systèmes fondés sur d'autres principes de détection [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18].

Le premier chapitre de ce manuscrit présente succinctement le principe des puces à ADN et introduit leur utilisation dans le domaine de la génétique. La seconde partie détaillera les structures des réseaux de transistors utilisés, les différents systèmes de mesure développés au laboratoire ainsi que les méthodes d'analyse mises en place afin d'étudier la détection électronique de biomolécules adsorbées sur la surface des capteurs. Le début du chapitre 3 reviendra sur les principaux résultats qui ont permis de conclure à la détection reproductible de polylysine, puis à celle de simples-brins d'ADN fixés électrostatiquement à l'interface transistor/polylysine. L'utilisation d'un robot réalisant des microdépôts de volume contrôlé et variable, a par la suite permis de mieux définir la gamme de sensibilité des capteurs en fonction de la quantité d'ADN déposée. Cette étude fera l'objet de la seconde partie du chapitre 3. Les chapitres 4 et 5 montreront l'influence de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure sur la détection électronique ainsi que sur les analyses expérimentales et théoriques effectuées sur le phénomène d'inversion de pics. Enfin, le dernier chapitre de ce manuscrit détaillera les démarches mises en place afin d'aboutir à une détection électronique reproductible de l'hybridation sur des réseaux de transistors recouverts de polylysine, ainsi que les différentes conclusions que nous avons pu tirer de ces études. Des compléments plus détaillés de certains aspects abordés au cours de ce manuscrit ont été regroupés dans les appendices.

Chapitre 2

Ere post-génomique et puces à ADN

Près d'un siècle et demi s'est écoulé entre les expériences de Mendel (1860) montrant l'existence chez les organismes vivants de caractères héréditaires transmissibles d'une génération à l'autre : les gènes, et le très médiatique clonage de Dolly [19] (1996). Cependant entre ces deux dates la génétique¹, comme beaucoup d'autres disciplines scientifiques, a connu un développement très chaotique. En effet, même si l'ADN est isolé dès 1869 par J.F.Miescher [20], il faut attendre les années quarantes [21, 22] pour acquérir la certitude que cette molécule est bien le support de l'information génétique. C'est en 1953 que Watson et Crick proposent un modèle de la structure de l'ADN qui mit fin à plusieurs années de controverse mais surtout ouvrit la voie à la compréhension de nombreux phénomènes. Aujourd'hui, le séquençage complet des génomes de différents organismes a permis l'entrée dans l'ère de l'analyse post-génomique. En effet, si la connaissance des séquences de bases associées aux différents gènes apparaît comme une information capitale, elle ne permet pas de comprendre les processus d'expression et de régulation des gènes au sein d'une cellule particulière, ni leurs évolutions lors du développement de réponses physiologiques ou de maladies.

Face à la complexité des phénomènes mis en jeu, il a été nécessaire de développer de nouveaux outils permettant d'analyser simultanément les milliers d'informations génétiques associées aux différents processus biologiques. C'est dans ce cadre qu'a émergé au milieu des années quatre-vingt-dix une nouvelle technique d'analyse massivement parallèle : les puces à ADN. Au delà de son impact en génétique, cette technique a également été le moteur du développement d'une classe plus large de "biocapteurs" : les biopuces, qui constituent aujourd'hui un domaine en plein essor technologique et économique.

Ce chapitre a pour but de définir plus précisément le cadre de cette thèse, en précisant les enjeux scientifiques de l'analyse post-génomique, le principe de fonctionnement des puces à ADN ainsi que les aspects technologiques de ces nouveaux outils.

¹Génétique : étude de l'hérédité biologique.

2.1 De l'ADN aux protéines

Au début du XXème siècle, s'il était admis que les chromosomes des noyaux cellulaires étaient les porteurs de l'information héréditaire, on pensait que seules les protéines avaient une complexité suffisante pour stocker cette information. C'est grâce à la structure double hélice de l'ADN proposée par Watson et Crick [23], que la notion de gène est devenue plus claire : l'information contenue dans l'ADN doit être exprimée pour avoir un effet sur la cellule. Pour cela des régions spécifiques de l'ADN (régions codantes ou gènes) sont d'abord transcrites sous forme d'ARN messagers (ARNm), qui vont véhiculer l'information génétique jusqu'à une machinerie de synthèse assurant leur traduction en protéines, véritables "agents d'exécution" de la cellule.

2.1.1 Les acides nucléiques

Chez la plupart des organismes vivants, le matériel de l'hérédité est l'ADN ou acide désoxyribonucléique. Cette molécule est un polymère dont les constituants de base sont : un sucre à cinq carbones appelé désoxyribose, un groupement phosphate et quatre bases azotées : l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G). L'association d'un sucre, d'un phosphate et d'une base forme une sous-unité appelée nucléotide (cf figure 2.1).

Dans les acides nucléiques tels que l'ADN et l'ARN², les nucléotides sont joints les uns aux autres par des liaisons covalentes pour former une chaîne polynucléotidique dans laquelle on peut distinguer :

- une alternance monotone de phosphates et de sucres que l'on appelle le squelette
- une succession de bases azotées.

C'est l'ordre de l'enchaînement des bases azotées le long de la molécule qui va coder les informations nécessaires au fonctionnement de la cellule.

2.1.2 La structure double hélice de l'ADN

L'ADN au sein de la cellule peut exister sous différentes formes en fonction de l'avancement du cycle cellulaire. Cependant, la structure la plus stable décrite par Watson et Crick [23], est constituée de deux chaînes polynucléotidiques complémentaires, maintenues ensemble par des liaisons hydrogène et enroulées en une double hélice. Les principales caractéristiques de cette molécule dite double-brin, sont décrites sur la figure 2.2. La grande innovation du modèle de Watson et Crick réside certainement dans la spécificité de l'appariement entre bases azotées. En effet, l'existence de liaisons hydrogène entre bases en vis à vis au centre de la molécule, impose la formation préférentielle des paires de bases (AT), via deux liaisons hydrogène et (CG) via trois liaisons hydrogène (cf figure 2.3). En conséquence, seul deux brins portant des séquences de bases complémentaires pourront être associés dans une structure d'ADN double-brin (cf figure 2.4). L'ensemble des liaisons hydrogène, ainsi que l'empilement des bases (forces de Van der Waals

²ARN : acide ribonucléique : acide nucléique dans lequel le sucre constitutif est le ribose, qui présente par rapport au désoxyribose, un groupement hydroxyle supplémentaire. L'ARN est généralement simple-brin et contient les quatre bases A, C, G, l'uracile U remplaçant la thymine. L'ARN constitue le matériel génétique de certains virus.

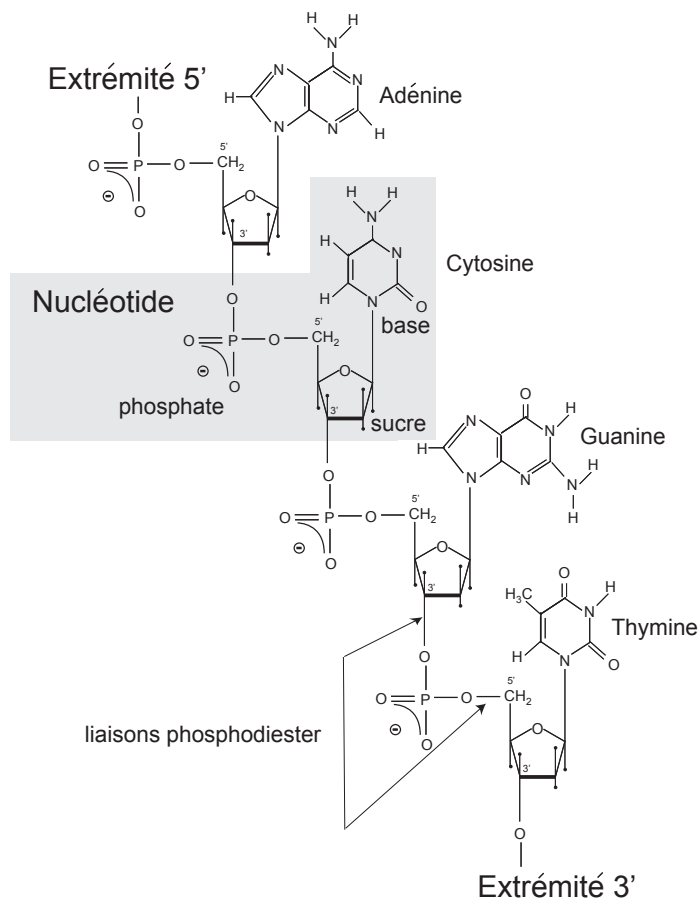


FIGURE 2.1: Structure chimique d'un simple-brin d'ADN constitué de quatre nucléotides portant chacun une base différente. Les nucléotides sont joints les uns aux autres pour former une chaîne polynucléotidique, dans laquelle le phosphate attaché au carbone 5' d'un sucre est lié au groupement hydroxyle attaché au carbone 3' du sucre suivant par une liaison phosphodiester. Un brin d'ADN possède donc une orientation puisqu'une extrémité porte un groupement 5'-phosphate et l'autre un groupement 3'-hydroxyle. Cette asymétrie permet de définir le sens de lecture de la séquence de bases d'un gène : on prend par convention le sens 5'→3' du brin codant le gène.

et interactions hydrophobes) le long de la molécule confèrent une extrême stabilité³ à l'ADN. Cependant le caractère faible des liaisons hydrogène a une conséquence importante : par simple chauffage par exemple, il est possible de séparer les deux simples-brins : c'est la dénaturation (cf figure 2.4). La réaction inverse d'association de deux simples-brins portant des séquences complémentaires s'appelle l'hybridation. La spécificité de cette dernière réaction constitue le principe de base de nombreuses expériences d'ingénierie génétique.

³Les liaisons hydrogène, bien que dix fois plus faibles que les liaisons covalentes, assurent par leur nombre (2500 par kilopaires de bases) la stabilité de l'édifice moléculaire. Cette stabilité a permis de retrouver des fragments d'ADN doubles-brins intacts, prélevés sur des momies datées de plus de 3000 ans.

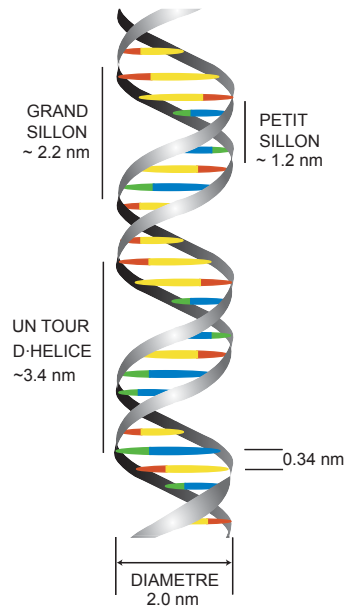


FIGURE 2.2: Le modèle de Watson et Crick de la molécule d'ADN. L'adénine est représentée en jaune, la thymine en rouge, la cytosine en bleu et la guanine en vert

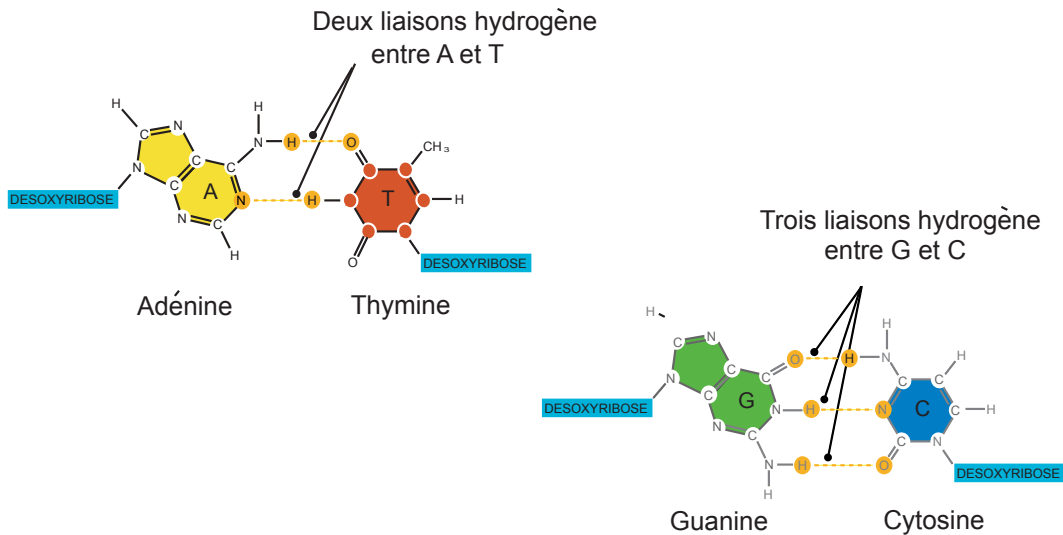


FIGURE 2.3: Spécificité de l'appariement entre bases complémentaires. L'adénine et la thymine sont associées par deux liaisons hydrogène, la cytosine et la guanine par trois.

2.1.3 Gènes, transcription et traduction de l'information génétique

Le long de l'ADN chromosomal, on peut distinguer des sous-ensembles d'acides nucléiques appelés gènes. L'ensemble des gènes d'un organisme vivant constitue son génome. L'information

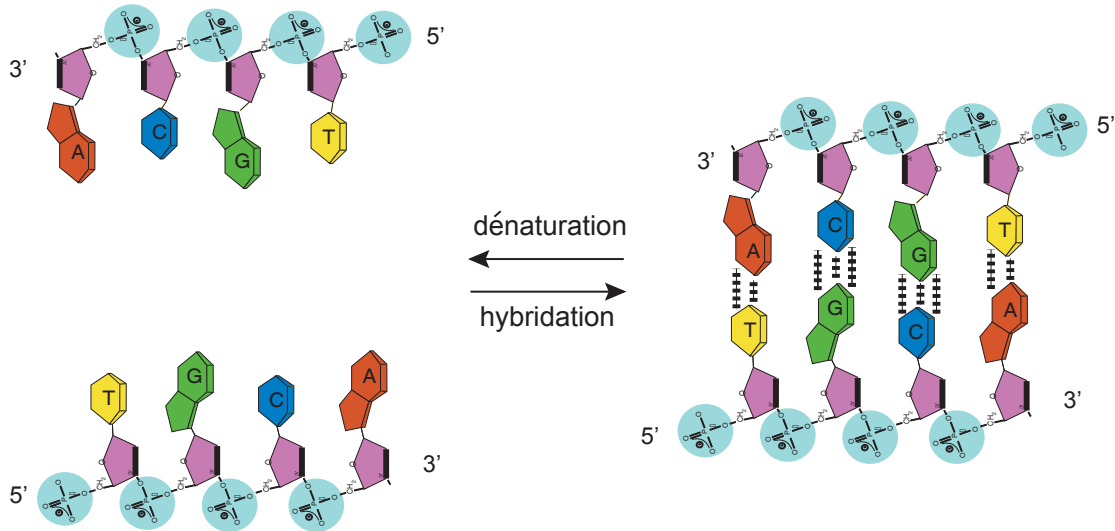


FIGURE 2.4: Hybridation et dénaturation de la molécule d'ADN. L'appariement se fait au niveau des paires de bases complémentaires. Dans le duplex d'ADN, les brins sont orientés de manière anti-parallèle : un brin orienté $5' \rightarrow 3'$ fait face à un brin orienté $3' \rightarrow 5'$.

génétique contenue dans la séquence de bases associée à un gène ⁴ permet de diriger la production de protéines et d'enzymes nécessaires au fonctionnement de la cellule. Cependant, si toutes les cellules d'un organisme possèdent la même information génétique, tous les gènes ne seront pas exprimés de la même manière dans chaque cellule. Par exemple, certains des gènes exprimés dans une cellule de cheveux (production de kératine) doivent être différents de ceux exprimés dans une cellule pancréatique nécessitant une grande production d'insuline. Cela montre l'extrême complexité des processus d'expression des gènes, faisant intervenir un grand nombre de phénomènes interdépendants. Sans entrer dans le détail, il est cependant possible de dégager les grandes lignes du processus permettant de passer de l'ADN aux protéines (cf figure 2.5). Ce processus comporte deux étapes : la transcription et la traduction.

- La séquence d'ADN codant un gène est d'abord transcrite en ARN messager (ARNm). Au cours de la transcription, des ARN de transfert (ARNt) et des ARN ribosomiaux (ARNr) sont également synthétisés.
- La traduction est le processus au cours duquel les ARNr et les ARNt décodent la séquence de bases de l'ARNm pour produire des chaînes linéaires d'acides aminés, appelées polypeptides, qui constituent les protéines. La séquence nucléotidique de l'ARNm est lue par triplet de bases appelés codons ; chaque codon commande l'insertion d'un acide aminé dans la chaîne peptidique. On trouve essentiellement vingt et un types d'acides aminés différents dans les protéines du vivant. Le code génétique qui regroupe les correspondances codon/acide aminé est commun à tous les organismes vivants connus, à de rares exceptions

⁴De façon surprenante, il est difficile de définir un gène en génétique moléculaire. En effet, la séquence codante est généralement associée à différents sites permettant, par exemple, la reconnaissance de protéines comme les ARN polymérase, les protéines de déclenchement de la transcription ou celles associées à la régulation du gène. On utilise parfois le terme cadre de lecture ouvert pour désigner la région du gène servant à coder les protéines.

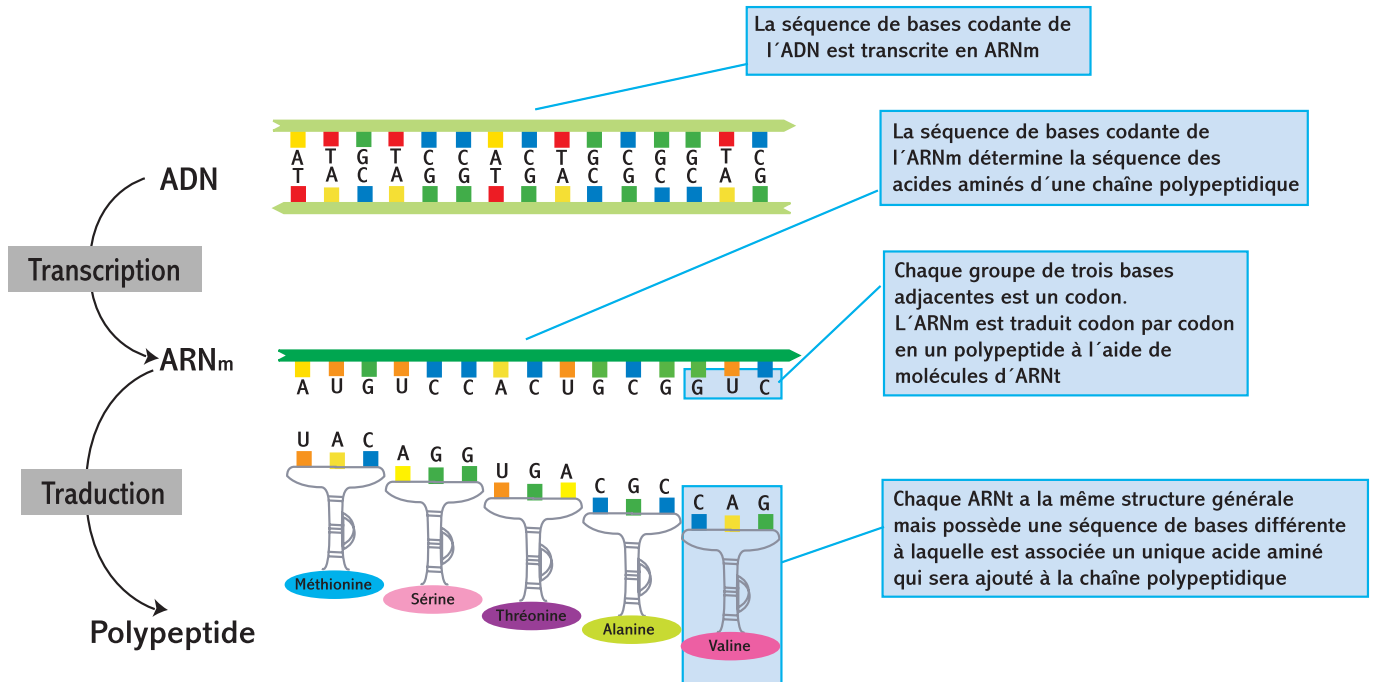


FIGURE 2.5: De l'ADN aux protéines : transcription et traduction de l'information génétique.

près.

Au cours de ces processus, de nombreuses autres protéines interviennent (répresseurs, activateurs, facteurs de transcription), permettant la régulation de l'expression des gènes en fonction des besoins de la cellule. On imagine aisément la complexité de l'étude de ces mécanismes lorsque l'on prend en compte que l'ADN constituant le génome humain contient quelques milliards de paires de bases, que "l'alphabet" ne comporte que quatre lettres A, T, C et G et qu'il existe des mutations pouvant avoir des conséquences multiples sur le fonctionnement des cellules.

À partir des années soixante-dix, la mise au point simultanée d'un certain nombre de techniques permettant des analyses plus systématiques de l'ADN et de l'expression des gènes, a constitué une véritable révolution qui fonde la biologie moléculaire moderne. Parmi ces méthodes, on peut citer l'électrophorèse sur gel [24], rendant possible la séparation de brins d'ADN de tailles différentes, la PCR, ou Polymerase Chain Reaction [25, 26, 27, 28, 29], permettant de fabriquer et d'amplifier des copies multiples d'un segment spécifique d'ADN, ou encore le clonage [30], offrant la possibilité de modifier de façon précise et dirigée le génotype d'un organisme. L'appendice A décrit brièvement ces différentes techniques ainsi que les évolutions qu'elles ont entraînées dans le domaine de l'analyse des gènes.

2.2 Le projet génome humain

Le développement des méthodes d'analyse des fragments d'ADN évoquées précédemment, a notamment permis la mise en place et le lancement, au début des années quatre-vingts, du projet génome humain. Ce projet, développé à l'échelle mondiale, se fixait pour buts l'identification et la détermination de la séquence d'ADN de l'ensemble du génome humain et de différents organismes modèles (mouche du vinaigre, souris de laboratoire...), ainsi que la mise en place de bases de données regroupant les informations à l'échelle planétaire.

2.2.1 Méthodes de séquençage

La plupart des séquençages effectués dans le cadre de ce projet ont utilisé la méthode de Sanger [31]. La connaissance de la séquence d'un fragment d'ADN par cette méthode repose sur la synthèse, à partir d'une position donnée en 5', de toutes les molécules complémentaires obtenues par allongement aléatoire du côté 3'. Les molécules nouvellement synthétisées sont marquées de sorte à pouvoir identifier la nature de la dernière base incorporée en 3'. Leur séparation sur gel, avec une résolution d'une base, génère une échelle de bandes, où chaque bande correspond à un ensemble de molécules qui ont un nucléotide de plus ou de moins que les molécules d'une bande adjacente. La reconnaissance de la nature de la dernière base incorporée grâce au marquage, permet de proche en proche le séquençage du fragment. Cependant, cette technique ne permet pas de déterminer la séquence de bases d'un chromosome entier en une seule expérience. Le séquençage d'un long brin d'ADN nécessite de le couper en fragments "chevauchants", ayant couramment des tailles de l'ordre de cinq-cents à mille bases, puis de reconstituer la séquence initiale à l'aide de techniques informatiques.

2.2.2 Les banques d'ADNc

La masse d'informations fournie par les techniques de séquençage a notamment abouti à la mise en place de banques d'ADNc. Idéalement, la banque d'ADNc d'un génome contient l'ensemble des copies, ou clones, des ARNm issus de la transcription des différents gènes du génome.⁵ Le clonage à partir d'une molécule d'ARNm dépend d'une polymérase particulière : la transcriptase inverse. Cette enzyme peut utiliser comme matrice une molécule d'ARN simple-brin afin de synthétiser un brin d'ADN de séquence complémentaire, appelé ADNc. L'amplification de l'ADNc se fait ensuite, par exemple, par insertion dans un vecteur suivant les techniques présentées dans l'appendice A. Il est également possible d'amplifier directement par PCR les fragments d'ADNc (la technique associée s'appelle RT-PCR : Reverse Transcription-PCR). La constitution de telles banques a permis de répertorier les séquences de milliers de gènes de différents organismes et sert désormais de base à l'analyse des mécanismes d'expression et de régulation (cf paragraphe 2.3).

Aujourd'hui, le projet génome semble avoir atteint ces objectifs, non sans avoir soulevé un certain nombre de questions inattendues, concernant, par exemple, les droits de propriété des séquences découvertes. Les résultats ont notamment révélé que, chez l'homme, le génome est constitué

⁵La redondance des ARNm synthétisés par différentes cellules d'un même organisme nécessite de "croiser" les librairies issues de différentes sources. L'idéal serait que chaque ADNc soit spécifique d'un gène unique : on parle alors de gènes uniques. L'achèvement du séquençage de génomes entiers permet d'obtenir de nouveaux gènes uniques.

d'environ trente milles gènes, bien loin du chiffre maximum d'un milliard avancé avant le lancement du projet. La complexité biologique ne semble donc pas liée au nombre de gènes, puisque l'homme n'en possède, par exemple, que sept fois plus que la bactérie E-Coli. La différence résiderait davantage dans l'étendue des processus post-transcriptionnels, permettant la formation de cinq fois plus de produits protéiques primaires que chez les organismes moins complexes.

Par ailleurs, le regroupement des informations dans des bases de données a permis d'entrevoir la possibilité d'étudier de manière systématique et efficace les mécanismes d'expression et de régulation des gènes et d'entrer ainsi dans l'ère de l'analyse post-génomique.

2.3 L'ère de l'analyse post-génomique

2.3.1 Transcriptome et protéome

Les niveaux d'expression des gènes dans la cellule peuvent être adaptés en réponse à de nombreux signaux extra et intracellulaires. Généralement, les gènes ne sont pas employés individuellement mais par groupe. Schématiquement, lorsque le niveau d'expression d'un groupe de gènes diminue, le niveau d'expression d'un autre groupe peut augmenter. C'est par exemple le cas lorsqu'une cellule devient cancéreuse ou est exposée à une drogue.

La définition précise des processus qui interviennent dans une cellule placée dans un environnement particulier nécessite d'être capable de mesurer tout changement dans :

- le contenu en ARNm de la cellule, ou transcriptome, qui donne une indication des gènes transcrits et des protéines produites.
- le contenu en protéines de la cellule, ou protéome, qui ne peut-être directement déduit de la connaissance des ARNm. En effet, des modifications ultérieures à la synthèse protéique peuvent changer radicalement les fonctions protéiques⁶.

L'étude du protéome (ou protéomique) constitue en elle-même un véritable défi. En simplifiant, il s'agit de séparer des milliers de protéines pour déterminer l'identité et la proportion de chacune d'entre elles, en tenant compte de la nature et de l'environnement des cellules dont elles sont extraites. En ce qui concerne la séparation, différentes techniques sont actuellement disponibles : la plus répandue est sans doute l'électrophorèse bidimensionnelle en gel polyacrylamide 2D-PAGE,⁷ couplant une séparation fondée sur la charge suivie d'une séparation fondée sur la masse. L'identification se fait couramment en utilisant des méthodes de séquençage de peptides et de spectrométrie de masse [32]. La protéomique constitue un domaine en plein développement qui sort du cadre de ce travail.

L'analyse du transcriptome constitue un défi comparable par bien des aspects. Son but étant d'obtenir des informations sur l'expression des gènes à l'échelle d'un génome complet, elle nécessite la mise en place de technologies permettant d'obtenir simultanément les profils d'expression de milliers de gènes. Là encore, différentes techniques ont été développées, mais la plus simple et la plus massivement parallèle est certainement celle des puces à ADN.

⁶Le métabolome, ou contenu en métabolites de la cellule, reflète également la fonction des protéines intervenant dans le métabolisme. Son étude peut aussi fournir de précieux renseignements.

⁷2- Dimensional PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

2.3.2 Les puces à ADN et leurs applications

Principe des puces à ADN

Les puces à ADN ont été initialement développées par Shalon, Smith et Brown [33] en 1996 et reposent sur la spécificité de la réaction d'hybridation entre deux simples-brins d'ADN complémentaires. La puce en elle-même est constituée d'un support d'environ un centimètre carré sur lequel sont déposés entre dix milles et cent milles microdépôts d'ADN simple-brin, appelés sondes. Chaque dépôt ne contient qu'un type de fragments d'ADN de séquence connue, mais la séquence des fragments varie d'un dépôt à l'autre. Cette matrice de sondes va permettre d'analyser (de sonder) des acides nucléiques simples-brins de séquences inconnues, appelés cibles. Une fois les cibles jetées sur la puce, l'hybridation entre cibles et sondes ne s'effectue sur la surface qu'au niveau des microdépôts présentant une séquence complémentaire des cibles. Une détection locale de l'hybridation sur la puce permet alors de déterminer les séquences et les quantités relatives de cibles présentes dans l'échantillon à analyser.

Les figures 2.6 et 2.7 illustrent une méthode classique d'analyse par puce à ADN de la variation du profil d'expression des gènes entre un échantillon de cellules de contrôle et un échantillon de ces mêmes cellules ayant connu des conditions de croissance différentes (échantillon expérimental). Cela peut par exemple permettre de comparer les profils de cellules provenant d'un même tissu mais exposées ou non à des médicaments, ou à différents stades de développement ou de cancer.

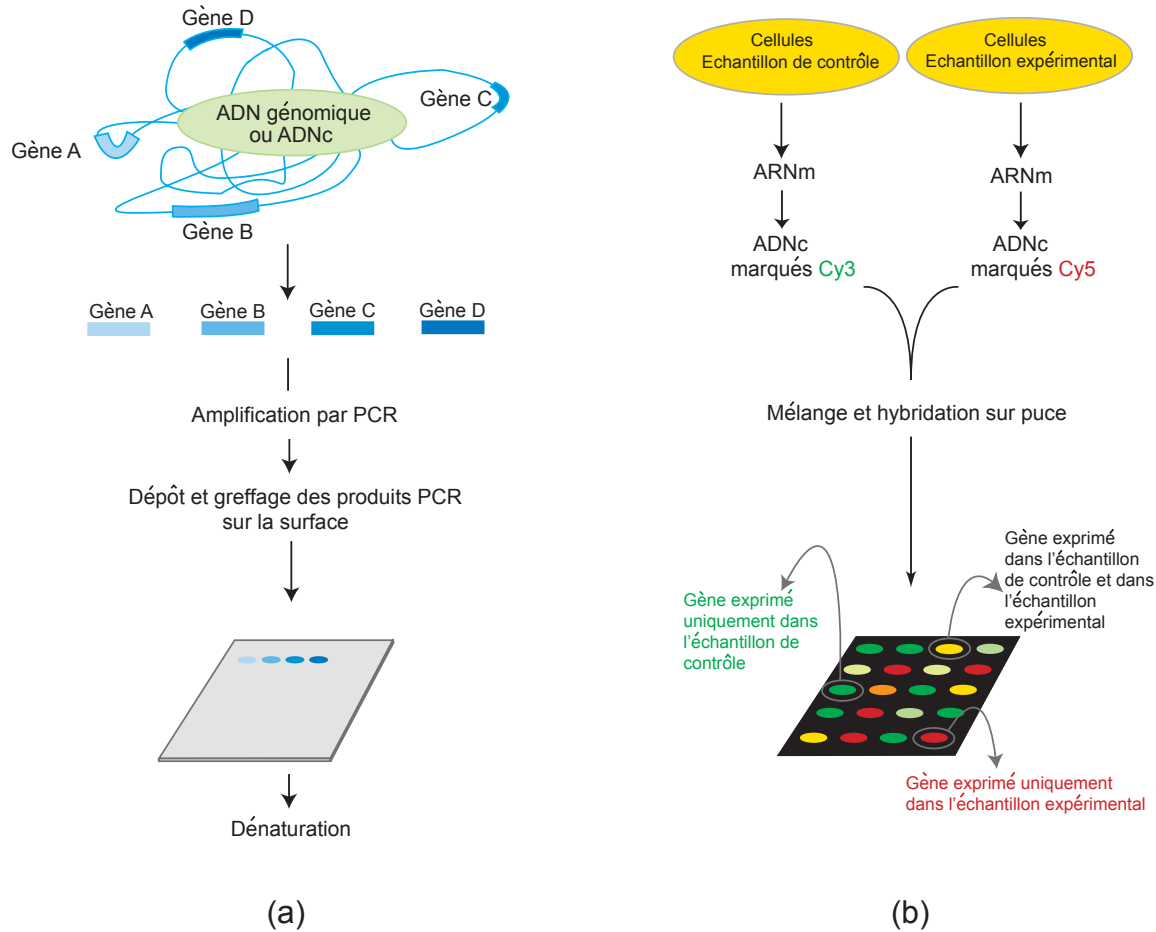


FIGURE 2.6: (a) Préparation d'une puce à ADNc. Les produits PCR issus de la banque d'ADNc du génome des cellules étudiées en (b) sont déposés et immobilisés sur la surface. Schématiquement, chaque microdépôt contient des brins d'ADNc associés à la transcription d'un gène particulier (A,B,C,D...). Dans le cas des puces à ADNc, une étape de dénaturation permet l'obtention de sondes simples-brins sur le support. L'existence de banques d'ADNc a rendu possible la préparation de micro-alignements constitués de séquences associées à plusieurs dizaines de milliers de gènes.

(b) Analyse par puce à ADNc de la variation du profil d'expression des gènes entre un échantillon de cellules de contrôle et un échantillon expérimental. Les ARNm issues des cellules de contrôle sont extraits puis convertis et amplifiés par RT-PCR en ADNc. L'utilisation d'amorces ou de nucléotides fluorescents lors de la PCR permet d'obtenir des ADNc marqués avec un fluorophore vert (Cy3). De manière analogue, les ARNm issus de l'échantillon expérimental sont isolés puis convertis en ADNc marqués avec un fluorophore rouge (Cy5). Les ADNc sont ensuite mélangés en proportions égales avant d'être hybridés sur la puce. L'image de fluorescence deux couleurs de la puce, réalisée par exemple avec un microscope confocal, révèle une série de spots colorés. L'intensité du signal de fluorescence vert ou rouge est supposée proportionnelle à la quantité d'ARNm initialement présente dans chacun des échantillons de cellules et un code de couleurs permet de traduire les rapports des intensités dans le rouge et dans le vert. Le rouge ou l'orange indique une sur-expression dans l'échantillon expérimental alors que le vert ou le vert pâle indique une sous-expression dans l'échantillon expérimental. Le jaune indique une expression équivalente du gène correspondant dans l'échantillon expérimental et l'échantillon de contrôle.

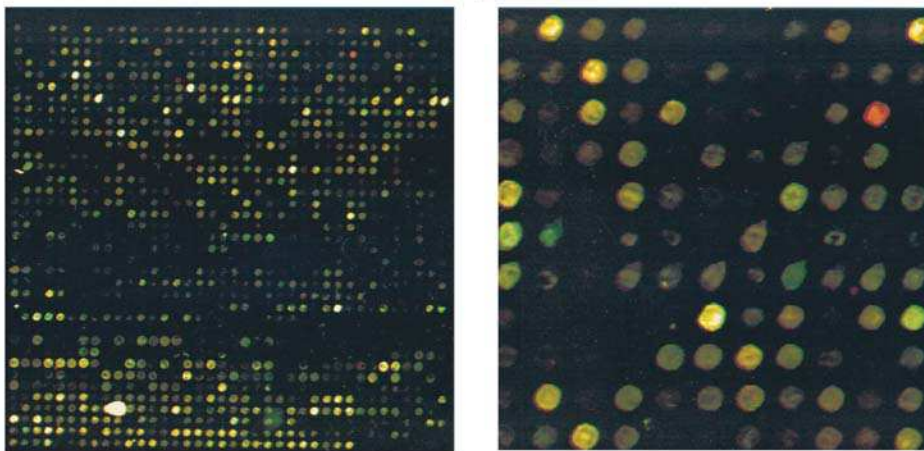


FIGURE 2.7: A gauche, image de fluorescence à deux couleurs d'une puce à ADN comportant environ 1500 dépôts de rayon caractéristique $100 \mu m$ (Image extraite de [34]). A droite, agrandissement d'une région comportant une centaine de dépôts.

La méthode décrite dans cet exemple n'est pas unique et différentes stratégies peuvent être utilisées, aussi bien en ce qui concerne les technologies de fabrication des puces (cf paragraphe 2.3.3) que les aspects biologiques (puces à ADNc, puces à oligonucléotides, hybridation par des ADN ou des ARN).

Bien que permettant d'étudier l'expression de milliers de gènes en une seule expérience, les puces à ADN n'ont pas définitivement remplacé les techniques d'analyse plus traditionnelles (Northern blotting [35, 36], affichage différentiel [37, 38]...). En effet, l'hybridation croisée entre des séquences extrêmement similaires s'avère un problème délicat à traiter. Par ailleurs, la sensibilité globale de la puce n'est pas très grande. On considère généralement qu'une variation d'un facteur deux entre l'échantillon de contrôle et l'échantillon expérimental indique un changement significatif dans l'expression d'un gène. Il s'avère alors que des modifications fines dans l'expression de certains gènes ne sont pas détectables par cette technique. Il résulte de ces difficultés que l'analyse par puce permet généralement d'établir des hypothèses qu'il convient de confirmer à l'aide de techniques classiques de biologie moléculaire.

Cependant, la possibilité d'étudier les profils d'expression à l'échelle d'un génome entier a permis des avancées spectaculaires dans certains domaines. Cette technique a par exemple été très utile pour caractériser les gènes exprimés lors de la prolifération de cellules cancéreuses et ainsi classifier les différents types de cellules. Ceci s'avère avoir une grande importance dans le traitement de la maladie puisqu'une fois la classe de cellules identifiée, il devient possible de connaître l'évolution clinique, ce qui n'était pas possible par d'autres moyens.

Les biocapteurs

Outre l'impact qu'elles ont eu dans le domaine des études en génétique, les puces à ADN ont entraîné le développement de tout un ensemble de nouvelles technologies en plein essor scientifique et économique à l'heure actuelle : les biocapteurs.

Leur principe est fondé sur une reconnaissance biologique spécifique entre un ligand et un analyte (corps-anticorps, reconnaissance spécifique entre deux protéines, ADN-ADN complémentaire...) à la surface d'un capteur. Le défi à relever est alors d'arriver à détecter la réaction de reconnaissance en la couplant à la variation d'un signal physique. Des méthodes optiques, chimiques ou mécaniques peuvent être utilisées et seront évoquées dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

Les études menées sur les biocapteurs sont à l'heure actuelle en plein développement. Dans le

domaine du diagnostic, les premiers tests de dépistage des virus HIV⁸ et HVC⁹ dans les dons du sang ont récemment été mis sur le marché par la société GEN-PROBE (test Procleix HIV-1/HVC). Sont également apparus les premiers tests de détection de mutations du virus HIV pour évaluer la résistance d'un patient à une thérapie, ou ceux concernant les détections des mutations liées aux cancers héréditaires du sein et des ovaires.

Compte tenu de la multitude des applications possibles, les biocapteurs constituent, sans aucun doute, un domaine plein d'avenir.

2.3.3 Technologies des puces à ADN

Comme l'illustre l'exemple présenté précédemment, les puces à ADN rassemblent de nombreux domaines de compétences : biologie, chimie et physico-chimie des surfaces, physique et même informatique. Ce paragraphe a pour but de donner un aperçu des différentes stratégies utilisées couramment dans la fabrication et l'analyse des données des puces à ADN.

Préparation des supports

Support de la puce et méthodes de greffage des sondes

Le choix du support est étroitement lié à la méthode de greffage des sondes utilisée ainsi qu'à la manière dont est "lue" la puce. Le développement des techniques Southern et Northern blotting [35, 36], antérieurement aux puces à ADN et nécessitant des membranes nylon [39], a entraîné l'apparition de supports polymères (polypropylène, polyacrylamides [40, 41]). Ces membranes, réutilisables une dizaine de fois, permettent l'hybridation avec des ADNc marqués radioactivement. Cependant, cette technique s'avère dorénavant supplantée par l'utilisation de lamelles de microscope en verre [42] offrant différents avantages : faible coût et substrat jetable, faible porosité, compatibilité avec la lecture par fluorescence et normalisation des tailles permettant l'utilisation de scanners commerciaux. Par ailleurs, la chimie du verre offre de nombreuses possibilités de greffage des sondes.

Parmi les méthodes d'immobilisation des sondes sur la surface, on distingue généralement deux approches différentes. La première stratégie, souvent appelée greffage ex-situ, consiste à synthétiser des oligonucléotides ou des ADNc, parfaitement définis et purifiés, et à effectuer un traitement chimique de la puce, ou "coating", afin de permettre une immobilisation des sondes présynthétisées sur la surface. Cette technique est certainement la plus utilisée et différentes fixations, covalentes ou non, ont été développées. Parallèlement, la société Affymetrix [43] a développé une technique originale de greffage, dite in-situ, qui consiste à synthétiser directement et base par base des oligonucléotides sur la puce.

Méthodes de greffage ex-situ

Une première méthode consiste à greffer les sondes en utilisant la polylysine comme intermédiaire de fixation. L'immobilisation s'effectue en recouvrant la surface de verre, négativement chargée, par une couche de polylysine positivement chargée qui permettra ensuite la fixation non covalente des brins d'ADN, négativement chargés. Cette méthode fut initialement développée par l'équipe de Pat Brown, à l'université de Stanford [44, 45, 46] et c'est celle que nous avons utilisée dans les expériences réalisées au cours de cette thèse.

⁸HIV : virus du sida

⁹HVC : virus de l'hépatite C

Le protocole précis utilisé ainsi que les caractéristiques de la couche de polylysine seront détaillés dans les chapitres suivants. Cette technique de fixation, bien qu'encore employée, est actuellement remplacée dans beaucoup d'applications sur puces, par des fixations covalentes plus robustes et permettant d'améliorer l'efficacité (meilleure accessibilité des brins sondes) et l'uniformité de l'hybridation.

Les fixations covalentes nécessitent d'incorporer¹⁰ aux sondes des groupements chimiques susceptibles de réagir avec les groupements portés par la surface de verre, ayant éventuellement subi un traitement chimique préalable. Là encore, différentes stratégies sont envisageables. L'une des plus répandues consiste à utiliser comme intermédiaire entre les sondes et la surface de verre une molécule possédant à une extrémité des groupements silanes (pouvant former un ou plusieurs ponts covalents Si-O-Si avec la surface) et à l'autre extrémité un groupement (thiol, hydroxyle, amine ou carboxyle) susceptible de réagir avec les sondes modifiées. De nombreuses variantes existent, liées essentiellement à la multitude des intermédiaires possibles. Certaines expériences menées au laboratoire par François Pouthas, ont utilisé une stratégie consistant à d'abord modifier les sondes avec des groupements silane afin qu'elles puissent réagir directement sur la surface. Le protocole et l'essentiel de ces résultats peuvent être trouvés dans [3]. Une autre fixation covalente fréquemment utilisée consiste à modifier les brins d'ADN à l'aide de groupements amide et d'effectuer un traitement de la surface à base d'aldéhydes qui forment spontanément des liaisons covalentes (réaction d'acylation) avec les extrémités des molécules d'ADN.

Méthodes de greffage in-situ

Les méthodes présentées précédemment offrent l'avantage de permettre d'immobiliser des brins d'ADN parfaitement contrôlés et pouvant porter des séquences très longues. La société Affymetrix [43] commercialise des puces utilisant des techniques de synthèse directe des oligonucléotides sur la surface [47, 48]. Les puces Affymetrix sont constituées d'oligonucléotides simples-brins d'environ vingt-cinq bases, synthétisés directement sur une surface de quartz. La technique inspirée des méthodes de fabrication des structures microélectroniques, utilise des groupements de protection photolabiles et des jeux de masques afin de diriger précisément et base par base, la croissance des oligonucléotides. Le principal avantage de cette technique est lié à la très grande densité de sondes obtenue (5×10^5 molécules précisément placées sur $1,28 \mu\text{m}^2$); par contre, la synthèse des caches revient très cher si bien que les puces coûtent plusieurs centaines d'euros l'unité.

Dépôt des sondes sur la surface

Contrairement au système développé par Affymetrix, les techniques ex-situ nécessitent l'utilisation d'outils permettant de déposer les microgouttelettes contenant les sondes en des endroits prédéfinis sur la surface. La méthode la plus répandue consiste à utiliser des robots équipés de têtes comportant entre 4 et 32 micropointes susceptibles de délivrer de faibles volumes (de 0,1 nL à 10 nL). Les pointes prélèvent les solutions d'ADN dans des puits, la tête se positionne ensuite au-dessus de la surface en des endroits préprogrammés avant d'effectuer les dépôts. Au rythme de quelques dépôts par seconde, il est possible de fabriquer des matrices de cinq à dix milles sondes en quelques heures, et ce de façon totalement automatisée. Différents types de micropointes existent. La plupart se chargent par capillarité et le dépôt se fait par contact mécanique entre la pointe et la surface. Cela permet d'ajuster la taille du dépôt en contrôlant le temps de contact entre la pointe et la

¹⁰Lors de la PCR pour les ADNc ou lors de la synthèse des oligonucléotides.

lamelle. Avec ces méthodes, les tailles caractéristiques des dépôts sont de 50 à 100 μm (20 μm pour les puces Affymetrix) avec un espacement inter-dépôt de 100 à 200 μm . Ce type d'appareil a initialement été développé par l'équipe de Pat Brown [44, 46] et est maintenant distribué commercialement par différentes sociétés¹¹. Il existe également des micropointes piezoélectriques permettant de projeter des microgouttelettes de volume contrôlé (~ 100 pL à 1 nL), en évitant tout contact avec la surface[49].

Au laboratoire, deux montages ont été développés, l'un utilisant des pointes mécaniques, l'autre des pointes piezoélectriques. Ces dispositifs seront présentés au chapitre 3.

Méthodes de détection et techniques d'analyse des données

Les méthodes de détection les plus utilisées sont essentiellement la fluorescence et à un moindre degré la radioactivité.

Dans les deux cas, il est nécessaire de marquer les cibles préalablement à l'hybridation sur la puce. L'étape de marquage s'effectue soit durant la RT-PCR pour les ADNc, soit durant la synthèse des oligonucléotides. Les marqueurs radioactifs¹² ou fluorescents¹³ sont disponibles commercialement directement liés aux nucléotides utilisés lors de la PCR.

La détection des produits radioactifs se fait généralement via l'utilisation de systèmes d'imagerie de type écran accumulateur au phosphore (ou phosphoimaging). Cette technique de détection revient globalement moins cher que la fluorescence, mais la faible résolution de lecture (environ 300 μm , ce qui limite aux puces à faible densité), ainsi que les contraintes associées à la manipulation répétée de puces radioactives, expliquent la prédominance de la lecture par fluorescence.

L'acquisition d'une image de fluorescence s'effectue généralement à l'aide d'un système constitué d'une ou deux sources laser, d'un microscope confocal et d'un détecteur sensible à la fluorescence (caméra CCD ou photomultiplicateur). Un montage de ce type a été développé au laboratoire et sera décrit au chapitre 3. Des scanners complètement intégrés qui permettent l'acquisition d'une image de puce en quelques minutes sont également disponibles commercialement. Malheureusement, les appareils existants, testés sur les mêmes échantillons, donnent des résultats différents (cf [50, Table 4]), ce qui rend difficile la comparaison entre lectures effectuées sur des scanners provenant de fournisseurs divers. L'existence de références internes de comparaison permet de remédier partiellement à ce problème.

Une fois l'image de fluorescence enregistrée, différentes étapes d'analyse sont nécessaires pour extraire de l'image les informations biologiques concernant les variations des taux d'expression. La plupart de ces processus sont automatisés grâce à des logiciels d'analyse d'images fournis avec les scanners disponibles dans le commerce. La première étape consiste à définir le contour moyen de chaque tache, déterminé par rapport à un seuil de bruit de fond. Cette partie du traitement n'est en fait que semi-automatisée puisque l'intervention humaine reste nécessaire pour repérer visuellement les données aberrantes ou les taches de fluorescence parasites associées à des impuretés.

Il faut ensuite calculer l'intensité associée à chaque "spot". Compte tenu de l'inhomogénéité des

¹¹Par exemple BioRobotics, Gesim ou GenePix

¹²Par exemple ³²P, ³H ou ³⁵S

¹³Les plus couramment utilisés sont Cy3 et Cy5

dépôts de sondes¹⁴, la méthode la plus couramment employée consiste à utiliser l'histogramme de l'intensité des pixels le long d'une ligne tracée à travers chaque tache. On obtient généralement une distribution possédant deux pics ; l'un correspondant au bruit environnant le microdépôt et l'autre au signal d'hybridation. Cette méthode permet une mesure de l'intensité de fluorescence ainsi qu'une estimation de la qualité d'un dépôt via la variance de la distribution obtenue. La plupart des logiciels intègrent également des procédures permettant de tenter de s'affranchir des erreurs éventuelles liées aux variations des quantités d'ADNc déposées ou des taux d'incorporation des fluorophores lors des réactions de marquage.

Une fois le traitement de l'image effectué, la méthode d'analyse des données dépend de la façon dont est menée l'expérience. Dans le cas d'une hybridation compétitive entre un échantillon de contrôle et un échantillon expérimental¹⁵, on évalue le rapport des intensités de fluorescence dans le rouge et dans le vert pour déterminer les variations des profils d'expression. Des problèmes liés par exemple aux différences globales d'intensité de fluorescence, de puissance laser ou de sensibilité lors de la détection sont généralement corrigés par les logiciels, ce qui peut rendre difficile la comparaison entre données obtenues en utilisant des procédures différentes.

De manière générale, il n'y a pas d'unification des méthodes d'analyse des expériences sur puce et chaque fournisseur propose des procédures de correction qui lui sont propres. Par ailleurs, l'énorme quantité de données générée pose le problème du stockage de ces informations sous un format accessible par tous. Tous ces aspects constituent aujourd'hui de véritables sujets d'étude en bioinformatique.

2.4 Détection électronique sur structures semi-conductrices

2.4.1 EOSFET et nanostructures semi-conductrices

Les transistors à effet de champ ou FET (Field Effect Transistor), sont apparus dans les années cinquante [51, 52], et ont donné naissance à une grande classe de composants, parmi lesquels les diodes MOS (Metal-Oxide-Semiconductor) et les MOSFET (Metal-Oxide-Semiconductor Field Effect Transistor), qui sont aujourd'hui parmi les plus importants de l'électronique moderne. Ces structures permettent notamment de créer et de contrôler dans un barreau de semi-conducteur, un courant de porteurs (électrons ou trous) circulant au voisinage immédiat d'une fine couche d'isolant (souvent de l'oxyde de silicium) de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur. C'est dans les années soixante-dix que P.Bergveld proposa pour la première fois d'adapter la technologie MOS afin de détecter des variations de concentrations d'ions en solution. En effet, la mise en contact de la couche d'isolant avec un électrolyte permet d'obtenir une structure de type Electrolyte/Oxyde/Semi-conducteur (EOS), qui sera plus précisément décrite au chapitre 3. Bergveld démontra alors que le champ électrique induit par la présence de molécules chargées au voisinage immédiat de l'interface électrolyte/oxyde était susceptible d'influencer significativement le courant circulant sous la couche isolante. En mesurant des variations

¹⁴L'inhomogénéité est essentiellement due à la diffusion des sondes vers les bords de la goutte lors du séchage.

¹⁵Le système fourni par Affymetrix ne repose pas sur ce principe. Dans cette analyse, à côté de chaque dépôt associé à un gène est déposée une séquence test portant un mésappariement. Dans des conditions très contrôlées, la séquence test ne doit pas s'hybrider. Le taux d'expression d'un gène est alors calculé en évaluant la moyenne des différences de signal entre le dépôt associé au gène et le dépôt test.

d'intensité, il montra notamment la sensibilité de ces structures au pH et à la concentration en sel de l'électrolyte de mesure, ainsi que la possibilité de détecter l'activité électrophysiologique d'un muscle déposé sur la surface d'oxyde [53] .

Depuis, de nombreuses équipes se sont intéressées aux applications potentielles de ces méthodes de détection, dont on peut trouver un état des lieux dans [1].

Différentes stratégies ont été envisagées, aussi bien en ce qui concerne la géométrie de la partie semi-conductrice, la nature de l'interface électrolyte/isolant (nature de l'oxyde [54], utilisation de membranes sélectives [55], modification avec des enzymes [56]), les méthodes d'analyse (mesure de variations de courant [53] ou de tension [57, 58, 54], en continu ou en alternatif, spectroscopie d'impédance [55, 56]) ou encore la nature des systèmes étudiés (sensibilité au pH ou à un analyte [55, 58, 54], caractérisation d'interactions spécifiques, par exemple antigène/anticorps [57, 56], ou de l'activité électrique de cellules neuronales [59]). Ces structures sont souvent regroupées sous l'appellation générique d'EOSFET (Electrolyte-Oxide-Semiconductor Field Effect Transistor), bien que la terminologie ne soit pas unifiée¹⁶.

D'autre part, les évolutions récentes dans le domaine des semi-conducteurs ont permis le développement de nano-structures semi-conductrices comme par exemple les nanofils dopés [60, 9] ou les nanotubes de carbone semi-conducteurs [61], ayant un diamètre caractéristique de quelques nanomètres et une longueur de l'ordre du micromètre. Ces nouveaux capteurs ouvrent la voie à une miniaturisation plus grande des technologies de détection électronique. Ainsi, Cui et collaborateurs [60] ont démontré en 2001, la possibilité de caractériser des espèces chimiques en solution (pH, ions Ca^{2+}) et de détecter in-situ l'interaction biotine/streptavidine par une mesure en temps réel du changement de la conductance d'un nanofil de silicium dopé. Cette même interaction a également été mise en évidence en utilisant des nanotubes fonctionnalisés [61].

2.4.2 Application à la détection de l'hybridation de l'ADN

L'existence de modèles théoriques prédisant une variation de la charge moyenne par base entre une molécule d'ADN simple-brin et une molécule d'ADN double-brin [62], la compatibilité de l'oxyde de silicium avec les chimies de greffage classiquement utilisées dans les puces à ADN, ainsi que les possibilités déjà prouvées d'intégration de plusieurs milliers de transistors de type EOSFET sur une micropuce¹⁷, ont rendu extrêmement attractif le développement de méthodes de détection de l'hybridation sur structures de type EOSFET. Une telle technologie permettrait une caractérisation sans marquage, en temps réel de l'hybridation sur puces et une acquisition très rapide des données. Ces perspectives ont déjà conduit différentes équipes à lancer des projets allant dans ce sens.

En 1997, Souteyrand et collaborateurs [2] ont utilisé une structure de type MOS en silicium pour mettre en évidence une hybridation spécifique entre oligonucléotides de dix-huit bases. La variation de la charge induite lors de l'hybridation sur la surface du capteur entraîne un réarrangement des porteurs dans le semi-conducteur ; la mesure s'effectue en caractérisant la variation d'impédance de la structure en mode AC. Ils ont également obtenu des résultats similaires sur

¹⁶Bergveld utilisa initialement la terminologie ISFET pour Ion Sensitive FET ; on trouve également EISFET pour Electrolyte-Insulator-Semiconductor FET.

¹⁷La compagnie INFINEON a récemment fabriqué une puce comportant environ 15000 transistors de type EOSFET [63].

un capteur unique de type FET par une mesure directe de la variation de tension aux bornes de la structure, le courant source-drain étant maintenu constant. En 2001, l'équipe de Manalis [6, 7] a utilisé des structures semiconductrices placées à l'extrémité de microleviers pour caractériser l'adsorption de biomolécules chargées, puis a décrit en 2002 [7] une détection électronique différentielle (utilisant deux capteurs) et en temps réel de l'hybridation entre oligonucléotides de douze bases avec une fixation polylysine. Enfin, en 2004, Uslu et collaborateurs [8] ont rapporté la détection en mode différentiel d'une hybridation sur un réseau de seize EOSFETs, en utilisant une fixation de type covalente.

L'analyse comparative de ces résultats, ainsi que les ordres de grandeur des sensibilités obtenues seront détaillés au chapitre 7.

Les premiers résultats concernant la détection de l'hybridation de l'ADN au moyen de nanofils semi-conducteurs ont également été récemment publiés. En 2004, Hahm et collaborateurs [9] ont montré la faisabilité d'une caractérisation très sensible de l'hybridation de l'ADN sur des nanofils semi-conducteurs. La fonctionnalisation de ces nanostructures avec des acides nucléiques peptidiques (PNA)¹⁸, leur permet de détecter en temps réel l'hybridation entre des séquences d'ADN de 30 bases. Ces méthodes fondées sur l'utilisation de nanostructures semblent extrêmement sensibles, la détection de molécules uniques ne semblant pas impossible. Cependant, les tests actuels sont réalisés sur des structures uniques et la faisabilité d'un réseau dense et ordonné de nanofils ou de nanotubes ayant des propriétés électroniques similaires, reste encore à démontrer.

¹⁸Les PNA (Peptide Nucleic Acid) sont des analogues structuraux des oligonucléotides qui sont constitués d'un squelette polyamide non chargé sur lequel sont greffées des bases. Les PNA sont susceptibles de s'hybrider avec des séquences d'ADN et d'ARN avec une plus grande affinité et stabilité que les complexes ADN/ADN ou ADN/ARN.

Chapitre 3

Détection électronique sur réseaux de transistors à effet de champ : dispositifs et protocoles expérimentaux

En un premier temps, le projet développé au laboratoire a permis de mettre en évidence les effets induits par le dépôt de deux biomolécules chargées, la polylysine et l'ADN, sur un réseau d'EOSFETs. Cette étude a rendu possible la caractérisation systématique des variations des caractéristiques courant-tension des transistors lors de l'apport de molécules soit positivement, soit négativement chargées. Elle a par ailleurs constitué la première étape de la détection d'une hybridation de l'ADN avec une fixation des sondes de type polylysine. Un point important est l'utilisation d'un réseau de capteurs permettant une mesure différentielle entre une région d'intérêt sur laquelle, par exemple, ont été déposées des sondes complémentaires aux cibles et une région de contrôle où sondes et cibles sont non complémentaires. La mesure étant effectuée dans le même électrolyte, l'influence des variations de température, de pH ou encore de concentration en sel sur la différence de signal enregistrée entre les deux zones est alors limitée.

La réalisation de ce projet a nécessité de développer un ensemble de dispositifs expérimentaux reprenant les grandes étapes des protocoles de puces à ADN décrits précédemment. Ce chapitre a pour but de présenter la structure des réseaux d'EOSFETs qui ont été utilisés, le principe de la détection électronique ainsi que les montages expérimentaux permettant la mesure des caractéristiques courant-tension, la microdéposition des sondes sur la surface des transistors et l'enregistrement d'images de fluorescence. Leur utilisation pratique et les méthodes d'analyse des données seront illustrées dans le dernier paragraphe.

3.1 Principe de la détection électronique

La structure d'un EOSFET est très similaire à celle d'un MOSFET. Ce fonctionnement sera brièvement illustré en prenant l'exemple d'un EOSFET à canal p, dont sont dérivés les capteurs qui ont été utilisés au cours de ce travail. Le principe de la détection différentielle de charges et la structure des réseaux utilisés seront décrits dans les deux dernières sections de ce paragraphe.

3.1.1 MOSFETs et EOSFETs

Sur la figure 3.1, sont présentés les schémas d'un MOSFET et d'un EOSFET à canal p.

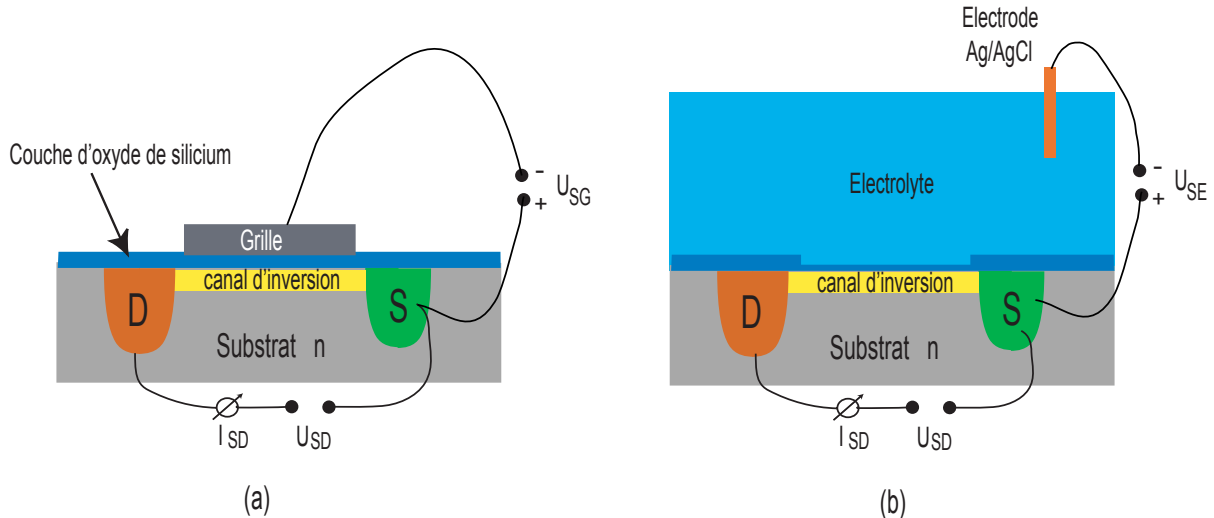


FIGURE 3.1: (a) Représentation schématique d'une structure MOS. La couche d'oxyde de silicium est recouverte d'une grille au niveau du substrat. (b) Dans une structure EOS, la couche d'oxyde est amincie au niveau du substrat et un électrolyte remplace la grille.

Ces deux structures sont constituées d'un substrat semi-conducteur faiblement dopé n, dans lequel ont été implantées deux régions de type p fortement dopées, généralement distantes de quelques microns à quelques dizaines de microns. Ces deux zones sont appelées la source (S) et le drain (D) du MOSFET ou de l'EOSFET. Dans les deux cas, le substrat est recouvert d'une fine couche isolante d'oxyde de silicium de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur. La structure MOS possède un contact métallique appelé grille (G), qui couvre la couche isolante. Dans un transistor EOS, le rôle de la grille métallique est joué par un électrolyte, directement en contact avec la couche d'oxyde amincie entre source et drain. Un tel capteur peut alors être défini comme étant de type EOS (Electrolyte/Oxide/Semiconductor) par analogie avec la configuration MOS (Metal/Oxide/Semiconductor). L'utilisation d'une électrode de référence trempant dans l'électrolyte permet l'imposition d'une tension U_{SE} entre la source¹ et l'électrode, analogue à la tension U_{SG} contrôlant la différence de potentiel source-grille dans le cas d'un MOS.

L'application d'une tension U_{SE} positive entre la source et l'électrode entraîne la formation d'une zone de déplétion sous la surface d'oxyde de silicium. En effet, le substrat étant de type n, il y aura appauvrissement en porteurs majoritaires (électrons) et enrichissement en trous (porteurs minoritaires). Lorsque la tension atteint une valeur seuil $U_{SE} = U_{SE}^{(T)}$, un canal d'inversion de porteurs minoritaires se crée. En polarisant la source par rapport au drain (application d'une tension U_{SD}), il apparaît un courant I_{SD} dans le canal bidimensionnel de trous. Dans le cas d'un transistor MOS, la conductivité de ce canal peut être contrôlée par le potentiel de la grille. Pour une structure EOS, la conductivité du canal d'inversion dépend du potentiel de l'interface électrolyte/oxyde de silicium. Ce dernier étant dépendant de la présence de molécules chargées

¹La source et le substrat sont généralement connectés.

sur la surface, le dépôt de biomolécules à l'interface du capteur peut être détecté via, par exemple, la variation du courant I_{SD} due à l'apport de charges. Une description très simple de ce principe est donnée ci-dessous.

3.1.2 Détection différentielle de charges à la surface de transistors à effet de champ

Le schéma de la figure 3.2 représente trois capteurs A, B, C. Le transistor B constitue l'état initial ou de référence ; sur la surface de A ont été déposées des molécules chargées négativement, tandis qu'un apport de charges positives a été effectué sur C. L'influence des différentes charges peut à priori être donnée qualitativement :

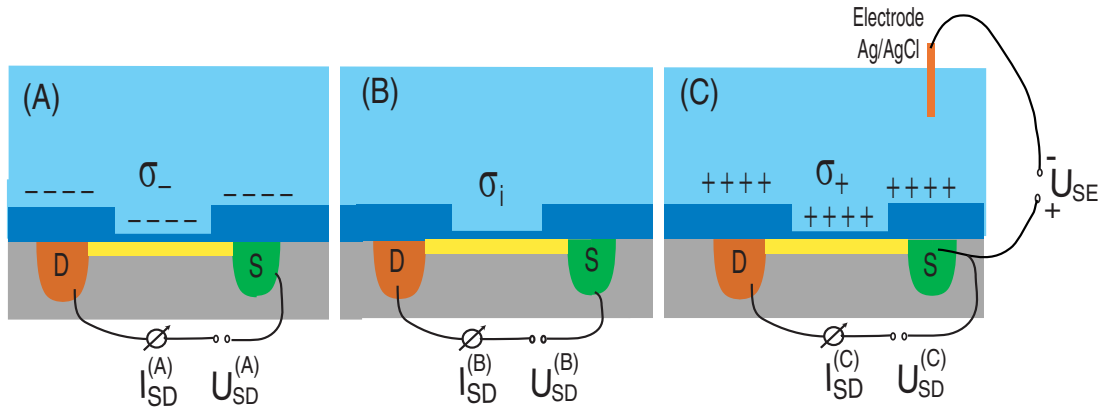


FIGURE 3.2: Schéma de principe de la mesure différentielle d'une variation de charges sur des transistors à effet de champ. (A) apport de charges négatives, (B) capteur de référence, (C) apport de charges positives.

- L'apport de charges positives sur le capteur C va tendre à réduire la densité de porteurs dans le canal d'inversion, conduisant à une diminution de la conductivité de ce dernier, ce qui entraînera une diminution du courant par rapport à l'état de référence ($\Delta I_{SD} = I_{SD}^{(C)} - I_{SD}^{(B)} < 0$). Une autre analyse possible consiste à conserver le courant I_{SD} et la tension U_{SD} constants et à mesurer les variations de la tension U_{SE} induites par l'apport de charges. Le maintien d'un courant constant nécessite de compenser l'effet induit par le dépôt de molécules chargées sur la surface. Cela peut être réalisé en augmentant le potentiel du substrat par rapport à l'électrode. Dans cette analyse, on obtient donc : $\Delta U_{SE} > 0$ pour $I_{SD} = \text{cste}$ et $U_{SD} = \text{cste}$.
- De manière analogue, lorsque l'on apporte des charges négatives à l'interface, celles-ci vont avoir pour effet d'augmenter la conductivité du canal, entraînant une augmentation du courant soit : $\Delta I_{SD} = I_{SD}^{(A)} - I_{SD}^{(B)} > 0$. De même, si l'on veut conserver le courant constant, il faudra diminuer la tension de polarisation entre la source et l'électrode, soit : $\Delta U_{SE} < 0$.

Lors des expériences effectuées, les apports de charges sont réalisés via le dépôt de microgouttelettes de quelques dizaines de micromètres de diamètre, contenant les molécules d'intérêt

(ADN ou polylysine) diluées dans des solvants aqueux de concentrations en sel variables. Chaque dépôt couvre au minimum cinq transistors. Dans ces conditions, le contrôle précis des quantités de charges présentes sur la surface active d'un transistor de quelques dizaines de micromètres carré est évidemment impossible. Cet aspect sera illustré dans les chapitres suivants.

3.2 Structures des réseaux de transistors

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de P.Fromherz du Max-Planck-Institut für Biochemie de Martinsried en Allemagne, nous avons pu disposer de puces possédant différents types de réseaux EOSFETs. Ces structures n'ont pas été développées spécifiquement pour les expériences que nous avons réalisées, mais afin d'étudier l'activité électrique de neurones greffés sur la surface des réseaux de transistors [64, 65]. Par exemple, B.Straub [66, 67] s'est intéressé au transport actif d'ions dans les canaux ioniques d'une cellule unique greffée sur la surface d'un transistor à effet de champ. Ce phénomène entraîne l'apparition d'une différence de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule et conduit à un potentiel extracellulaire susceptible d'influencer le courant source-drain du transistor. Par ailleurs, G.Zeck [68, 59] a étudié la possibilité de stimuler un réseau de neurones et de détecter le signal induit. Cette expérience a été réalisée en connectant le premier neurone à un stimulateur implanté sur la puce. L'impulsion électrique entraîne l'apparition d'un potentiel d'action qui se propage et peut ensuite être suivi grâce aux transistors se trouvant sous le réseau neuronal.

3.2.1 Les puces électroniques

Les réseaux que nous avons utilisés sont implantés dans des plaquettes de silicium de douze millimètres sur douze millimètres, collées sur un socle en céramique possédant des connecteurs en or (cf figure 3.3). Les transistors sont du type EOSFET à canal d'inversion p, analogues à ceux décrits au paragraphe 3.1.1. L'épaisseur de la couche d'oxyde de silicium, qui est amincie entre source et drain, est identique pour tous les réseaux et vaut $d_{ox} = 10 \text{ nm}$. Le montage est à source commune² et les connexions entre les dépôts métalliques sur le substrat et les connecteurs en or du socle sont réalisés en aluminium. Par ailleurs, un bassin en plexiglass est collé sur le support en céramique et permet d'isoler la surface supérieure de la puce de la partie inférieure où sont implantées les connexions avec le support céramique. Ce bassin permet d'effectuer des mesures en utilisant un seul électrolyte couvrant l'ensemble des zones actives des transistors implantés sur une puce.

Nous avons pu disposer de trois types différents de puces, sur lesquelles sont implantées respectivement une unique "ligne" de quatre-vingt seize transistors, deux lignes de trente et un transistors et deux lignes de vingt-neuf transistors³. Les caractéristiques géométriques précises des différents réseaux seront présentées au paragraphe 3.2.2.

Les puces ne sont pas à usage unique mais sont réutilisables. En effet, il est possible de nettoyer l'ensemble des molécules organiques déposées lors d'une expérience en suivant le protocole

²Toutes les sources des transistors implantés sur une puce sont reliées entre elles et sont donc au même potentiel.

³Chaque ligne constitue un réseau. Par la suite, les différents réseaux seront désignés par respectivement : réseau de 96, réseau de 31 et réseau de 29 transistors. Les puces correspondantes seront appelées puce de 96, puce de 62 et puce de 58 transistors.

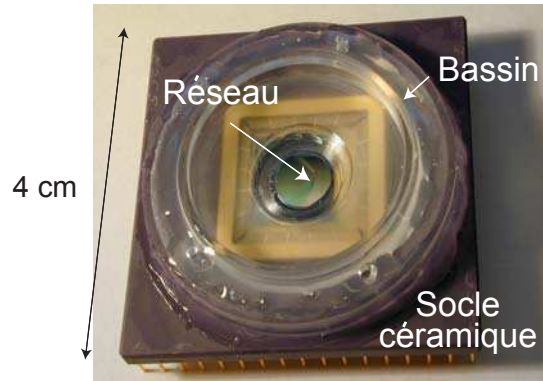


FIGURE 3.3: Photographie d'une puce sur laquelle est implanté un réseau de quatre-vingt seize transistors. La puce est collée sur un socle céramique et un bassin plexiglass permet le dépôt d'un électrolyte de mesure.

suisant :

- Deux nettoyages successifs de deux minutes à l'acide sulfochromique.
- Rinçage à l'eau déionisée.
- Incubation de la surface dans une solution de soude diluée dans un solvant éthanol/eau.
- Rinçage à l'eau déionisée.
- Séchage des structures sous un jet d'air comprimé.

Cette procédure permet de réutiliser les puces entre vingt et trente fois. Les limitations sont essentiellement dues à la dissolution de la colle epoxy permettant l'adhésion du bassin sur la surface et à la perte de stabilité des caractéristiques des transistors, certainement liée à la diminution de l'épaisseur de la couche d'oxyde lors du nettoyage.

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse ont été obtenus en utilisant ces structures. La limitation majeure a été l'impossibilité de tester de manière systématique l'influence de certains paramètres importants de la détection, comme par exemple l'épaisseur de la couche d'oxyde ou la taille des surfaces actives des transistors. La nécessité de disposer de structures supplémentaires et mieux adaptées aux études que nous menons, a conduit l'équipe à s'investir dans la fabrication de nouveaux réseaux de transistors au Max-Planck-Institut.

3.2.2 Les différents réseaux

Réseaux de 96 transistors

La figure 3.4 représente la géométrie d'une puce portant une ligne de 96 transistors. Au sein du réseau, les transistors sont linéairement espacés de $21 \mu\text{m}$ et couvrent une longueur totale de 2 mm. La zone active de chacun des capteurs est de trente-six micromètres carré (cf figures 3.4 et 3.5).

Réseaux de 31 transistors

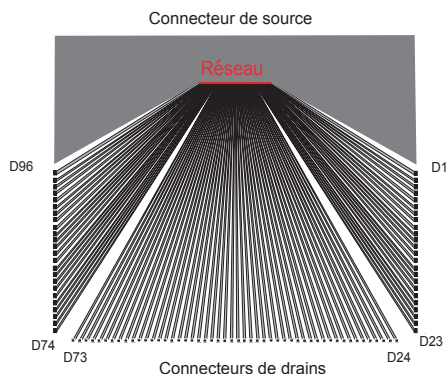


FIGURE 3.4: Réseau linéaire de 96 transistors (ligne rouge). En gris clair, les connecteurs de drains numérotés de D1 à D96 et en gris foncé la source commune.

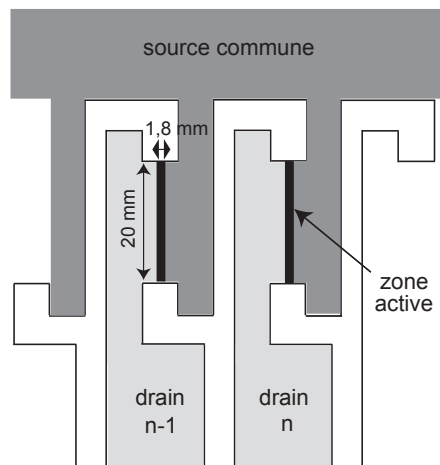


FIGURE 3.5: Détail de la structure de deux transistors du réseau de 96 transistors. Les zones en blanc correspondent aux régions isolantes. La surface des zones actives est de $36 \mu\text{m}^2$.

Sur chacune des puces de 62 transistors, sont implantés deux réseaux linéaires identiques de 31 transistors ; l'espace entre les deux lignes étant de $500 \mu\text{m}$ (cf figure 3.6). Au sein d'un réseau, deux types de transistors possédant des surfaces actives de dimensions différentes existent (cf figure 3.7) :

- le premier type de capteur possède une zone active de longueur $L = 4 \mu\text{m}$ et de largeur $l = 10 \mu\text{m}$. Il y a 24 transistors de ce type dans un réseau de 31 transistors.
- le second type de transistor possède une zone active de $3 \mu\text{m}$ de longueur sur $8 \mu\text{m}$ de largeur. Ces capteurs sont au nombre de 7 par ligne de transistors, et sont répartis tous les quatre transistors le long du réseau.

Réseaux de 29 transistors

Les 21 transistors centraux des réseaux de 29 capteurs ont une structure tout à fait similaire à celle des lignes de 31 transistors. La différence majeure réside dans l'existence à chaque extrémité du réseau, de quatre transistors ayant été optimisés afin de réaliser les études d'activité neuronale dans le laboratoire de P. Fromherz. Il s'est avéré que ces capteurs latéraux présentent des propriétés variables d'une structure à l'autre et des caractéristiques souvent différentes de celles des transistors centraux. Cette constatation nous a parfois amené à ne prendre en considération que les 21 capteurs centraux des réseaux de 29 transistors.

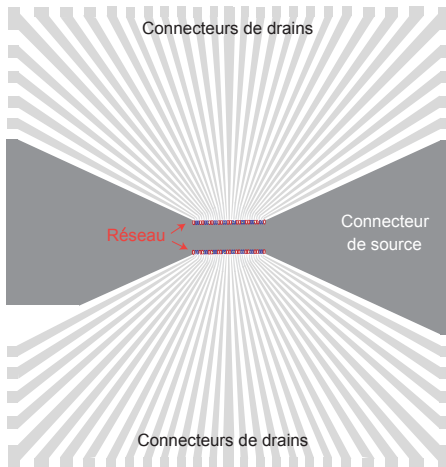


FIGURE 3.6: En rouge, deux réseaux linéaires de 31 transistors. Chaque ligne a une longueur de 1,5 mm et l'espace entre les deux lignes est de $500 \mu\text{m}$. Les connecteurs de drains sont représentés en gris clair et le connecteur de source en gris foncé.

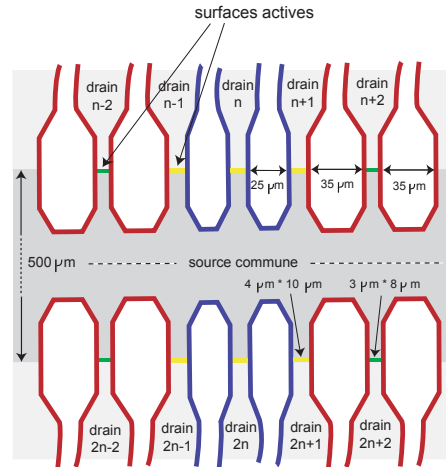


FIGURE 3.7: Détail de la géométrie d'un réseau de 31 transistors. On peut y voir les deux types de transistors : (1) $L = 4 \mu\text{m}$ et $l = 10 \mu\text{m}$; (2) $L = 3 \mu\text{m}$ et $l = 8 \mu\text{m}$.

3.3 Caractéristiques courant-tension des transistors

3.3.1 Acquisition des caractéristiques courant-tension

L'acquisition des caractéristiques courant-tension de l'ensemble des transistors d'un réseau nécessite de pouvoir :

- imposer individuellement à chaque transistor des tensions source-drain (U_{SD}) et source-électrode (U_{SE}) réglables, et de mesurer le courant source-drain (I_{SD}) résultant; le balayage de différentes valeurs de U_{SD} et U_{SE} permet l'obtention des caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SD}, U_{SE})$ associées à un transistor et à une gamme de tensions de polarisation.
- commuter d'un transistor du réseau au suivant afin de mesurer successivement les caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SD}, U_{SE})$ de tous les FETs d'un réseau.

Ces acquisitions ont été automatisées grâce à l'utilisation d'un ordinateur permettant de contrôler simultanément une carte analogique-digitale qui impose les différentes tensions et mesure le courant résultant et d'une autre carte digitale associée à un multiplexeur qui effectue les opérations de commutation. L'ensemble est piloté par un programme écrit en langage C sous l'environnement LabWindows CVI.

Le schéma de l'organisation du dispositif de mesure est présenté sur la figure 3.8.

La carte analogique-digitale PCI 6052E permet d'imposer les tensions U_{SD} et U_{SE} à l'entrée d'un premier étage constitué d'une carte électronique conçue par D.Darson du service électronique du LPA. Cette carte filtre individuellement les deux tensions continues afin de diminuer le bruit

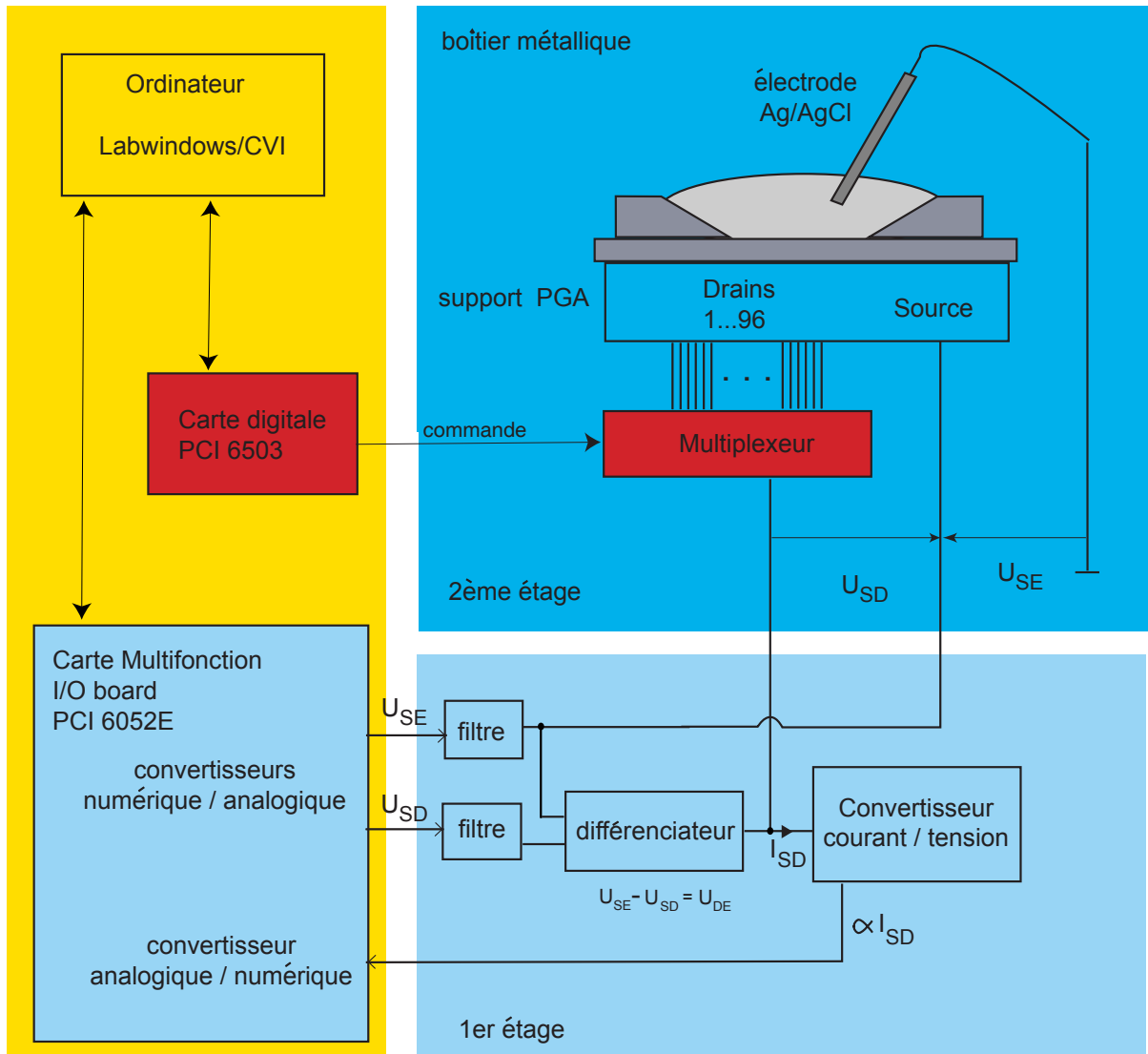


FIGURE 3.8: Organisation du dispositif de mesure de l'ensemble des caractéristiques courant-tension d'un réseau de transistors.

induit par l'environnement du PC, puis un différentiateur permet de passer du couple de valeurs (U_{SD}, U_{SE}) au couple (U_{SE}, U_{DE}) référencé par rapport à l'électrode d'argent reliée à la masse. La tension U_{SE} est alors imposée à la source commune à tous les transistors d'un réseau, tandis que la tension U_{DE} constitue la tension d'entrée du multiplexeur qui adressera cette différence de potentiel au drain du transistor dont on veut mesurer la caractéristique. Le courant I_{SD} résultant est récupéré à l'entrée d'un convertisseur courant-tension dont la sortie est directement lue par une voie de la carte PCI 6052E.

Le deuxième étage est constitué d'un support PGA permettant d'enficher et de connecter les réseaux de transistors à un ensemble de commutateurs susceptibles d'adresser la tension U_{DE} issue du premier étage. Le deuxième étage et le réseau de transistors sont entièrement placés dans un boîtier de protection assurant une isolation électrique et lumineuse.

L'acquisition des caractéristiques d'un réseau est alors effectuée en suivant la procédure suivante :

- Les incréments et les intervalles des variations de U_{SD} et U_{SE} sont entrés dans le programme. Les valeurs retenues ont généralement été : des variations par pas de 0.1 V dans l'intervalle [0 V ; 2 V] pour les réseaux de quatre-vingt-seize transistors et le même incrément dans l'intervalle [0 V ; 3 V] pour les réseaux de 31 et 29 transistors.
- Le programme est ensuite lancé et le multiplexeur commande l'adressage du premier transistor. A chaque point de polarisation, soit pour chaque couple de valeurs (U_{SD}, U_{SE}) , le courant I_{SD} est moyenné sur mille points de mesures (soit environ 3 ms au total). L'enregistrement de la caractéristique complète associée à un transistor prend, du fait de l'existence de délais à chaque commutation, environ une quinzaine de secondes.
- Une fois la caractéristique $I_{SD} = f(U_{SD}, U_{SE})$ du premier transistor acquise, la carte PCI 6503 commande le basculement du multiplexeur vers le second transistor et ainsi de suite. L'ordre de grandeur de la durée de mesure de l'ensemble des caractéristiques des transistors d'un réseau est d'une quinzaine de minutes⁴. Cependant, la diminution des intervalles de variation de U_{SD} et U_{SE} peut permettre de réduire cette durée à une trentaine de secondes, rendant possible un suivi plus continu d'une expérience.

3.3.2 Allure des caractéristiques courant-tension

Les données $I_{SD} = f(U_{SD}, U_{SE})$ obtenues pour un transistor à l'issue d'une acquisition, sont plus facilement représentables en considérant individuellement les caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SD})_{U_{SE}=cste}$ et $I_{SD} = f(U_{SE})_{U_{SD}=cste}$. La figure 3.9 montre l'allure de ces courbes pour un transistor faisant parti d'un réseau de 31 FETs.

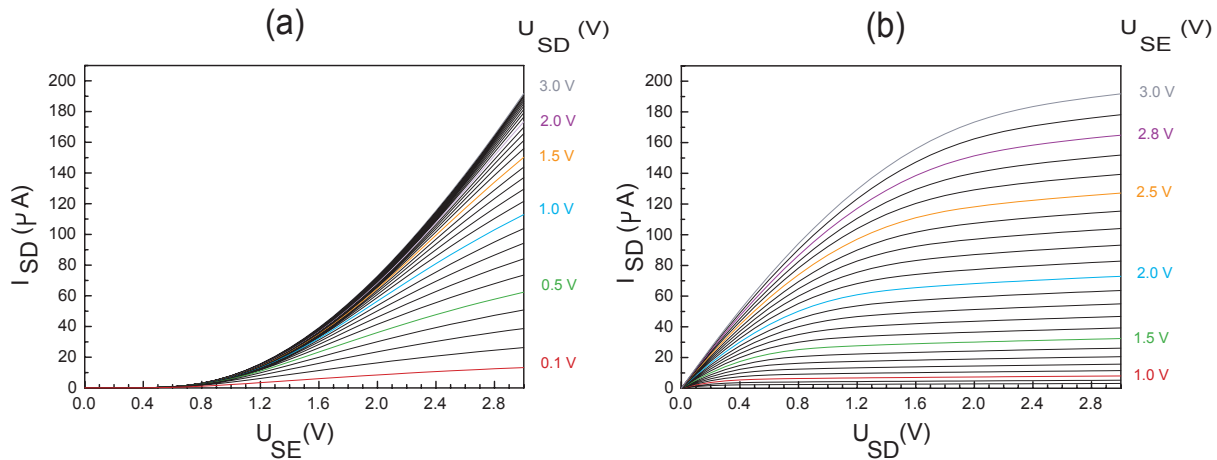


FIGURE 3.9: Allure générale des caractéristiques des transistors d'un réseau de 31 FETs obtenues lors d'une mesure effectuée avec un électrolyte $[KCl] = 0.01$ mM, couvrant la surface d'oxyde de silicium. (a) : allure des caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SE})_{U_{SD}=cste}$. (b) : allure des caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SD})_{U_{SE}=cste}$.

Ces caractéristiques sont cohérentes avec ce qui est prévu dans le cadre de la modélisation

⁴Cette durée dépend du nombre de transistors ainsi que des intervalles de tension choisis.

classique des structures EOSFETs, dérivée de celle des MOSFETs. Dans le modèle de contrôle de charges [69], les caractéristiques d'un EOSFET peuvent être évaluées à partir des deux équations :

$$I_{SD} = \beta \cdot [(U_{SE} - U_{SE}^{(T)})U_{SD} - \frac{U_{SD}^2}{2}] \quad (\text{pour } U_{SD} < U_{SE} - U_{SE}^{(T)}) \quad (3.1)$$

$$I_{SD} = I_{SDsat} = \frac{\beta \cdot (U_{SE} - U_{SE}^{(T)})^2}{2} \quad (\text{pour } U_{SD} > U_{SE} - U_{SE}^{(T)}) \quad (3.2)$$

L'équation 3.1 modélise le régime de conduction d'un EOSFET à canal p. En effet, comme décrit précédemment, l'apparition d'un canal de trous est conditionnée par l'application d'une tension source-électrode U_{SE} positive et supérieure à une tension seuil $U_{SE}^{(T)}$, soit $U_{SE} > U_{SE}^{(T)}$. Le régime de conduction est défini pour des tensions $U_{SD} < U_{SE} - U_{SE}^{(T)}$; dans ce régime, par analogie avec le fonctionnement d'un MOSFET, les tensions U_{SE} et U_{SD} permettent de contrôler le courant I_{SD} . Si l'on augmente progressivement U_{SD} à U_{SE} constant, l'épaisseur du canal de porteurs au niveau du drain tend vers zéro. Lorsque U_{SD} atteint la valeur seuil $U_{SE} - U_{SE}^{(T)}$, le canal est dit pincé et le courant source-drain reste alors constant (cf équation 3.2). Le paramètre β est une constante ne dépendant que des caractéristiques intrinsèques du transistor.

Les caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SD})_{U_{SE}=cste}$ de la figure 3.9.b présentent bien les évolutions attendues : une saturation du courant pour des valeurs de U_{SD} grandes devant $U_{SE} - U_{SE}^{(T)}$, conformément à l'équation 3.2 et une variation linéaire du courant en fonction de U_{SD} pour $U_{SD} \ll U_{SE} - U_{SE}^{(T)}$ (cf équation 3.1, en négligeant le terme U_{SD}^2 quand $U_{SD} \ll U_{SE} - U_{SE}^{(T)}$). De même, sur les caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SE})_{U_{SD}=cste}$ (cf figure 3.9.a), le courant I_{SD} suit une évolution parabolique en fonction de U_{SE} pour les grandes valeurs de U_{SD} (cf équation 3.2), et une évolution linéaire en fonction de U_{SE} pour de faibles valeurs de U_{SD} (cf équation 3.1).

En ce qui concerne les réseaux de quatre-vingt-seize transistors, l'examen des caractéristiques a montré qu'il était nécessaire de prendre en compte les valeurs des résistances en série engendrées par les connexions implantées dans le substrat, entre les connecteurs métalliques et les transistors. Cette étude a été menée par F.Pouthas et peut être trouvée dans [3]. Dans le cas des réseaux de soixante-deux transistors, l'influence des résistances de contact est négligeable, ce qui permet de travailler directement sur les caractéristiques issues de la mesure sans passer par une étape de correction préalable. Pour les mesures effectuées avec les réseaux de quatre-vingt-seize transistors, une étape de correction via un programme informatique est nécessaire.

De manière générale, un apport de charge sur la surface d'oxyde de silicium à U_{SD} constant, entraînera à la fois la modification⁵ de U_{SE} et de $U_{SE}^{(T)}$ et donc un changement global de la forme des caractéristiques. C'est à partir de l'analyse de ces modifications, dont la méthode sera

⁵La forme de $U_{SE}^{(T)}$ peut être déduite par analogie avec le fonctionnement d'un transistor MOS. En effet, pour un MOSFET à canal p, le canal de trous apparaît pour une tension source/grille, $U_{SG} > 0$, supérieure à une tension seuil $U_{SG}^{(T)}$ qui ne dépend que des caractéristiques intrinsèques du transistor (niveau de dopage, capacité associée à la couche d'oxyde). Dans le cas d'un EOSFET, la différence de potentiel entre la source et l'interface oxyde/électrolyte, indicé par O, U_{SO} joue le même rôle que U_{SG} dans un MOSFET. La loi d'additivité des tensions, appliquée entre la source et l'électrode d'un EOSFET conduit à : $U_{SE} = U_{SO} + U_{OE}$. La relation $U_{SG} > U_{SG}^{(T)}$

présentée au paragraphe 3.7, qu'ont été menées les études de détection de biopolymères chargés et de détection d'hybridation sur la surface des transistors.

3.4 Dispositifs de déposition

La plupart des dépôts ont été effectués avec des micropointes couramment utilisées dans les expériences de puces à ADN et susceptibles de déposer des volumes inférieurs au nanolitre. Cependant, les dispositifs de déposition sur les réseaux de transistors doivent permettre un positionnement précis des microgouttes sur la surface active des FETs. Cela impose le développement de systèmes offrant la possibilité d'effectuer des dépôts en des endroits prédéterminés, par visualisation simultanée de l'extrémité de la micropointe et de la surface des réseaux. Cette contrainte limite en un premier temps l'adaptation des processus entièrement automatisés des robots commerciaux, prévus pour l'utilisation de lamelles de taille standardisée et qui n'incluent généralement pas de visualisation directe de la zone de dépôt.

Outre les micropipettes permettant de déposer à l'oeil nu des macrodépôts de quelques dixièmes de microlitres sur une partie du réseau mal définie, deux dispositifs expérimentaux utilisant des micropointes ont été développés au laboratoire. Le premier, complètement manuel, couple une micropointe à ascension capillaire fixée sur des supports munis de vis de déplacement micrométrique, à un système de visualisation de la surface de dépôt. Le second, semi-automatisé, a été développé en adaptant un dispositif de visualisation sur un robot commercial à pointes piezoélectriques, utilisé pour la réalisation de puces basse densité.

3.4.1 Réalisation de macrodépôts

Les micropipettes commerciales utilisées en biologie pour le prélèvement de petits volumes allant de $0.2 \mu L$ à $2 \mu L$, permettent la déposition manuelle et à l'oeil nu de macrogouttes de quelques dixièmes de microlitres sur une partie mal contrôlée du réseau. Il est ainsi possible d'obtenir à chaque extrémité d'une ligne de FETs, un macrodépôt d'environ un millimètre de rayon, couvrant une dizaine de transistors (cf figure 3.10).

Cette technique assez rudimentaire ne permet pas le contrôle précis des volumes déposés et repose uniquement sur l'habileté de l'expérimentateur (il arrive parfois que les deux macrodépôts de solutions différentes se mélangent). Par contre, l'avantage majeur est de pouvoir obtenir assez rapidement deux gouttes de volumes suffisamment importants pour pouvoir éviter un séchage rapide en chambre humide et donc permettre des incubations longues sur la surface⁶. Les expériences présentées dans les chapitres suivant montreront que la durée du séchage a une importance très grande sur l'homogénéité des dépôts obtenus.

devient alors dans le cas d'un EOSFET : $U_{SE} - U_{OE} > U_{SG}^{(T)}$ soit $U_{SE} > U_{OE} + U_{SG}^{(T)}$. La tension seuil d'un EOSFET peut donc s'écrire $U_{SE}^{(T)} = U_{OE} + U_{SG}^{(T)}$ faisant intervenir aussi bien les caractéristiques intrinsèques du transistor via $U_{SG}^{(T)}$ que le saut de potentiel dans l'électrolyte.

⁶En chambre humide, la durée du séchage varie d'une demi-heure à une heure, selon les conditions extérieures.

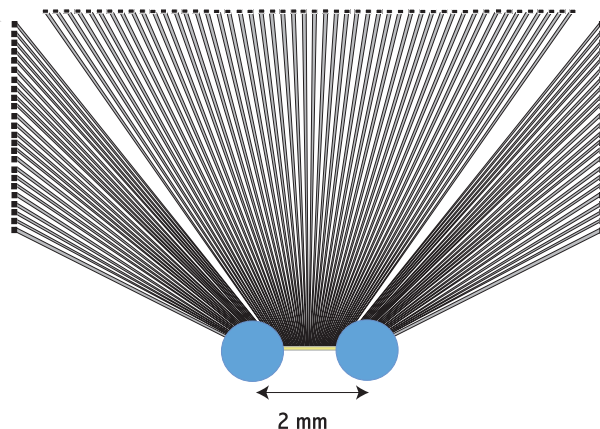


FIGURE 3.10: Deux macrodépôts déposés à chaque extrémité d'un réseau de 96 transistors.

3.4.2 Microdéposition manuelle à l'aide de pointes à ascension capillaire

Le premier montage de microdéposition à avoir été développé au laboratoire utilise des micro-pointes à ascension capillaire⁷, issues des technologies des puces à ADN. Ces pointes possèdent une extrémité cônica dans laquelle est formée une fente d'environ $40 \mu m$ de largeur (cf figure 3.11(a)). La capillarité permet le chargement de la pointe qui est ensuite amenée au contact de la surface où le dépôt s'effectue (cf figure 3.11(b)).

Le montage utilisé pour la microdéposition est représenté sur la figure 3.12. La pointe solidaire d'un système de platines permettant des microdéplacements dans les trois directions de l'espace, est d'abord translaturée afin d'amener son extrémité au niveau du point focal d'un objectif de microscope de grossissement 4X (Olympus), formant l'image sur une caméra CCD placée à environ 30cm. L'éclairage s'effectue à l'aide d'une fibre optique insérée dans une gaine rigide mais déformable. Le positionnement de la source lumineuse au voisinage de la pointe et les réglages micrométriques des platines permettent d'obtenir une image nette sur un écran vidéo relié à la CCD. Le réseau de transistors, placé sur un autre système de platines, est ensuite amené au contact de l'extrémité de la pointe afin d'effectuer le dépôt. La profondeur de champ de l'objectif permet de visualiser simultanément l'extrémité de la pointe et la surface du réseau avec une précision suffisante pour permettre un dépôt local sur les surfaces actives.

Trois types de pointes⁸ déposant des volumes de 0.5 nL, 0.9 nL et 3.7 nL ont été utilisés. Les pointes qui déposent des volumes inférieurs au nanolitre, permettent l'obtention de microdépôts d'environ $100 \mu m$ de diamètre, couvrant approximativement cinq transistors du réseau de 96 FETs (cf figure 3.13). Il est donc possible d'effectuer environ huit dépôts sur une ligne. La taille caractéristique des microdépôts réalisés avec la dernière pointe est d'environ $300 \mu m$ (couvrant une quinzaine de transistors du réseau de 96 FETs).

⁷Il existe d'autres types de pointes reposant sur des techniques de déposition différentes, comme par exemple les systèmes "pin and loop". La solution est prélevée avec un anneau dans lequel elle forme un film, puis une aiguille à tête plate, de diamètre défini, traverse le film de liquide pour le coller sur la lamelle.

⁸Microquill 2000 de chez Majer Precision, SMP3B et SMP8B de chez TeleChem.

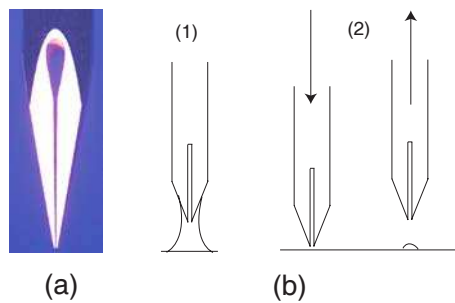


FIGURE 3.11: (a) Vue de côté d'une pointe. La partie la plus fine de la fente centrale fait une dizaine de micromètres de large. (b) Principe de la microdépôtition : la pointe est d'abord amenée au contact d'une solution mère où elle se charge par capillarité (b.1), puis en contact avec la zone de dépôt où elle forme un microdépôt (b.2).

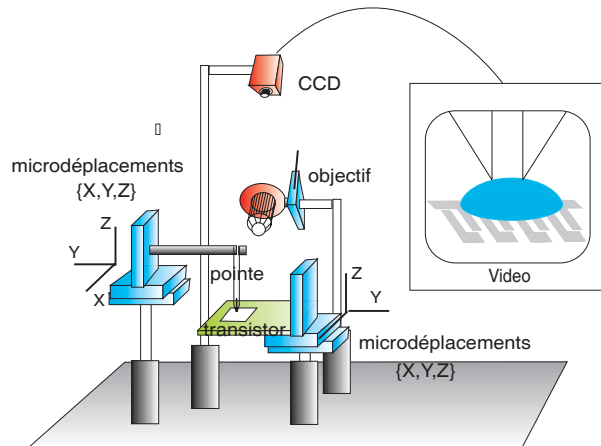


FIGURE 3.12: Montage de microdépôtition : l'inclinaison de l'axe optique du dispositif de visualisation (environ 45°) et la longue distance de travail de l'objectif (environ 4 cm), permettent de déplacer à la fois la pointe et le réseau de transistors sans aucune contrainte.

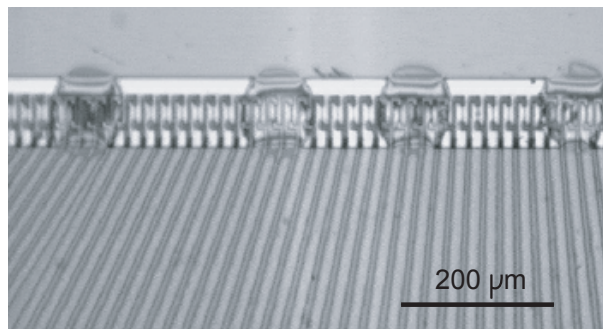


FIGURE 3.13: Quatre microdépôts effectués sur un réseau de 96 transistors.

De manière générale, l'utilisation de ce système est assez fastidieuse puisqu'entre chaque dépôt de solution différente, la pointe doit être démontée de son support, nettoyée dans quatre bains successifs de trente secondes contenant une solution de rinçage (Micro Cleaning Solution, MCS1, Telechem) puis séchée sous un courant d'air chaud. Par ailleurs, les micropointes sont chères et fragiles ; elles se bouchent facilement et tendent à former des dépôts relativement inhomogènes en forme d'anneau.

3.4.3 Microdépôtition automatisée à l'aide de pointes piezoélectriques

L'adaptation d'un dispositif optique de visualisation sur un robot commercial présente notamment l'avantage de permettre une automatisation des phases de dépôt, de chargement et de

rinçage des pointes. Grâce au concours de l'équipe de M.C Pottier de l'ESPCI, nous avons eu en prêt un robot commercialisé par la société Gesim dont une photo est présentée sur la figure 3.14.

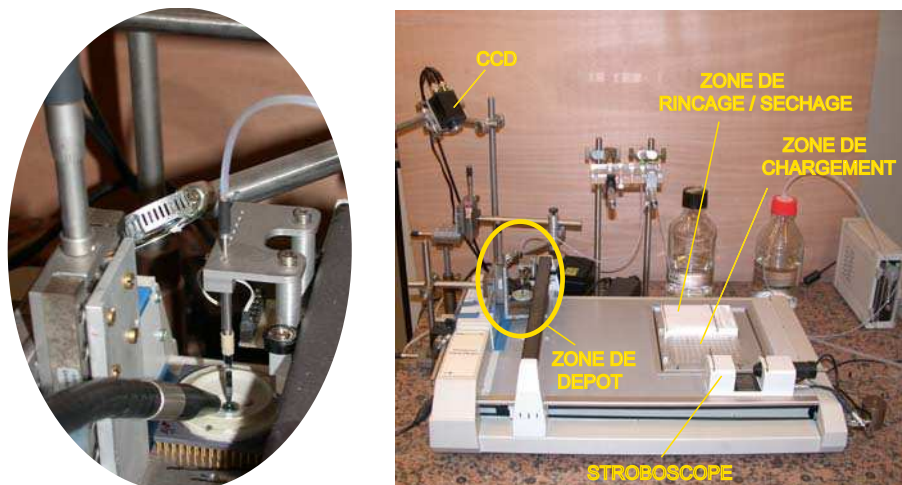


FIGURE 3.14: A droite : photographie du nanospotter GESIM et du montage optique permettant la réalisation de dépôts localisés sur la surface des réseaux. Les différentes zones de travail sont indiquées sur la photo. A gauche : grossissement de la pointe piezoélectrique positionnée au-dessus d'une structure. La fibre optique et la lentille permettant la formation de l'image sur la caméra CCD sont également visibles.

Il est constitué d'une tête portant entre une et huit pointes de microdéposition piezoélectriques pouvant se déplacer dans un plan horizontal, d'une plateforme de rinçage et de séchage des pointes et d'une autre plateforme permettant leur chargement (cf figure 3.14). Par ailleurs, un stroboscope intégré au robot et relié à un écran vidéo, permet avant chaque phase de dépôt la visualisation de la forme des gouttelettes projetées et le réglage de l'amplitude et de la fréquence des impulsions électriques commandant les éléments piezoélectriques des pointes. Cet appareil est interfacé avec un ordinateur et est pilotable à partir d'un logiciel fourni par la société Gesim. Deux modes de contrôle sont possibles : un mode automatique durant lequel un programme défini par l'utilisateur est exécuté et un mode manuel permettant de sélectionner et d'entrer au clavier les différents paramètres d'une action avant de l'exécuter. L'existence d'un large espace libre à gauche des plateformes (cf figure 3.14), nous a permis de mettre en place un dispositif de visualisation, semblable à celui décrit dans le paragraphe 3.4.2. Le système optique, constitué d'une caméra CCD et d'une lentille convergente de focale 10 cm^9 , est incliné au dessus d'un ensemble de platines permettant des microdéplacements manuels dans les trois directions de l'espace, et sur laquelle est placé le réseau de transistors.

La procédure de microdéposition à l'aide d'une pointe piezoélectrique s'opère alors comme suit :

- un programme permettant le rinçage et le chargement de la pointe dans un puits préalablement rempli de la solution à déposer est d'abord exécuté.
- Le réglage de l'amplitude et de la fréquence des impulsions électriques est ensuite effectué grâce à l'utilisation du stroboscope (cf appendice B).

⁹Pour des raisons d'encombrement, l'objectif 4X a été remplacé par une lentille.

- Une fois ce réglage effectué, la pointe se déplace et s'immobilise au-dessus de la surface du réseau. Le microdéplacement des platines (cf figure 3.14) permet alors de positionner la structure sous la pointe¹⁰ et d'obtenir une image sur un écran vidéo, de la pointe et de la surface à l'aide d'une fibre optique.
- Après le positionnement de la structure sous la pointe, le dépôt s'effectue en mode manuel en sélectionnant auparavant le nombre d'impulsions souhaité.

La procédure utilisée n'est certainement pas optimale. Elle a cependant présenté l'avantage d'être mise en place rapidement et a permis un gain de temps considérable lors des phases de dépôt. Par ailleurs, du fait de la forte pression¹¹ imposée lors des rinçages, les pointes piézo-électriques ont une durée de vie beaucoup plus longue que les pointes utilisées pour réaliser des dépôts par contact mécaniques.

La quantification par fluorescence de la taille des gouttelettes déposées et de la concentration surfacique obtenue en fonction des paramètres électriques du robot est présentée dans l'appendice B.

3.5 Acquisition d'images de fluorescence

3.5.1 Dispositif de mesure de la fluorescence

Le dispositif de mesure représenté sur la figure 3.15, est prévu pour permettre d'acquérir des images de fluorescence à deux couleurs, d'échantillons contenant des molécules marquées Cy3 et Cy5.

Les deux sources laser sont respectivement : pour le rouge, un laser HeNe ($\lambda_R = 632.8$ nm, Coherent, puissance 30 mW) et pour le vert un laser Nd :YAG doublé ($\lambda_V = 532$ nm, Spectra). Deux bras optiques indépendants amènent par un jeu de miroirs et de lentilles, les faisceaux lumineux au niveau d'une lame dichroïque (lame n°1). Ils entrent ensuite dans le bâti d'un microscope droit (Olympus BX50 WI), où ils sont réfléchis par une seconde lame dichroïque (lame n°2), puis focalisés au niveau de la surface de l'échantillon par l'objectif du microscope (objectif 10X, NA = 0.3, UPlan FL 10X). Les faisceaux focalisés constituent alors une source quasi-ponctuelle¹² permettant d'exciter les fluorophores Cy5 (laser rouge) et les fluorophores Cy3 (laser vert) avec une puissance réglable, grâce à un jeu de densités optiques. Les photons issus de la désexcitation des fluorophores sont à nouveau collectés par l'objectif du microscope et passent à travers un filtre¹³ qui sélectionne les longueurs d'onde correspondant au spectre d'émission du Cy5 (autour de 670nm) et à celui du Cy3 (autour de 570nm). Un système de deux fentes piézoélectriques ajustables (Piezosystem Jena, PZS1), positionnées dans deux plans images

¹⁰L'appareil utilisé ne possédant pas de déplacement vertical des micropointes, l'utilisation de platines permettant de translater le réseau de transistors est nécessaire.

¹¹Le rinçage des pointes piézoélectriques s'effectue à l'aide d'un piston injectant un flux continu d'eau dans la pointe. Les pointes mécaniques sont rincées par sonication dans une solution de nettoyage.

¹²La largeur du waist d'un laser focalisé par un objectif d'ouverture numérique NA est d'environ $\frac{\lambda}{2NA}$, soit ici de l'ordre du micromètre. Le faisceau focalisé couvre donc une surface d'approximativement $1 \mu m^2$. Des lentilles disposées immédiatement après les lasers, permettent éventuellement de jouer sur la taille du faisceau d'excitation.

¹³Ce composant a été fabriqué spécialement par la société Chroma.

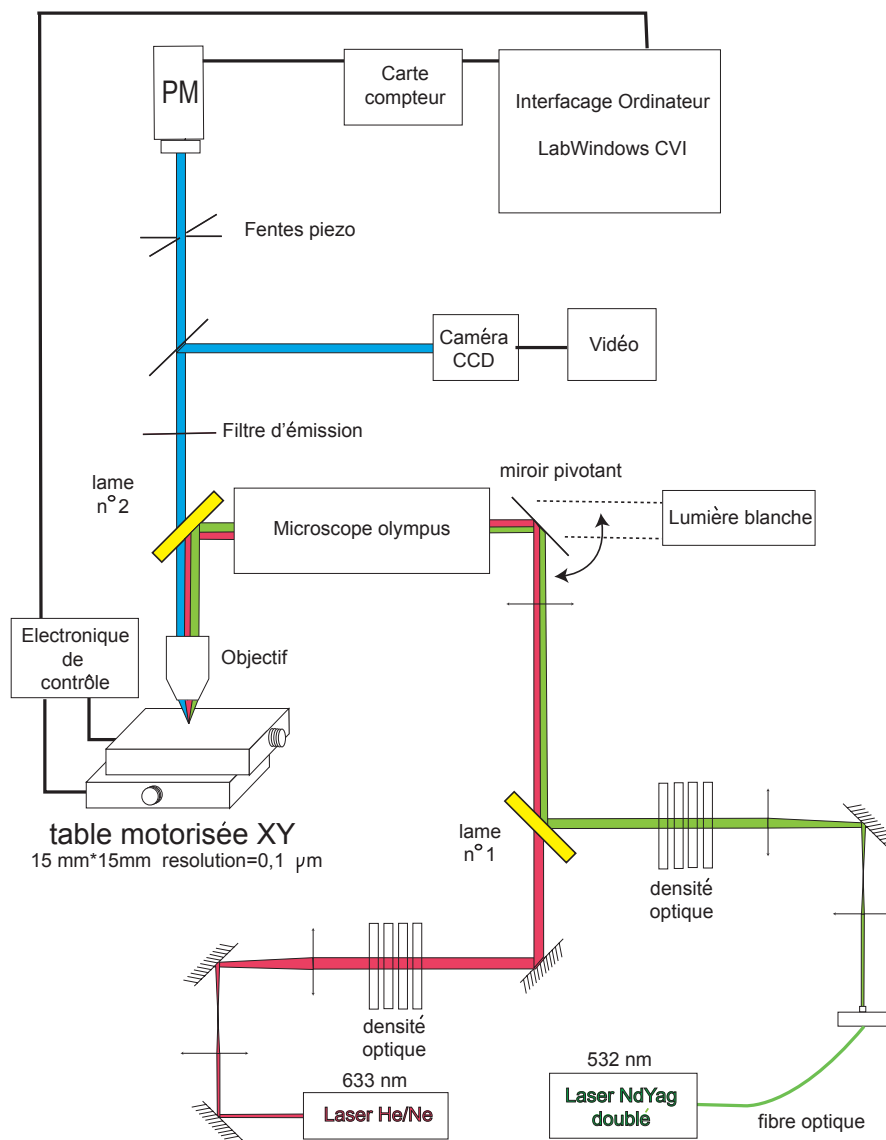


FIGURE 3.15: Schéma du dispositif d'acquisition des images de fluorescence.

en orientation croisée, permet d'assurer la configuration confocale du microscope [70, 71]. La détection de fluorescence est ensuite effectuée grâce à un photomultiplicateur en mode comptage de photons (H7421, Hamamatsu). Le positionnement de la surface de l'échantillon sous le faisceau d'excitation peut être contrôlé par deux platines motorisées (VXP 25XA, Newport) montées l'une sur l'autre. Chacune possède une course de quinze millimètres et est interfacée avec un ordinateur permettant leur pilotage avec une résolution de cent nanomètres.

3.5.2 Réalisation des images de fluorescence

Le système décrit précédemment permet une acquisition automatisée des images de fluorescence. En effet, un programme écrit sous LabWindows CVI contrôle à la fois le déplacement des

platines et l'enregistrement de l'intensité de fluorescence moyenne vue par le photomultiplicateur pendant un intervalle de temps donné. Les images des surfaces sont alors réalisées en commandant le déplacement de l'échantillon par pas successifs de longueur réglable, sous la source laser ponctuelle rouge ou verte. L'acquisition pour chaque position d'une intensité moyenne de fluorescence, permet de reconstruire une image à deux dimensions des surfaces des échantillons. Le traitement des données a été effectué via des programmes développés au laboratoire.

Deux modes d'acquisition ont essentiellement été utilisés :

- un mode global analogue à celui utilisé dans les expériences de puces à ADN, permettant l'obtention d'une image de fluorescence large, avec une résolution réglable.
- un mode explorant uniquement les surfaces actives des transistors d'un réseau, ce qui permet d'éviter de mesurer la fluorescence des zones sans intérêt. Ce mode fournit l'intensité moyenne de fluorescence¹⁴ des surfaces actives en fonction du numéro de transistor du réseau. Les données peuvent alors être directement comparées aux variations des caractéristiques électroniques induites par la présence des molécules chargées et marquées sur les surfaces actives. L'utilisation de ce mode sera illustré dans les chapitres suivants.

3.6 Protocole de greffage des sondes : la fixation polylysine

Le protocole de fixation que nous suivons, initialement développé par l'équipe de Pat Brown [44, 45, 46], est utilisé pour la fixation des ADN sondes dans la technologie des puces à ADN. Il est fondé sur le dépôt préalable d'une couche de polylysine sur la surface de verre des puces, permettant ensuite la fixation des brins d'ADN sondes.

La polylysine est un polymère issu de la polymérisation de la lysine, l'un des vingt acides aminés constituant les protéines. La structure de la lysine et de la polylysine sont présentées sur la figure 3.16.

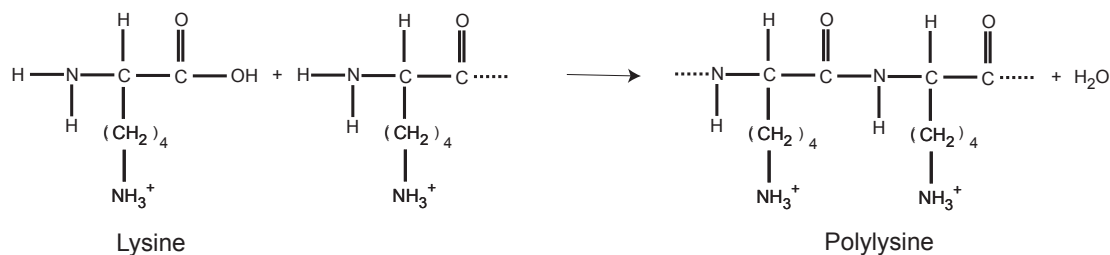


FIGURE 3.16: Structure chimique de la lysine et réaction de polymérisation conduisant à la formation de la polylysine.

¹⁴Pour les réseaux de quatre-vingt seize FETs, l'intensité moyenne associée à chaque surface active est calculée en effectuant la moyenne d'une quinzaine de relevés de fluorescence. Pour les réseaux de soixante-deux transistors, compte tenu de la taille plus petite des surfaces actives, la moyenne n'est effectuée que sur une dizaine de relevés.

La polylysine a pour principale caractéristique de posséder des groupements amine sur les chaînes latérales, dont le pK est de l'ordre de 10. A pH neutre, ce polymère peut donc être considéré comme positivement chargé en solution.

La première étape du protocole de fixation des sondes mis au point par Pat Brown, consiste à adsorber une couche de polylysine sur la surface de verre constituant le support des puces à ADN. A pH neutre ou basique, le verre est négativement chargé car une partie des groupes silanol SiOH est dissociée sous forme silanolate SiO^- (cf appendice C). La présence des groupements SiO^- à la surface du verre, ainsi que celle de groupements positivement chargés (NH_3^+) le long de la polylysine, permettent d'immobiliser de manière électrostatique une couche de ce polymère sur la surface. L'oxyde de silicium possédant, similairement au verre, des groupements silanol ionisés, la fixation d'une couche de polylysine peut être réalisée de manière équivalente sur les réseaux de transistors à effet de champ. La seconde étape du protocole correspond à la fixation des ADN sondes sur cette couche positivement chargée. Cette fixation est elle aussi assurée par des interactions électrostatiques entre les groupements amine positivement chargés de la polylysine, et les groupements phosphate négativement chargés du squelette de l'ADN¹⁵.

La solution de polylysine utilisée pour l'ensemble de nos expériences, dont la concentration sera notée c_0 dans toute la suite, est obtenue par dilution d'une solution commerciale (P8920, Sigma) à 0.01% w/v ($\Leftrightarrow 0.1mg/ml$) dans un tampon phosphate (PBS 0.1X).¹⁶

3.7 Expérience de détection de polylysine et d'ADN sur réseaux de transistors

Les expériences qui seront présentées dans ce manuscrit ont pour base le même protocole de greffage des sondes sur la surface des réseaux de transistors, utilisant la polylysine comme intermédiaire de fixation. Ce paragraphe a pour but de détailler à partir d'une expérience, les différentes étapes aboutissant à la préparation d'un réseau de transistors sur lequel ont été immobilisées des sondes et qui permettra par la suite, l'étude de l'hybridation. L'un des points forts de la détection électronique est de pouvoir mesurer les caractéristiques courant-tension des différents transistors du réseau après chaque traitement chimique. Cela nous a permis de caractériser aussi bien la modification du signal induite par l'adsorption d'une couche de polylysine, polymère positivement chargé, que celle liée à un dépôt d'ADN, molécule portant une charge négative en solution. Cet exemple sera l'occasion d'illustrer les méthodes d'analyse des caractéristiques mises en place ainsi que l'utilisation des différents dispositifs expérimentaux qui ont été décrits précédemment.

¹⁵Une étape postérieure au dépôt des ADN sur la polylysine permet de rendre cet attachement partiellement covalent. Un rayonnement UV (Stratalinker) est appliqué sur la lamelle de verre pendant quelques minutes. D'après [45], cette étape permet d'accroître la quantité d'ADN sondes fixée dans chaque dépôt. Cette étape n'étant pas indispensable, elle n'a pas été utilisée afin de simplifier le plus possible le protocole de fixation des sondes sur la polylysine.

¹⁶Dilution par 100 d'une solution de PBS 10X (15 ml H₂O, 5.8 ml Na₂HPO₄ 1M, 4.2 ml NaH₂PO₄ 1M, 75 ml NaCl 2M, pH=7).

3.7.1 Protocole expérimental de détection électronique

Au cours de cette expérience, une solution d'oligonucléotides d'une vingtaine de bases¹⁷, marqués Cy5, de concentration $20 \mu\text{M}$ a été utilisée ; la dilution est effectuée dans un tampon de KCl à $0,01\text{mM}$. Deux microdépôts ont été déposés sur chaque extrémité des réseaux d'une puce de 58 transistors (cf figure 3.17), grâce à l'utilisation du dispositif automatisé décrit dans la section 3.4.3. Pour les raisons expliquées au paragraphe 3.2.2, l'analyse ne portera que sur les vingt et un transistors centraux du réseau supérieur.

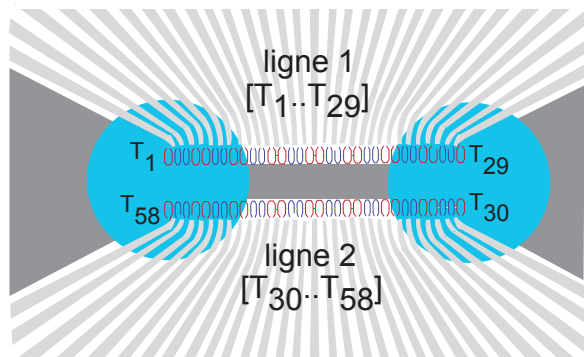


FIGURE 3.17: Deux dépôts d'oligonucléotides sur une puce de 58 transistors. Dans l'analyse, seuls les transistors centraux de la ligne 1 ($\in [T_5..T_{25}]$) sont pris en considération.

Les différentes étapes du protocole expérimental sont alors les suivantes :

- après nettoyage à l'acide sulfochromique et à la soude (cf paragraphe 3.2), on enregistre une première fois l'ensemble des caractéristiques des différents transistors du réseau suivant la procédure décrite au paragraphe 3.3.1. L'acquisition est effectuée en utilisant comme électrolyte de mesure une solution de KCl à $0,01 \text{ mM}$ et une électrode de référence AgCl/Ag. Cette mesure sera par la suite appelée mesure NaOH_1 .
- Une fois le premier enregistrement effectué, le réseau est rincé à l'eau déionisée, séché à l'air comprimé et une nouvelle mesure (mesure NaOH_2), est réalisée dans des conditions identiques ($[\text{KCl}] = 0,01\text{mM}$). Les mesures NaOH_1 et NaOH_2 , espacées d'un rinçage, permettent d'évaluer la stabilité du réseau avant dépôt de polylysine.
- La puce est ensuite rincée, séchée puis incubée globalement dans une solution de polylysine de concentration c_0 pendant environ une heure en chambre humide¹⁸.
- Après incubation, la solution de polylysine est rincée à l'eau déionisée et la structure séchée sous un courant d'air comprimé.
- Une troisième acquisition des caractéristiques des différents transistors du réseau (mesure PLL_1) est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment (électrolyte $[\text{KCl}] = 0,01 \text{ mM}$).

¹⁷Cy5-5'-AAC GTC AGC CCT GCC GCC TG-3' synthétisés par Thermo Hybrid.

¹⁸L'utilisation d'une chambre humide permet d'éviter le séchage de la solution de polylysine sur le réseau.

- Après rinçage à l'eau déionisée et séchage, le réseau de transistors est à nouveau mesuré (mesure PLL₂). Les mesures PLL₁ et PLL₂ permettront d'évaluer la stabilité de la couche de polylysine avant dépôt d'oligonucléotides.
- Après rinçage et séchage, deux microdépôts d'ADN localisés sur chaque extrémité du réseau (cf figure 3.17) sont effectués grâce à l'utilisation du nanospotter GESIM (cf paragraphe 3.4.3). Dans ce cas, les volumes déposés sont tels que les microgouttelettes sèchent quasi instantanément.
- A l'issue de la phase de dépôt des sondes, un dernier enregistrement des caractéristiques des transistors du réseau (mesure ADN) est réalisé, en utilisant toujours le même électrolyte ([KCl] = 0,01 mM).
- La dernière étape consiste à acquérir une image de fluorescence n'explorant que les surfaces actives des transistors du réseau (cf paragraphe 3.5.2).

A l'issue du protocole de dépôt des sondes, la polylysine a été déposée sur tous les FETs (incubation globale) et seuls quelques transistors de part et d'autre du réseau supérieur ont été successivement exposés à la polylysine et à l'ADN (cf figure 3.17). L'image de fluorescence permettra de déterminer avec précision les transistors exposés à l'ADN et donc de corrélérer les modifications des caractéristiques courant-tension enregistrées pour chaque transistor du réseau, avec la présence soit de polylysine, soit d'ADN et de polylysine.

3.7.2 Modifications des caractéristiques courant-tension lors d'un apport de charges

Ce paragraphe détaille les variations du signal électronique du transistor n°7 du réseau supérieur sur lequel ont été déposées successivement la polylysine et la solution d'ADN.

La figure 3.18.a présente les caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SE})_{U_{SD}=2V}$ du transistor n°7 obtenues, en vert, lors de la mesure NaOH₂, avant incubation globale de polylysine, et en bleu lors de la mesure PLL₁, après dépôt de polylysine.

L'apport de charges positives a entraîné une modification des caractéristiques qui peut être analysée de deux manières différentes. La première consiste à calculer pour un point de fonctionnement (U_{SE}, U_{SD}) donné, la différence entre les courants I_{SD} mesurés après et avant adsorption de polylysine (variation ΔI_{SD}). Sur la figure 3.18.b, on peut observer que l'apport de charges positives entraîne une variation $\Delta I_{SD} < 0$, conformément à ce qui a été discuté au paragraphe 3.1.2. Par la suite, l'analyse des variations de I_{SD} sera appelée analyse en courant.

L'autre méthode consiste à déterminer, à (I_{SD}, U_{SD}) donné, la variation de la tension U_{SE} , notée ΔU_{SE} et due à l'apport de charges. Cette analyse revient à travailler à courant constant. Dans le cas du transistor n°7, la figure 3.18.b montre que la variation associée à l'apport de charges positives est du signe attendu : $\Delta U_{SE} > 0$. Cette méthode sera appelée analyse en tension.

On peut également considérer l'état du transistor n°7, après dépôt de polylysine (mesure PLL₂), comme une référence¹⁹ pour l'étude d'un apport de charges négatives. Ainsi, la compa-

¹⁹Il sera montré dans le paragraphe suivant que la variation du signal entre mesure PLL₁ et mesure PLL₂ est négligeable.

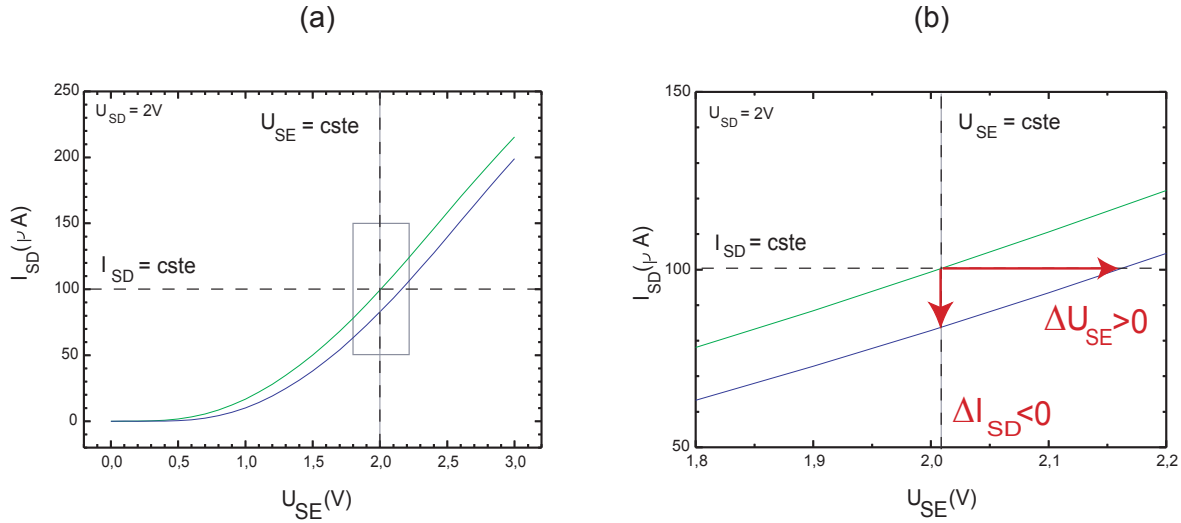


FIGURE 3.18: (a) Caractéristiques expérimentales $I_{SD} = f(U_{SE})_{U_{SD}=2V}$ du transistor n°7 : en vert lors de la mesure NaOH₂, en bleu lors de la mesure PLL₁. (b) Agrandissement de la zone correspondant au rectangle gris

raison des caractéristiques entre mesure ADN et mesure PLL₂ permet de mettre en évidence l'influence du dépôt des molécules d'ADN, négativement chargées.

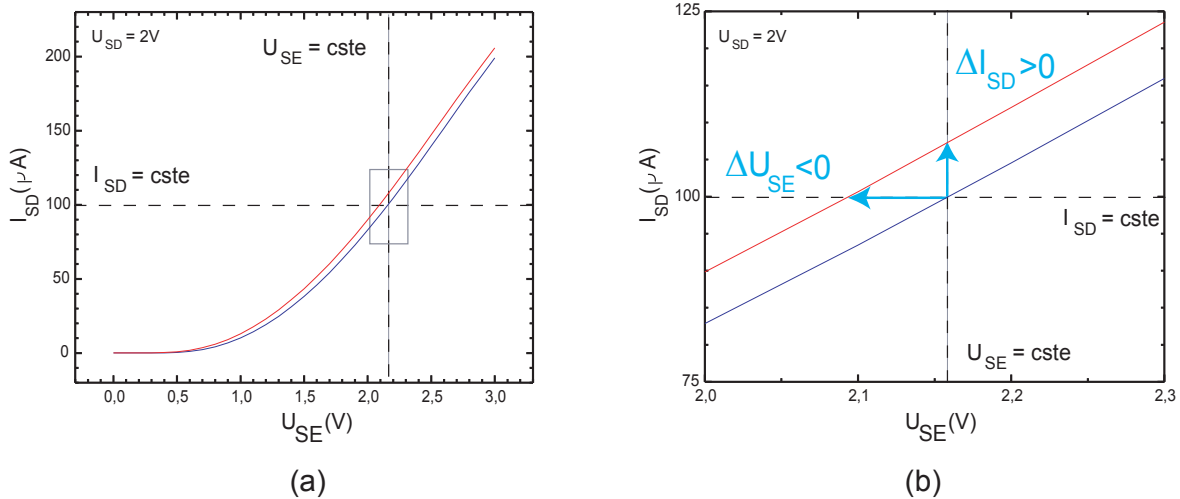


FIGURE 3.19: (a) Caractéristiques expérimentales $I_{SD} = f(U_{SE})_{U_{SD}=2V}$ du transistor n°7 : en bleu lors de la mesure PLL₂, en rouge lors de la mesure ADN. (b) Agrandissement de la zone correspondant au rectangle gris

La figure 3.19.a présente les caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SE})_{U_{SD}=2V}$ du transistor n°7 obtenues, en bleu, lors de la mesure PLL₂, avant dépôt d'ADN, et en rouge lors de la mesure ADN, après dépôt des oligonucléotides. Les deux modes d'analyse sont de nouveau possibles et conduisent bien à l'effet inverse de celui observé dans le cas d'un apport de charges positives : $\Delta U_{SE} < 0$ et $\Delta I_{SD} > 0$ (cf figure 3.19 (b)).

3.7.3 Analyse en tension et analyse en courant

De manière générale, l'analyse de l'influence d'un traitement chimique sur un réseau de transistors peut être menée en calculant les variations de tension ou de courant, pour tous les transistors d'un réseau, entre une mesure effectuée après traitement et une mesure avant traitement. Des programmes écrits sous l'environnement LabWindows CVI nous permettent de tracer directement, pour un point de fonctionnement donné, les courbes $\Delta U_{SE} = f(N^\circ \text{ Transistor})$ ou $\Delta I_{SD} = f(N^\circ \text{ Transistor})$.

La figure 3.20 présente les courbes $\Delta U_{SE} = f(N^\circ \text{ Transistor})$ calculées pour le couple ($I_{SD} = 50 \mu\text{A}$, $U_{SD} = 1,2 \text{ V}$) et associées à l'effet du dépôt de polylysine (triangles gris) et à celui d'ADN (étoiles rouges) sur le réseau supérieur de l'expérience décrite précédemment. La courbe en losanges gris correspond à l'évaluation de la stabilité du réseau (différence entre les mesures NaOH_2 et NaOH_1 , séparées par un rinçage) et la courbe en cercles bleus à la stabilité de la couche de polylysine (différence entre mesure PLL_2 et mesure PLL_1).

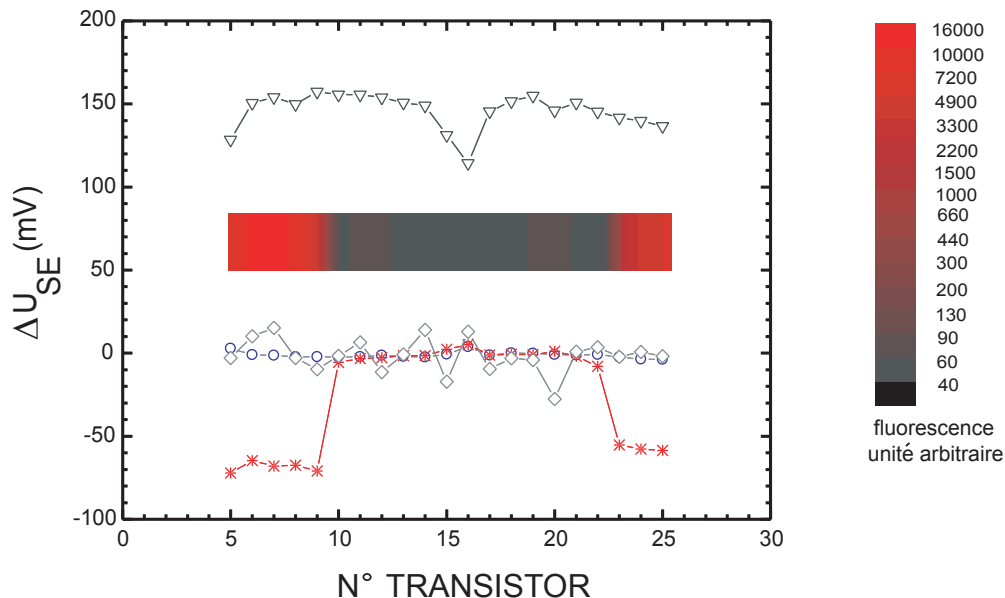


FIGURE 3.20: Analyse en tension de l'effet induit par le dépôt de polylysine et d'ADN sur la surface du réseau supérieur. Triangles gris : variation de la tension U_{SE} entre mesure PLL_1 et mesure NaOH pour les 21 transistors étudiés ; cercles bleus : variations de U_{SE} entre mesure PLL_2 et mesure PLL_1 ; losanges gris : variations de U_{SE} entre mesure NaOH_2 et mesure NaOH_1 ; étoiles rouges : variations de U_{SE} entre mesure ADN et mesure PLL_2 . Toutes les variations sont calculées pour le même point de fonctionnement : ($I_{SD} = 50 \mu\text{A}$, $U_{SD} = 1,2 \text{ V}$). Au milieu, intensité de fluorescence moyenne enregistrée pour chaque transistor. Toutes les mesures ont été effectuées dans un électrolyte de KCl à $0,01 \text{ mM}$.

La courbe en triangles gris montre que l'effet de l'incubation globale du réseau dans une solution de polylysine se traduit par un décalage positif global de la tension U_{SE} de $145,8 \pm 10,4 \text{ mV}$ pour tous les transistors. Cet effet apparaît significatif comparé à la variation du signal électrique enregistré entre les deux mesures NaOH consécutives (losanges gris), ayant une valeur moyenne de $-1,5 \pm 8,3 \text{ mV}$. Par ailleurs, le transistor n° 16 présente un accident marqué sur

la courbe en triangles. Des états de surface de l'oxyde de silicium nu, variables d'un transistor à l'autre, pourraient induire un dépôt inhomogène de polylysine sur le réseau et expliquer ces différences de comportement. La comparaison entre les courbes ΔU_{SE} associées aux variations entre les deux mesures NaOH (losanges) d'une part, et les deux mesures PLL (cercles) d'autre part, montre une plus grande stabilité des transistors après dépôt de polylysine. Cela peut être attribué à la sensibilité des différents FETs à des effets de sel locaux, plus importante sur des surfaces d'oxyde nues que recouvertes de polylysine. La courbe en étoiles rouges associée aux dépôts d'oligonucléotides, montre un décalage négatif significatif des transistors T5 à T9, à gauche ($-68,6 \pm 3,0$ mV) et T23 à T25 ($-57,2 \pm 1,7$ mV) à droite du réseau. La fluorescence moyenne enregistrée permet de corrélérer ces variations à la présence d'oligonucléotides sur ces FETs.

Cette analyse des variations des caractéristiques du réseau a été effectuée à U_{SD} et I_{SD} fixés (analyse en tension). Il est également possible d'évaluer les variations du courant I_{SD} pour une valeur donnée du couple (U_{SD} , U_{SE}) (analyse en courant). La comparaison entre analyse en courant et analyse en tension des effets induits par les dépôts d'ADN sur la couche de polylysine, est présentée sur la figure 3.21.

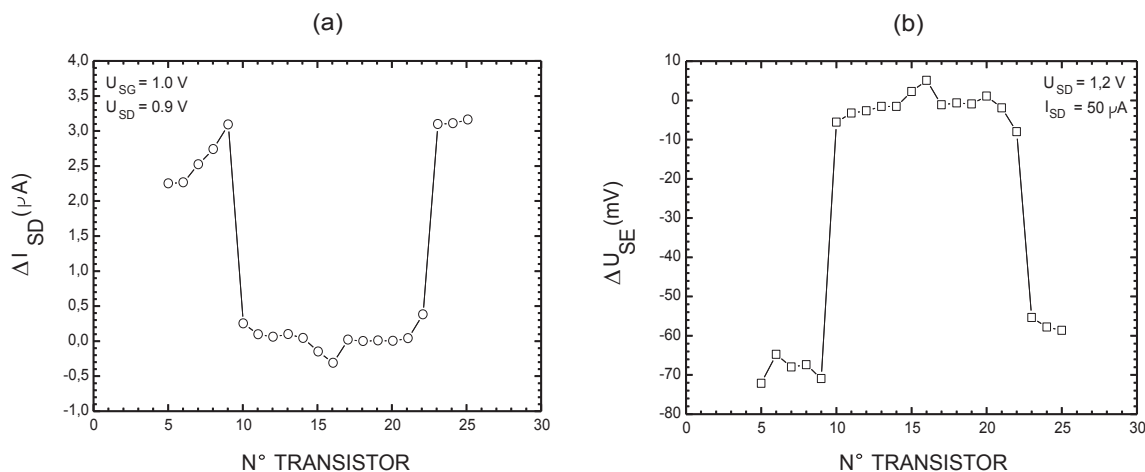


FIGURE 3.21: Comparaison entre analyse en courant (figure a) et analyse en tension (figure b) de l'effet induit par le dépôt d'ADN sur la couche de polylysine recouvrant les 21 transistors centraux du réseau supérieur. Les points de fonctionnement utilisés sont précisés sur chaque figure.

Sur les figures 3.21.a et 3.21.b ont été respectivement tracées les variations de courant et de tension des 21 transistors centraux du réseau supérieur, évaluées à partir des fichiers mesure ADN (après dépôt des oligonucléotides) et mesure PLL₂. Les effets observés correspondent à ceux prédits lors de l'analyse effectuée au paragraphe 3.1.2. Une variation positive du courant et négative de la tension est observée pour les transistors sur lesquels ont été déposés des oligonucléotides, négativement chargés, tandis que la partie du réseau n'ayant été exposée qu'à la polylysine reste centrée autour de zéro. Les différences de courant sur les zones ADN sont, dans cet exemple, de l'ordre de quelques microampères. Elles dépendent cependant du point de fonctionnement choisi pour effectuer l'étude (ici : $U_{SD} = 0,9$ V et $U_{SE} = 1,0$ V).

De manière générale, l'analyse des variations de U_{SE} lors d'un apport de charges (analyse en tension), présente l'avantage de relier directement les causes (dépôt de molécules chargées sur l'interface électrolyte/oxyde) aux effets (modification du potentiel de cette même interface entraînant la variation de U_{SE}). C'est pour cette raison que l'analyse en tension sera privilégiée dans la suite de ce manuscrit.

Chapitre 4

Détection électronique à faible concentration en sel

Dans des conditions appropriées, le dépôt de solutions de biopolymères, sur tout ou partie d'un réseau de FETs, entraîne des modifications significatives des caractéristiques des transistors exposés. Le début de ce chapitre résume les principales études [5] permettant de corréler les variations de tension observées à la présence de polylysine (cf paragraphe 4.1) et d'ADN (cf paragraphe 4.2.1), ainsi que de s'assurer de la reproductibilité des résultats. Suite à ce travail, plusieurs expériences ont été réalisées afin de déterminer la sensibilité de la détection électronique d'ADN. L'analyse correspondante sera présentée au paragraphe 4.2.2. Dans ce chapitre, toutes les mesures ont été réalisées en utilisant un électrolyte de chlorure de potassium de faible concentration (0,01 mM). Afin de bien distinguer les effets induits par une variation du nombre de molécules chargées sur la surface d'oxyde, de ceux liés à la nature et à la concentration de l'électrolyte, l'étude de l'influence de la solution de mesure a été reportée aux chapitres 5 et 6.

4.1 Détection électronique de la polylysine

Dans le but de développer la fixation des ADN sondes, les premières études ont été menées sur les variations des caractéristiques des transistors lors d'un apport de polylysine. Le protocole utilisé reste celui décrit dans le chapitre précédent. Cependant, différentes méthodes de dépôt ont été employées. L'utilisation de microdépôts a notamment permis d'étudier l'influence de la concentration de la solution de polylysine¹ sur la variation du signal électronique. Par ailleurs, la comparaison entre microdépôts séchant en quelques secondes sur la surface de manière incontrôlée, et macrodépôts dont la durée d'incubation peut être allongée jusqu'à plusieurs heures en chambre humide, a montré un effet non négligeable du séchage sur le signal électronique.

¹Conformément à ce qui a été dit au chapitre précédent, toutes les dilutions de polylysine utilisées ont été réalisées dans un solvant PBS 0,1X (environ 20 mM en sel) et leur concentration sera exprimée en fonction de celle d'une solution référence, notée c_0 . Bien que la longueur des chaînes peptidiques ne soit pas monodisperse, nous avons néanmoins pu estimer que c_0 correspond à environ 800 μM en monomères lysine. C'est cet ordre de grandeur qui sera conservé par la suite.

4.1.1 Macroépôts

L'expérience présentée ci-dessous a été réalisée en incubant sur une structure comportant deux lignes de 31 transistors, deux macroépôts de $0,3 \mu\text{L}$: l'un d'une solution de polylysine de concentration c_0 , diluée dans un solvant PBS 0,1X, et l'autre ne contenant que le solvant (cf figure 4.1). Etant donnée la similitude du comportement électronique des réseaux de FETs, les résultats associés à chacun d'entre eux seront présentés sur le même graphique. Les transistors de la première ligne seront indexés de T1 à T31 et ceux de la deuxième ligne de T32 à T62.

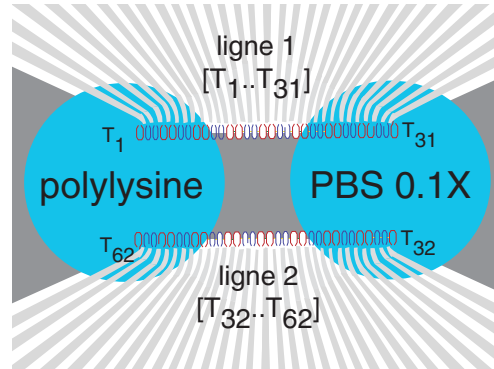


FIGURE 4.1: Deux macroépôts, l'un d'une solution de polylysine diluée dans PBS 0,1X (concentration c_0 , volume déposé de $0,3 \mu\text{L}$), l'autre d'une solution de PBS 0.1X, réalisés à la surface d'une structure comportant deux lignes de 31 transistors.

Conformément au protocole décrit dans le chapitre 3, la stabilité des réseaux "nus", c'est-à-dire non recouverts de biomolécules, est d'abord évaluée grâce à la variation de tension, entre deux mesures (dans $[\text{KCl}] = 0,01 \text{ mM}$) espacées par un rinçage à l'eau déionisée. Le résultat de cette première phase est représenté en cercles sur la figure 4.2 et constituera une référence pour mettre en évidence l'effet de l'apport de polylysine.

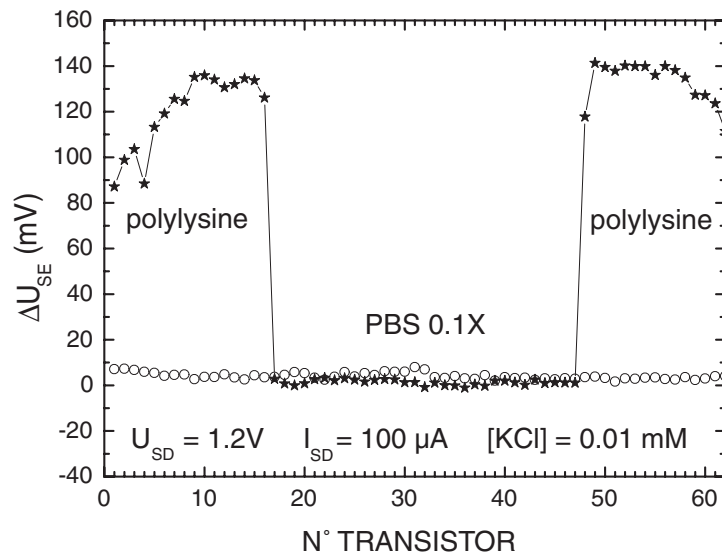


FIGURE 4.2: En cercles : variations de tension enregistrées lors de deux mesures espacées par un rinçage à l'eau déionisée, des réseaux de transistors non recouverts de polylysine. En étoiles, variations de tension induites par l'incubation des deux macrodépôts de la figure 4.1. Les mesures sont effectuées dans un électrolyte de $[KCl] = 0,01mM$.

Sur la courbe en cercles, on peut globalement observer un comportement uniforme des différents transistors des deux réseaux, même si une petite cassure apparaît au niveau de la transition T31/T32 entre les deux lignes. Par ailleurs, la variation moyenne de la tension U_{SE} entre les deux mesures espacées par un rinçage vaut : $\langle \Delta U_{SE} \rangle = 4,0 \pm 1,4$ mV, et est du même ordre de grandeur que celle obtenue dans l'expérience présentée au chapitre 3. De manière générale, la stabilité des différents transistors au sein d'un même réseau est très variable. Elle est incontestablement meilleure pour des structures neuves, et même dans ce cas reste dépendante de la puce utilisée.

Les deux dépôts sont ensuite effectués et la puce est laissée en chambre humide pendant une quinzaine de minutes. Durant cette phase on peut considérer que les gouttelettes ne sèchent quasiment pas et que les solutions restent en incubation sur la surface. La structure est ensuite rincée à l'eau déionisée² et séchée à l'air comprimé³. La courbe en étoiles de la figure 4.2 présente les variations de tension enregistrées entre une mesure après dépôt de polylysine et la mesure avant dépôt. Sur chaque réseau de 31 transistors, on peut observer un décalage positif d'environ 120 mV pour les régions exposées à la polylysine. Cette valeur est significative par rapport à celle évaluant la stabilité du réseau avant dépôt (courbes en cercles, $\langle \Delta U_{SE} \rangle = 4,0 \pm 1,4$ mV). Par contre, dans la partie centrale (T20 à T31 et T32 à T45), aucun signal pouvant être attribué à l'incubation de PBS 0,1X n'est observable. Cette expérience semble indiquer que la présence du solvant dans les solutions déposées n'a pas d'effets détectables sur les modifications des carac-

²Entre la phase de dépôt et la phase de rinçage, aucun séchage des dépôts n'a lieu sur la surface.

³Une éventuelle influence du gaz de séchage a également été testée en utilisant de l'azote. Aucune différence n'a été observée.

téristiques, et que les pics associés à la polylysine sont bien dus à la présence de biomolécules chargées positivement sur la surface des transistors. Cependant, il est apparu lors d'études complémentaires menées en microdépôts, qu'il n'en était pas toujours ainsi. Le paragraphe suivant montrera notamment que la durée de séchage a une influence importante sur la détection.

Huit expériences similaires d'incubation de macrodépôts de polylysine ont été réalisées sur différentes structures. Les parties exposées à la polylysine présentent systématiquement un décalage positif significatif (moyenne : $\langle \Delta U_{SE} \rangle = 119 \pm 19$ mV) comparé à la variation moyenne associée aux réseaux nus, égale à : $\langle \Delta U_{SE} \rangle = 5,5 \pm 5$ mV.

4.1.2 Microdépôts de concentration variable

Cette partie rassemble les résultats obtenus lors d'expériences effectuées en variant la concentration de la solution de polylysine déposée. Différentes séries de manipulations similaires ont été réalisées en utilisant des microdépôts et comme électrolyte de mesure, une solution de chlorure de potassium soit à 0,01 mM soit à 1 mM. Seul les résultats obtenus à 0,01 mM seront présentés ici ; les études effectuées à 1 mM, que l'on peut trouver dans [5], ont des caractéristiques très similaires, le changement de concentration de l'électrolyte de mesure se traduisant essentiellement par une diminution globale du signal obtenu⁴. Ce phénomène sera analysé en détail dans les chapitres suivants.

Observations expérimentales

La figure 4.3 présente la variation du signal électronique après-avant dépôt, obtenue dans une expérience au cours de laquelle cinq microdépôts de solutions de polylysine de concentrations différentes, diluées dans du PBS 0,1X, et un microdépôt de PBS 0,1X ont été réalisés.

La structure utilisée comporte un réseau de 96 transistors et les gouttelettes ont été obtenues avec une unique pointe à ascension capillaire, déposant un volume de l'ordre du nanolitre. Plusieurs observations peuvent être faites :

- la zone de dépôt du solvant pur présente un décalage positif de l'ordre de 40 mV par rapport à la ligne de base, tandis que dans l'expérience précédente, effectuée avec des macrodépôts, aucun signal significatif associé au PBS 0,1X n'avait été détecté. Ce phénomène, caractéristique des expériences menées avec des microdépôts, n'apparaît pas lors des études en macrodépôts et n'est pas propre au PBS puisqu'il est observé avec d'autres solutions salines (KCl). La principale différence entre les deux méthodes de dépôt est le temps d'incubation des solutions sur la surface. Pour une microgouttelette, le séchage s'effectue généralement en quelques secondes, de l'extérieur vers l'intérieur, et induit un signal électronique plus important au centre que sur les bords. Les macrodépôts peuvent rester plusieurs dizaines de minutes sur la surface sans séchage apparent. Il semble donc que la rapidité du séchage du PBS entraîne une modification de l'état de la surface du SiO₂, qui persiste même après un rinçage de la structure. Cet effet limite la détection de microdépôts de polylysine de faible concentration et donne un ordre de grandeur du seuil associé à ce mode de détection.

⁴Cela n'est vrai que tant que l'on reste dans des gammes de concentration inférieures à 1 mM environ. Au-delà, d'autres effets qui seront présentés au chapitres 5 et 6, ont été mis en évidence expérimentalement.

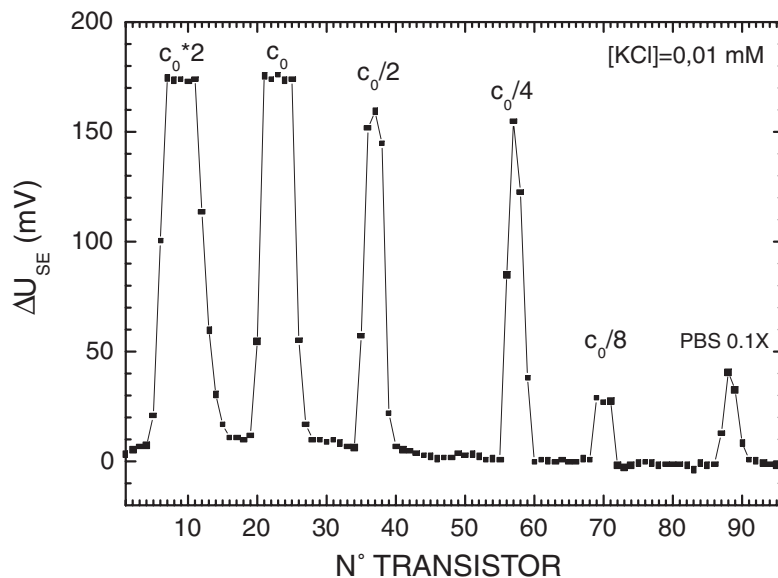


FIGURE 4.3: Détection de microdépôts de polylysine de concentration variable, sur un réseau de 96 transistors. L'électrolyte de mesure est une solution de KCl à 0,01 mM et le point de fonctionnement choisi pour l'analyse des données est ($U_{SD} = 1,2$ V ; $I_{SD} = 50$ μ A).

- L'observation de la structure des pics montre des profils de distribution des points de mesure très différents, et indique une grande inhomogénéité de la répartition de polylysine au sein de chaque dépôt. Pour les concentrations c_0 et $2c_0$, on peut nettement distinguer sur chaque pic une partie centrale de hauteur à peu près constante, et deux bords, associés à quelques transistors. Les plateaux correspondant à ces deux pics ont la même valeur. Le signal montre donc une saturation claire de la partie centrale autour de 175 mV. Cet effet reproductible a été attribué à la quantité maximale de polymères positivement chargés pouvant s'adsorber à la surface de l'oxyde. Une discussion plus précise de cet aspect sera fournie dans la section suivante. Les microdépôts de concentration inférieure à c_0 ne présentent pas de saturation claire.
- Il est intéressant de constater qu'au sein d'un dépôt, l'inhomogénéité est telle que les points de mesure se répartissent sur toute la gamme allant de la ligne de base jusqu'à la saturation. Dans cette expérience, la comparaison entre le pic $c_0/8$ situé au niveau du seuil de détection et celui à $c_0/4$ présentant déjà un point quasi saturant, met en évidence les difficultés liées au contrôle précis des quantités de molécules déposées sur la surface active d'un transistor donné.
- De manière générale, la rapidité de séchage semble jouer un rôle important dans l'apparition de fortes inhomogénéités de la répartition de la quantité de polylysine dans des dépôts de petits volumes (~ 1 nL). Même si ce n'est pas le cas dans cette expérience, les formes des pics électroniques obtenues en déposant des solutions de polylysine ou d'ADN, ont très souvent fait apparaître une surconcentration sur les bords des microdépôts, qui peut éventuellement être expliquée par l'effet Marangoni [72]. L'utilisation de macrodépôts permet l'obtention d'une répartition beaucoup plus homogène des molécules sur les différents capteurs, la partie centrale de la goutte restant en incubation beaucoup plus longtemps sur la surface.

- Dans l'expérience présentée sur la figure 4.3, on peut observer une augmentation de la largeur des pics⁵ avec la concentration de la solution déposée. Tous les microdépôts ayant été effectués avec la même pointe, il est surprenant que les pics $c_0/8$, $c_0/4$ et $c_0/2$ apparaissent moins larges que ceux associés à c_0 et $2c_0$. L'élargissement apparent des pics à forte concentration est vraisemblablement lié à l'existence d'une saturation. L'écrêtage des pics (à une hauteur d'environ 170 mV) entraîne une augmentation de la largeur à mi-hauteur des pics lorsque la concentration augmente. Toutefois, cet effet ne semble pas suffisant pour expliquer la sensible augmentation de la largeur à la base observée. Il semble donc que les changements de concentration modifient les propriétés d'étalement ou de séchage de la goutte, entraînant une évolution de la géométrie du dépôt. Afin de simplifier, tout au long de ce manuscrit, la largeur d'un pic correspondra à la largeur à la base.

Evaluation de la sensibilité de la détection de polylysine

Dans toute la suite, la sensibilité des capteurs sera définie comme la variation de tension induite par une variation donnée de la densité surfacique moyenne de molécules présente sur la surface des transistors.

L'utilisation de microdépôts de très petits volumes séchant complètement sur la surface, permet de connaître la quantité totale de molécules déposées initialement. Cependant, la répartition des molécules étant très inhomogène au sein d'un pic, les points de mesure s'étalent sur l'ensemble de la gamme de détection. Dans ces conditions, la meilleure méthode d'analyse consisterait à essayer de quantifier le nombre de molécules déposé sur chaque transistor du réseau étudié, indépendamment de son appartenance à un pic, et de le relier au signal électronique détecté. Cette approche nécessite l'utilisation d'un moyen externe de quantification du nombre de molécules, la fluorescence par exemple, et sera présentée au paragraphe 4.2.2 dans le cas des dépôts d'ADN.

En ce qui concerne la polylysine, la courbe de la figure 4.3 permet une évaluation de la sensibilité. En effet, l'ensemble des points de mesure caractérisant les différents pics couvre la totalité de la gamme de variation de tension allant du seuil inférieur de détection, que l'on peut définir par le signal associé au pic $c_0/8$, du même ordre de grandeur que celui du PBS 0,1X, jusqu'à la saturation clairement apparente pour les pics c_0 et $2c_0$. La concentration c_0 correspond à une solution de 800 μM en monomères lysines. Les dépôts ont été réalisés à l'aide de pointes à ascension capillaire délivrant des volumes de l'ordre du nanolitre ($v \simeq 1 \text{ nL}$) et ont un diamètre moyen d'environ 100 micromètres ($d \simeq 100 \mu\text{m}$). La densité surfacique moyenne de groupements lysines pour un dépôt de concentration c_0 est donnée par :

$$\sigma_{c_0} = \frac{vc_0 N_A}{\pi \frac{d^2}{4}} \simeq 5.10^7 \text{ lysines}/\mu\text{m}^2 = 50 \text{ lysines}/\text{nm}^2$$

où $N_A = 6.02 \cdot 10^{23}$ est le nombre d'Avogadro.

D'après ce qui a été dit précédemment, cette valeur correspondrait à la densité surfacique maximale de monomères lysine pouvant être fixée sur une surface d'oxyde. Des études menées sur

⁵On peut définir un pic à partir de l'ensemble des points de mesure contigus situés au-dessus de la valeur moyenne de la ligne de base l'entourant. Les transitions très marquées entre les zones nues du réseau et celles exposées à la polylysine rendent cette définition raisonnable.

l'adsorption de différentes solutions de polylysine sur des microbilles de silice dans un tampon PBS,⁶ ont été publiées par Latour et collaborateurs [73]. Les résultats montrent que la saturation se produit pour une quantité constante de monomères par unité de surface : $\sigma_{sat} \simeq 20$ lysines.nm⁻², indépendamment du degré de polymérisation de la polylysine testée. La valeur obtenue, proche de celle évaluée à partir de nos expériences, semble confirmer que la saturation électronique des pics est corrélée à une saturation d'adsorption.

Dans ce travail, la sensibilité du mode de détection électronique sera globalement définie comme la variation de tension induite par une variation donnée de la densité surfacique moyenne de molécules présentes sur la surface des transistors et le seuil de sensibilité, par la densité surfacique minimale de molécules détectable. La valeur de σ_{c_0} évaluée précédemment fournit un ordre de grandeur de la sensibilité de la détection de microdépôts de polylysine : le réseau de transistor utilisé permettrait la détection de concentrations allant d'environ 5 à 50 lysines.nm⁻² ($c_0/10$ à c_0), dans une gamme d'à peu près 150 mV.

Une étude statistique menée par F.Pouthas [5], a permis d'évaluer sur une dizaine d'expériences, la moyenne des signaux électroniques obtenus pour des microdépôts de solutions de polylysine de différentes concentrations. Les résultats montrent qu'il est en moyenne possible de repousser le seuil de détection jusqu'à 0,5 lysines.nm⁻², soit une concentration de $c_0/100$. La valeur réelle de la limite de détection basse est très difficile à évaluer puisqu'elle ne dépend que du signal induit par le solvant de dilution, qui dans les expériences de microdépôts, semble énormément dépendre des effets de séchage. L'ordre de grandeur des signaux associés au solvant dans les expériences de macrodépôts (\sim qq's mV) laisse supposer que le seuil de détection est en réalité plus bas.

4.1.3 Stabilité de la couche de polylysine déposée

La caractérisation de la stabilité de la couche de polylysine a été effectuée à partir d'une centaine d'expériences. Ces résultats sont regroupés dans le tableau 4.1.

	Moyenne Réseau (mV)	Variabilité Réseau (mV)	Variabilité FET/FET (mV)	Nombre d'expériences
Incubation PL	100 ± 56	15 ± 10	2.6 ± 1.8	105
Rincage PL	-0.2 ± 22	4.5 ± 6.0	1.0 ± 1.2	99

TABLEAU 4.1: Statistiques des variations de tension associées à l'incubation globale de polylysine et stabilité de la couche obtenue.

Deux paramètres ont été évalués : le décalage moyen obtenu entre mesure après et mesure avant dépôt (ligne Incubation PL, tableau 4.1), lié à l'adsorption de polylysine sur la surface et la différence de signal électronique entre deux mesures consécutives, espacées d'un rincage à l'eau déionisée du réseau recouvert de polylysine (ligne Rincage PL, tableau 4.1). Cette dernière valeur permet d'estimer la stabilité de la couche elle-même. Pour chacune de ces mesures, il est possible de calculer la moyenne et l'écart type de la distribution des variations de tension, ΔU_{SE} , des

⁶Les valeurs des quantités de polymères adsorbés sont obtenues par une quantification de la concentration de polylysine restant dans le surnageant d'un mélange polylysine/microbilles de silice après 2 heures de réaction.

différents transistors du réseau (respectivement colonne Moyenne Réseau et colonne Variabilité Réseau du tableau 4.1), ainsi que la moyenne des différences de variations de tension entre deux transistors voisins (colonne Variabilité FET/FET). Le nombre d'expériences prises en compte est précisé dans la dernière colonne du tableau 4.1. La répartition des décalages correspondant à l'incubation de polylysine est centrée sur 100 mV avec un écart-type relativement élevé (56mV). Cette dernière valeur est sans doute en grande partie attribuable aux différences entre les structures utilisées. La variabilité réseau, de l'ordre de 15mV en moyenne, confirme les différences d'état de surface entre les transistors au sein d'une même structure. Cependant la valeur de $2,6 \pm 1,8 \text{ mV}$ obtenue pour la variabilité entre FETs voisins, laisse penser que les inhomogénéités ne sont pas aléatoirement réparties le long du réseau mais apparaissent graduellement. En ce qui concerne les décalages induits par les rinçages, la moyenne est proche de zéro, indiquant une bonne stabilité de la couche de biopolymères déposée.

4.2 Détection électronique de l'ADN

4.2.1 Validation du protocole de fixation des ADN sondes et analyse globale des microdépôts d'ADN

Cette partie rassemble les résultats nous ayant permis de valider le protocole de fixation des ADN sondes qui a, par la suite, servi de base à l'étude de l'hybridation. L'influence du solvant de dilution et des marqueurs fluorescents présents dans les solutions d'ADN a été testée. Par ailleurs, l'existence d'inhomogénéités des quantités d'ADN déposées au sein des dépôts, nous a amené à comparer de nouveau entre micro et macrodépôts. Toutes les expériences présentées ici ont été effectuées avec une solution de polylysine de concentration c_0 et des oligonucléotides simples-brins d'une vingtaine de bases. L'électrolyte de mesure utilisé est toujours une solution de KCl à 0,01 mM.

Détection de microdépôts d'ADN sondes fluorescents

La figure 4.4 présente les résultats d'une expérience de fixation et de détection de trois microdépôts d'oligonucléotides de vingt bases sur un réseau de 96 transistors.

Le protocole suivi est exactement le même que celui décrit au chapitre 3. Les courbes de la figure 4.4 correspondent ici aux signaux absolus⁷ (et non plus aux différences entre deux mesures), enregistrés avant (étoiles vertes) et après (cercles bleus) incubation de polylysine puis après dépôt d'oligonucléotides (carrés rouges). L'incubation de polylysine conduit à nouveau à un décalage positif d'environ 120 mV entre la courbe en étoiles et la courbe en cercles. La courbe associée au SiO₂ nu (étoiles) présente une dérive importante le long du réseau (~ 70 mV) qui semble largement s'atténuer après le dépôt de polylysine (cercles). Cette caractéristique a été très fréquemment observée et confirme que les "états de charge"⁸ des surfaces d'oxyde

⁷Pour chaque mesure et pour chaque transistor, on trace la tension U_{SE} associée au point de fonctionnement ($U_{SD} = 1,2 \text{ V}$; $I_{SD} = 50 \mu\text{A}$)

⁸Il s'agit en toute rigueur, de l'état du transistor. La dénomination état de charge provient du fait que dans la suite de ce travail, l'essentiel des propriétés de l'interface oxyde / électrolyte sera interprété en terme de charges effectives de surface et de couche diffuse, rendant compte des variations de différences de potentiel (cf appendice C).

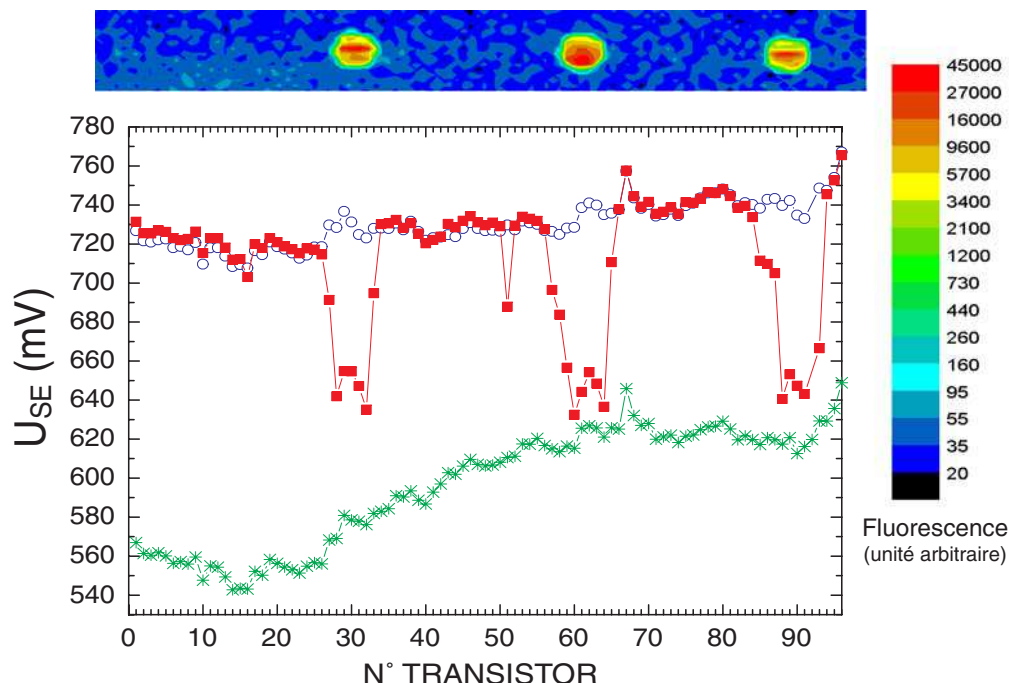


FIGURE 4.4: Fixation d'oligonucléotides à la surface d'un réseau de transistors recouvert de polylysine. Les courbes en étoile et en cercle représentent respectivement l'état du capteur avant et après l'incubation de polylysine. La courbe en carré correspond à la mesure après dépôt d'ADN. Les mesures sont réalisées dans un électrolyte de KCl à 0,01mM. L'analyse des données a été effectuée pour le couple ($U_{SD} = 1,2$ V ; $I_{SD} = 50 \mu\text{A}$). Une image de fluorescence globale des trois dépôts d'ADN est donnée au dessus de la courbe électronique.

des transistors au sein d'un même réseau sont très variables. Par ailleurs, l'état de charge des transistors après incubation d'une solution de polylysine de concentration c_0 semble être plus ou moins indépendant de l'état initial de l'oxyde nu. En supposant que dans cette expérience, la saturation de la surface en monomères lysine soit atteinte, cette dernière observation semble indiquer que la densité surfacique de polylysine à saturation varie en fonction de l'état de charge initial du SiO_2 nu.

Dans cette expérience, trois microdépôts d'oligonucléotides fluorescents⁹ de concentration $50 \mu\text{M}$ ont été effectués au niveau des FETs 28, 62 et 90. Les solutions d'ADN ayant été obtenues en diluant une solution mère dans de l'eau, trois microdépôts référence d'eau ont été réalisés au niveau des transistors 15, 50, et 75. La courbe en carrés montre bien un décalage négatif (~ -90 mV) au niveau des zones exposées à l'ADN, que l'on peut localiser avec précision grâce à l'image globale de fluorescence. Aucun signal significatif n'apparaît sur les zones où l'eau a été déposée¹⁰. Cette expérience n'est cependant pas très représentative de l'influence du solvant de dilution des solutions d'ADN sonde sur la détection de microdépôts. Une moyenne sur huit microdépôts d'eau, effectués avec les pointes à ascension capillaire, donne des effets induits par le solvant de l'ordre de -14 ± 10 mV. La même étude menée sur un ensemble de six microgouttelettes de

⁹Cy5-5'-AAC GTC AGC CCT GCC GCC TG-3' synthétisés par Thermo Hybrid.

¹⁰Le transistor 50 présente un décalage négatif important. Compte tenu de son caractère isolé, il apparaît difficile de l'attribuer à un éventuel effet de séchage.

volumes à peu près équivalents, réalisées avec le spotter Gesim, conduit à -7 ± 5 mV. Le contact mécanique entre la pointe et la surface dans le premier cas, inexistant dans le second, constitue la principale différence entre les deux méthodes de dépôt. De manière générale, l'apparition de pics électroniques associés à des microgouttelettes d'eau (solvant utilisé pour la dilution des solutions d'ADN dans cette expérience) est analogue à ce qui a déjà été observé lors de l'étude de la détection de polylysine (cf paragraphe 4.1). Cet effet semble être indépendant de la méthode de microdépôt utilisée (avec ou sans contact mécanique de la pointe sur la surface) et limite la détection électronique des solutions d'ADN de faibles concentrations.

Ce protocole de fixation constitue la base des expériences d'hybridation qui seront présentées dans ce manuscrit. La vérification de la reproductibilité de la détection d'ADN non marqué a constitué une étape préliminaire importante. Il était en effet nécessaire d'acquérir une confiance suffisamment grande dans le système pour pouvoir se passer d'un contrôle systématique par mesure de fluorescence. Une fois validée, on peut noter que la détection électronique offre une vérification de chacune des étapes du protocole, aussi bien lors du dépôt de la sous-couche de polylysine que lors de la fixation des molécules d'ADN, ce qui n'est pas possible dans le cadre des études classiques par fluorescence sur puces à ADN.

Détection de molécules d'ADN non marquées

L'expérience dont les résultats sont présentés sur la figure 4.5, illustre à la fois la possibilité de détecter des molécules non fluorescentes et le comportement du système lors de l'utilisation de macrodépôts.

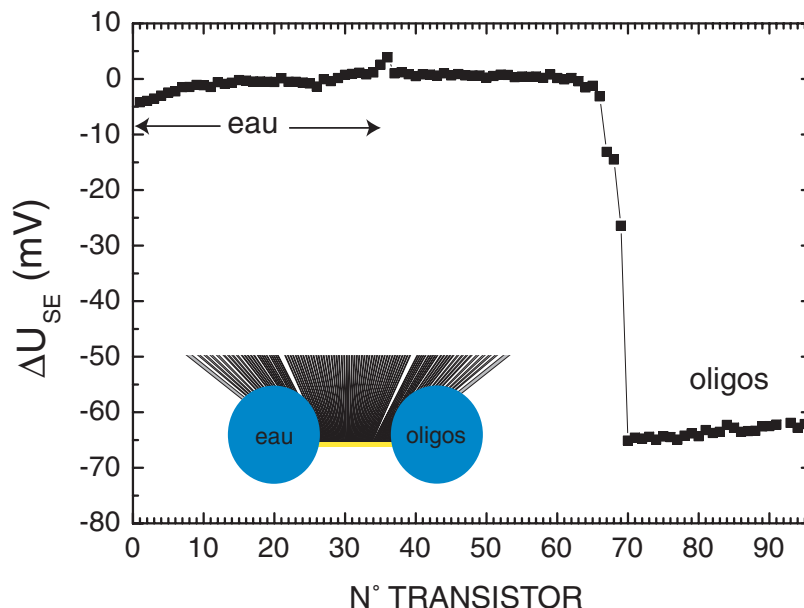


FIGURE 4.5: Comparaison des variations de tension obtenues après incubation d'un macrodépôt d'une solution d'oligonucléotides non marqués, de concentration $100 \mu\text{M}$, diluée dans l'eau, et d'un macrodépôt d'eau, sur un réseau couvert de polylysine. L'analyse des données a été effectuée pour le couple ($U_{SD} = 1,2 \text{ V}$; $I_{SD} = 50 \mu\text{A}$) et l'électrolyte de mesure est du KCl à $0,01 \text{ mM}$.

Une gouttelette d'une dilution à 100 μM d'oligonucléotides non marqués¹¹ dans de l'eau, a été déposée sur la partie droite d'un réseau de 96 transistors, tandis que sur la partie gauche a été effectué un dépôt d'eau. Les macrodépôts correspondent à des volumes de 0,5 μL , mais ne couvrent chacun qu'une trentaine de transistors (cf. encart figure 4.5). Après dépôt, la structure a été placée quinze minutes en chambre humide puis rincée et immédiatement mesurée sans étape de séchage préalable. Le solvant engendre un faible signal dont l'ordre de grandeur (moins d'une dizaine de mV) est comparable à celui obtenu précédemment lors des études de dépôts de polylysine. Un décalage négatif d'environ -65 mV apparaît sur la zone ayant été exposée à l'ADN non marqué, ce qui confirme que le signal électronique détecté n'est pas lié à la présence de marqueurs fluorescents sur l'ADN, mais bien aux molécules elles-mêmes. Un autre point important concerne la comparaison de la structure des pics obtenue en microdépôts et en macrodépôts. Dans l'expérience présentée au paragraphe 4.2.1 (figure 4.4), au sein de chaque microdépôt les points de mesure se répartissent sur toute la gamme de tension allant de la ligne de base jusqu'au sommet du pic, tandis que sur la figure 4.5, le signal associé à la zone ADN est beaucoup plus uniforme. De manière générale, l'utilisation de microdépôts engendre des pics électroniques très inhomogènes, mais garantit que l'ensemble des molécules initialement déposées est présent sur la surface avant la mesure électronique (séchage rapide des microgouttelettes projetées par le nanospotter et pas d'étape de rinçage entre la phase de dépôt et l'immersion dans l'électrolyte de mesure). Cette méthode a été employée afin d'estimer la sensibilité de la détection d'ADN (cf paragraphe 4.2.2). En macrodépôt, l'utilisation de plus grands volumes offre la possibilité de maintenir les solutions plus longtemps en incubation sur la surface, ce qui conduit généralement à un signal électronique beaucoup plus uniforme¹². Cette constatation nous a amenés à réaliser les premières expériences d'hybridation en macrodépôts (cf chapitre 7).

Reproductibilité de la détection d'ADN non marqué

La figure 4.6 résume les résultats obtenus lors de vingt-deux expériences de dépôt de sondes lors d'expériences d'hybridation, effectuées sur cinq structures différentes¹³, et au cours desquelles 38 microdépôts de solutions d'oligonucléotides¹⁴ ont été réalisés avec le nanospotter GESIM. Les caractéristiques des transistors ont systématiquement été mesurées en utilisant un électrolyte de KCl à 0,01 mM. Pour des raisons de commodité de lecture, l'opposé de la variation moyenne de tension, $-\langle \Delta U_{SE} \rangle$, a été représentée.

A chacun des trente-huit microdépôts correspond un pic électronique qui est défini par l'ensemble des points de mesure contigus présentant un décalage de tension inférieur à la valeur moyenne de la ligne de base l'entourant. Sur la figure 4.6, la hauteur de chaque colonne est associée à l'opposé de l'amplitude de chaque pic évaluée par rapport à la ligne de base. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de la distribution des points de mesure appartenant à un même pic.

¹¹5'-GCG TGC TTC ACC CAT CTC-3' synthétisé par MWG.

¹²Dans cette expérience, l'uniformité pourrait tout aussi bien être attribuée à l'utilisation d'une solution très concentrée d'oligonucléotides conduisant à la saturation du signal, qu'à celle de macrodépôts restant plus longtemps en incubation sur la surface. Il n'en reste pas moins que l'utilisation de macrogouttelettes, même de solutions moins concentrées, permet l'obtention de signaux beaucoup plus uniformes.

¹³Les structures utilisées comprennent aussi bien des réseaux de 96, 31 ou 29 transistors.

¹⁴Les oligonucléotides utilisés ont été soit 5'-CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT-3', soit 5'-CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC-3', synthétisés par Thermo Hybrid.

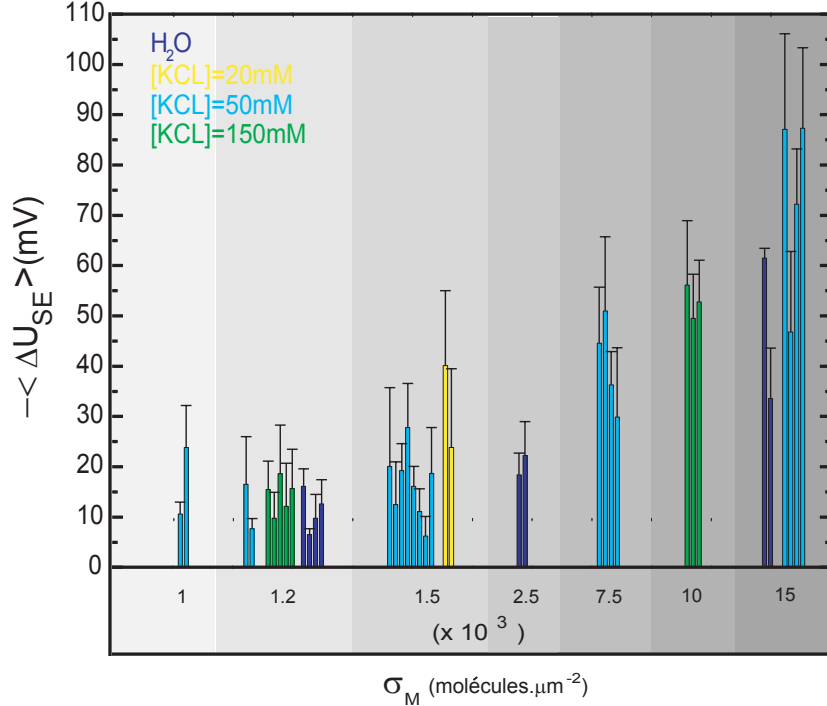


FIGURE 4.6: Opposé des variations moyennes de tension obtenues pour trente-huit microdépôts de solutions d'ADN réalisés avec le nanospotter GESIM, en fonction de la densité surfacique moyenne de molécules déposées, σ_M . Les couleurs des différentes colonnes sont associées à la concentration en sel des solutions d'ADN déposées (cf encart en haut, à gauche). Toutes les expériences représentées dans une zone de gris correspondent à la même valeur du paramètre σ_M , donné sous l'axe des abscisses. Toutes les analyses ont été effectuées pour le même point de fonctionnement ($U_{SD} = 1,2$ V ; $I_{SD} = 50$ μ A) et l'électrolyte de mesure utilisé a toujours été du KCl à 0,01 mM. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type des distributions des ΔU_{SE} associés aux transistors d'un même pic électronique.

Au cours de ces vingt-deux expériences, deux paramètres ont été variés : la quantité moyenne de molécules d'ADN déposée au sein de chaque microdépôt¹⁵ et la concentration en sel du solvant utilisé pour les dilutions des différentes solutions d'ADN¹⁶. Concernant le premier facteur, l'étude menée dans l'appendice B a montré que l'utilisation du nanospotter GESIM permet d'obtenir des microdépôts dont la surface S , exprimée en mm^2 , peut être reliée au nombre de gouttelettes projetées par la pointe¹⁷, b , par la relation : $S(\text{mm}^2) = 0,022 \times b^{\frac{2}{3}}$. En première approximation, la quantité moyenne de molécules déposées peut être évaluée en supposant une répartition uniforme des oligonucléotides sur toute la surface couverte par le microdépôt ; la densité surfacique moyenne associée, σ_M s'écrit alors :

¹⁵Il est possible de varier les quantités moyennes de molécules d'ADN déposées soit en changeant la concentration en oligonucléotides de la solution soit en réalisant, avec le nanospotter, des microdépôts de volumes différents. Lors des expériences présentées sur la figure 4.6, ces deux possibilités ont été utilisées.

¹⁶Les différentes solutions d'ADN déposées ont été obtenues par dilution d'une solution d'oligonucléotides mère, soit dans de l'eau déionisée, soit dans du KCl à 20 mM, 50 mM ou 150 mM, suivant les cas.

¹⁷Les microdépôts sont obtenus par projection d'un nombre préselectionné, b , de gouttelettes sur la surface. Le volume total d'un microdépôt, v , est alors $v = b \times v_0$ où v_0 désigne le volume d'une gouttelette (cf appendice B).

$$\sigma_M = \frac{cv_0N_A}{0,022}b^{\frac{1}{3}}$$

où c désigne la concentration en oligonucléotides de la solution déposée, b le nombre d'impulsions sélectionné, N_A la constante d'Avogadro, et v_0 le volume associé à une impulsion¹⁸. Sur la figure 4.6, tous les pics associés à une zone de gris correspondent à un même σ_M , évalué à partir de la formule précédente, dont la valeur est précisée sous l'axe des abscisses en molécules par μm^2 . Les solutions d'ADN ont été diluées soit dans de l'eau déionisée, soit dans des solutions de KCl de concentrations différentes. Le solvant utilisé est repérable par la couleur de la colonne, la correspondance étant donnée dans l'encart situé en haut à gauche.

Cette étude montre globalement une bonne reproductibilité de la détection de l'ADN en fonction de la quantité totale de molécules déposées. Les variations des signaux associés à une même valeur de σ_M sont à priori attribuables aux différences entre les réseaux utilisés ou aux inhomogénéités de répartition des molécules lors du séchage des microdépôts. L'influence respective des différents facteurs semble assez difficile à cerner. Des comparaisons entre plusieurs expériences menées en microdépôt sur une même structure, seront proposées au paragraphe suivant et permettront d'évaluer l'influence du premier facteur. Par ailleurs, les barres d'erreur, en moyenne de l'ordre de 25% du signal, sont relativement importantes et révèlent une distribution généralement très inhomogène des molécules au sein d'un microdépôt.

Sur le graphique 4.7, chaque point représente la moyenne des signaux électroniques de la figure 4.6, associés à un même σ_M et à un même solvant de dépôt (soit la moyenne des colonnes correspondant à une même zone de gris et à une même couleur). Le code de couleurs de la figure 4.6 a été conservé.

Dans cette étude, aucune influence notable de la concentration en sel du solvant de dépôt sur le signal électronique détecté ne semble pouvoir être mise en évidence, les courbes de différentes couleurs de la figure 4.7 présentant des comportements similaires.

4.2.2 Sensibilité de la détection d'ADN

Les expériences de la figure 4.6 fournissent une première estimation de la sensibilité associée à la détection d'ADN. En effet, en supposant en première approximation une variation linéaire de $\langle \Delta U_{SE} \rangle$ en fonction de la densité surfacique d'oligonucléotides, σ_M , un ajustement de l'ensemble des points du graphique 4.7 conduit à une augmentation (en valeur absolue) du signal électronique de l'ordre de 10 mV pour 3000 molécules déposées par μm^2 . Une statistique annexe effectuée sur douze microdépôts d'eau déionisée a, par ailleurs, permis de situer le seuil de détection autour de $10,3 \pm 6,2$ mV. Cette estimation apparaît cependant très globale puisqu'elle moyenne les variabilités entre structures différentes ainsi que les inhomogénéités de répartition des molécules d'ADN au sein des trente-huit microdépôts.

Afin de tenter de se départir de ce dernier aspect, une analyse a été effectuée en utilisant la fluorescence pour obtenir une évaluation du nombre moyen d'oligonucléotides présents sur la surface active de chacun des transistors d'un même réseau. Cette étude a permis d'obtenir une estima-

¹⁸Conformément à ce qui a été dit dans l'appendice B, la valeur de v_0 sera prise égale à 20 pL dans tout ce qui suit.

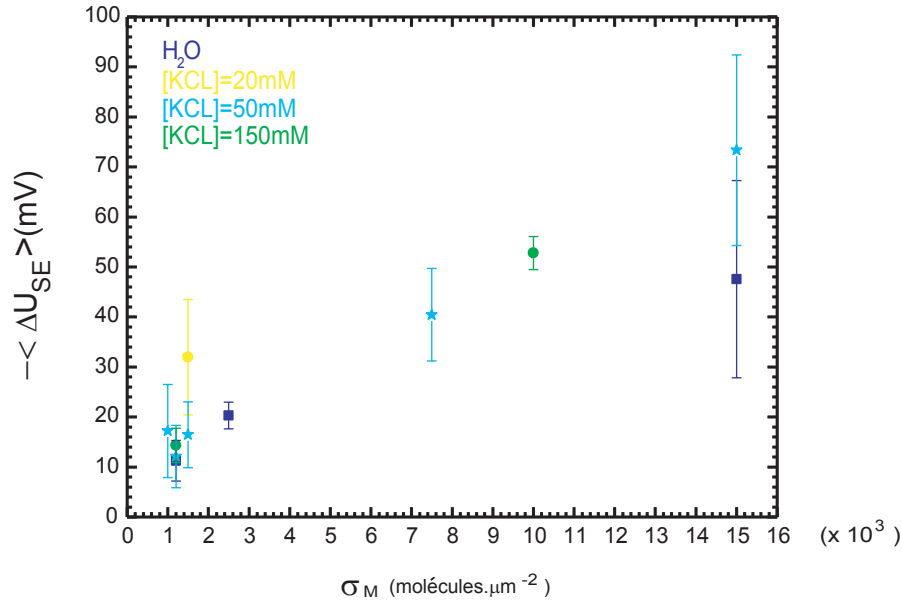


FIGURE 4.7: Evolutions moyennes des signaux électroniques de la figure 4.6 tracées en fonction de la densité surfacique moyenne déposée σ_M . Chaque point est calculé en moyennant l'ensemble des signaux obtenus lors des expériences de la figure 4.6, à σ_M et concentration en sel donnée.

tion "transistor par transistor" de la sensibilité électronique de la détection d'oligonucléotides en fonction de la densité surfacique moyenne d'ADN présente sur chacun des capteurs.

Mise en évidence de la désorption d'ADN lors de la mise en contact avec l'électrolyte de mesure ou le rinçage de la surface

La densité surfacique σ_M reflète la quantité de molécules d'ADN initialement déposée sur la surface des capteurs, avant immersion dans l'électrolyte de mesure ou d'éventuels rinçages des réseaux de transistors. Il est cependant important de distinguer entre la densité surfacique de molécules déposées initialement (σ_M) et la densité de molécules adsorbées, effectivement présentes sous l'électrolyte au moment de la mesure électronique. Il est probable qu'après immersion dans un bain, les molécules "mal fixées" s'échappent. Dans ces conditions, la densité de molécules adsorbées contribuant au signal électronique détecté peut s'écarter notablement de la densité initialement déposée. Cette section présente la première partie d'une étude "transistor par transistor" mettant en évidence l'existence de désorption lors de rinçages ou de l'immersion dans l'électrolyte de mesure. Cette expérience sera poursuivie dans la partie suivante afin de donner un ordre de grandeur de la sensibilité de la détection, non plus comme précédemment en fonction de la densité de molécules déposées initialement, mais de la concentration adsorbée.

La figure 4.8 présente les résultats obtenus lors d'une expérience effectuée sur une ligne de 96 transistors. Un fichier référence a été enregistré avec un électrolyte de chlorure de potassium de concentration 0,01 mM, après incubation globale dans la polylysine mais avant dépôt d'ADN. Six microgouttelettes d'une même solution d'oligonucléotides fluorescents¹⁹, dilués à 1 μM dans

¹⁹5'-Cy5-CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT-3', synthétisé par Thermohybrid.

l'eau, ont ensuite été réalisées sur le réseau à l'aide du nanopotter GESIM. Tous les dépôts ont été faits successivement en utilisant un unique jeu de paramètres électriques du spotter et en sélectionnant un même nombre d'impulsions $b = 10$. Conformément à l'étude menée dans l'appendice B, le volume total, v , associé à chacune des microdépôts, peut être évalué par la formule $v = bv_0$ et est de l'ordre de $v \sim 200$ pL. Immédiatement après la phase de dépôt d'ADN, un premier enregistrement de la fluorescence, par la suite appelé mesure Fluo 1, a été réalisé²⁰. La structure a ensuite été couverte par un électrolyte de KCl à 0,01 mM et une acquisition des caractéristiques des différents transistors lancée (mesure Elec). Le réseau a ensuite été rincé à l'eau déionisée, séché sous un jet d'air comprimé, puis un nouveau fichier de fluorescence (mesure Fluo 2) a été enregistré en utilisant des conditions d'excitation laser identiques à celles de la première mesure. Les résultats obtenus lors des différentes étapes sont présentés sur la figure 4.8.

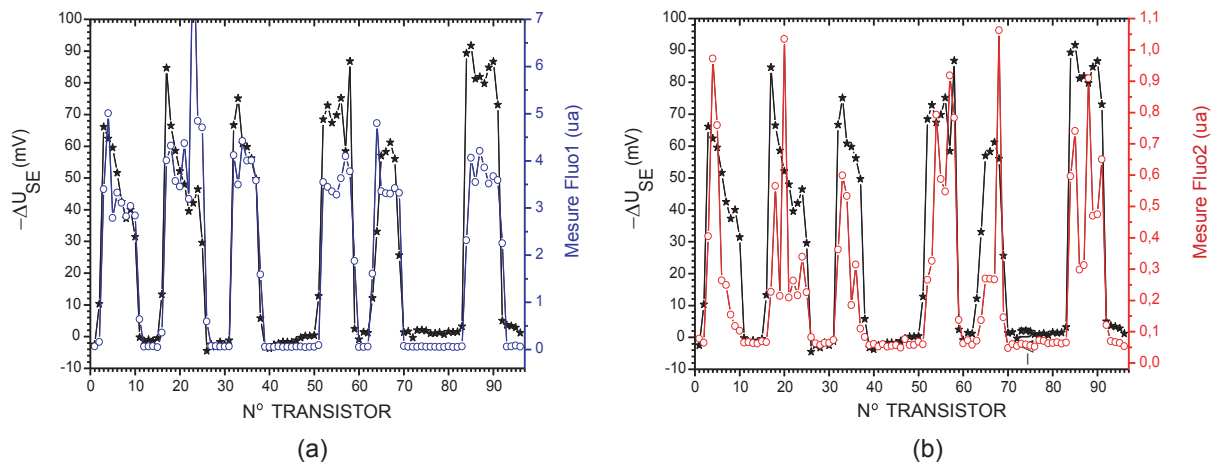


FIGURE 4.8: Variations de tension et intensités de fluorescence associées aux différents transistors d'un réseau sur lequel ont été déposés six microdépôts identiques d'une même solution d'oligonucléotides fluorescents (concentration $1 \mu M$, volumes correspondant à $b = 10$ impulsions). La mesure électronique de référence, avant dépôt d'ADN, et celle après dépôt (mesure Elec) ont été effectuées dans un électrolyte de KCl à 0,01 mM. Le point de fonctionnement utilisé pour l'analyse des données est ($U_{SD} = 1,2$ V ; $I_{SD} = 50 \mu A$).

(a) Etoiles noires, échelle verticale de gauche : opposé des variations de tension entre mesure Elec et la mesure de référence. Cercles bleus, échelle verticale de droite : mesure Fluo 1 correspondant à l'intensité de fluorescence moyenne (unité arbitraire), collectée sur les surfaces actives des différents transistors avant la mesure électronique.

(b) Etoiles noires, échelle verticale de gauche : mesure Elec. Cercles rouges, échelle verticale de droite : mesure Fluo 2 correspondant à l'intensité de fluorescence moyenne (même unité que sur la figure (a)), collectée sur les surfaces actives des différents transistors après la mesure électronique.

Les courbes de la figure 4.8.a montrent une détection reproductible des six microgouttelettes d'ADN, aussi bien en électronique qu'en fluorescence. La densité surfacique moyenne associée à chacun des dépôts, est de l'ordre²¹ de $\sigma_M \sim 5000$ molécules déposées par μm^2 . Cependant,

²⁰ Aucune étape de rinçage n'a eu lieu entre les dépôts et l'enregistrement Fluo 1.

²¹ Dans cette expérience, la pointe piezoélectrique utilisée pour déposer les microgouttelettes n'est pas celle qui a été testée dans l'appendice B. L'évaluation de la densité moléculaire moyenne a été effectuée en prenant un volume par impulsion de l'ordre de $v_0 \sim 20$ pL, fourni par le constructeur. La surface des dépôts a été estimée à partir du nombre moyen de transistors par pic électronique. La connaissance de l'espacement entre capteurs ($21 \mu m$) conduit à une surface de l'ordre de $2,2 \times 10^4 \mu m^2$. Pour comparaison, la surface couverte par une microgoutte

même si les six dépôts sont à priori caractérisés par des σ_M égaux, les moyennes des variations de tension associées aux différents pics s'étalent sur à peu près 30 mV. Par ailleurs, comme dans les expériences présentées précédemment, d'importantes inhomogénéités de la répartition des molécules au sein des différents microdépôts apparaissent.

L'intensité de fluorescence collectée sur les zones actives des différents FETs lors de la mesure Fluo 1, correspond à priori à la quantité de molécules présente initialement sur chaque transistor, puisque les microgouttelettes ont complètement séché sur la surface et qu'aucun rinçage n'a eu lieu. Cette mesure peut donc servir de référence pour déterminer la relation, $I = f(\sigma_M)$, existant entre l'intensité de fluorescence, I , et la densité surfacique moyenne d'ADN par transistor, σ_M . D'après les résultats de l'appendice B, il est possible de supposer une variation linéaire de la fonction $I = f(\sigma_M)$, qui peut alors être déterminée à partir de deux couples particuliers (I, σ_M). En première approximation, le signal de fluorescence obtenu sur les parties polylysine nue du réseau lors de la mesure Fluo 1 peut être associé à une densité nulle d'oligonucléotides. Afin de déterminer un autre couple de valeurs (I, σ_M), on peut associer la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence évaluée sur les différents pics (3,3 en unité arbitraire), à la densité surfacique correspondant à une répartition uniforme des molécules au sein de chaque microdépôt, soit $\sigma_M \sim 5000$ molécules par μm^2 . La relation $I = f(\sigma_M)$ supposée linéaire, est alors donnée par les deux couples ($I \simeq 0, \sigma_M \simeq 0$) et ($I \simeq 3,3, \sigma_M \simeq 5000$), ce qui conduit à l'équation : $I = 5,5 \times 10^{-4} \sigma_M$. Les mesures Fluo 1 et Fluo 2 ayant été effectuées dans les mêmes conditions d'excitation laser, cette expression reste valable pour les relevés de fluorescence obtenus lors de l'enregistrement Fluo 2 et permet donc la détermination du nombre moyen de molécules restant sur chaque transistor après enregistrement des caractéristiques et rinçage de l'électrolyte de mesure. Il est donc possible d'évaluer la déperdition de molécules ayant lieu lors du rinçage en traçant, pour chaque transistor, le rapport des intensités de fluorescence $\frac{I_{Fluo1}}{I_{Fluo2}}$. Ce graphique est présenté sur la figure 4.9.

Le graphique de la figure 4.9 fait apparaître d'importantes déperditions de molécules lors du rinçage. La distribution des rapports moyens, évalués sur les différents microdépôts, s'étalent²² entre 2,5 et 42,3, avec une moyenne de 12,5. Il apparaît donc que seulement un dixième des molécules initialement déposées sur la surface a été conservé après immersion dans le bain de mesure puis rinçage, et ce quasi indépendamment de la concentration surfacique initialement déposée. Cette analyse montre une influence importante du rinçage. La répartition des molécules sur les 96 transistors au moment de la mesure électronique est, à priori, ni reflétée par la mesure Fluo 1, ni par la mesure Fluo 2, mais plutôt "entre les deux". On peut raisonnablement penser que la première immersion dans le bain de mesure est l'étape au cours de laquelle le relargage des molécules d'ADN est le plus efficace. Lors des changements ultérieurs de l'électrolyte de mesure (rinçages), la perte de molécules devrait être plus faible. On peut donc supposer que la mesure Fluo 2 reflète la concentration de molécules adsorbées lors de la mesure électronique, alors que la mesure Fluo 1 donne la concentration de molécules déposées initialement.

Analyse "transistor par transistor"

de volume $v = 200$ pL supposée hémisphérique, est d'environ $10^4 \mu\text{m}^2$.

²²On peut également remarquer que sur les zones polylysine nue, le rapport reste de l'ordre de 1, le bruit de fond n'évolue donc pas avec le rinçage.

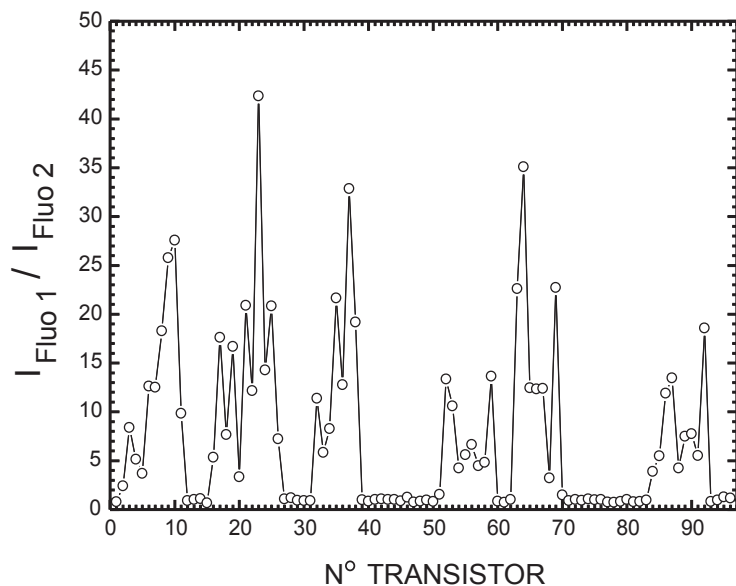


FIGURE 4.9: Rapport entre les intensités de fluorescence relevées lors de Fluo 1 et celles obtenues lors de Fluo 2, pour les 96 transistors du réseau.

Sous les hypothèses précédentes, une évaluation de la sensibilité de la détection d'ADN peut être effectuée en traçant les variations de tension ΔU_{SE} des différents FETs du réseau soit en fonction de l'intensité de fluorescence Fluo 1, reliée à la concentration surfacique initialement déposée, soit en fonction de l'intensité Fluo 2, reflétant la densité moléculaire moyenne présente sur les différents capteurs. Ces résultats sont présentés sur les graphiques 4.10.a et b.

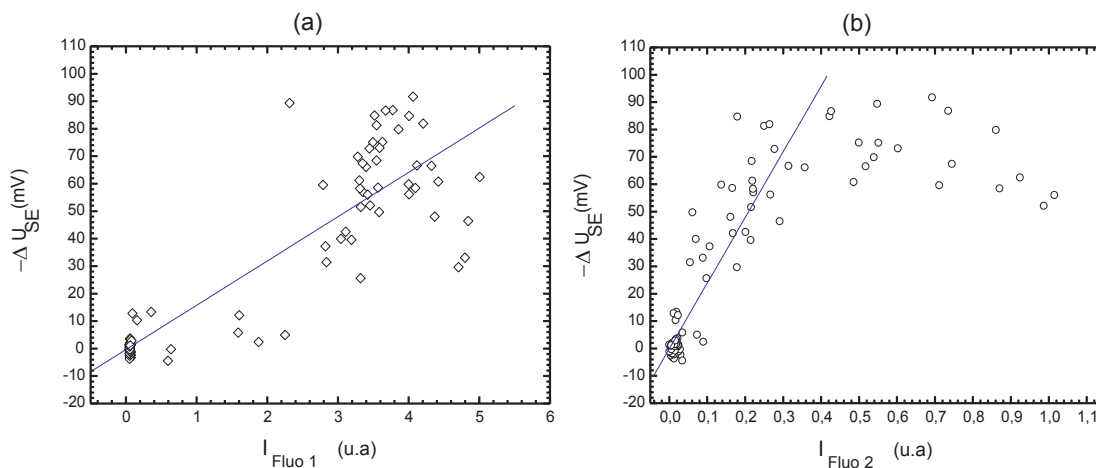


FIGURE 4.10: (a) : Opposé des variations de tension, $-\Delta U_{SE}$, des différents FETs du réseau étudié en fonction de l'intensité de fluorescence Fluo 1 (u.a). En bleu, régression linéaire réalisée sur l'ensemble des points de mesure. (b) : Opposé des variations de tension, $-\Delta U_{SE}$, des différents FETs du réseau étudié en fonction de l'intensité de fluorescence Fluo 2 (u.a). En bleu, régression linéaire réalisée sur l'ensemble des points de mesure appartenant à la zone non saturante (gamme $I_{Fluo2} < 0,45$ u.a).

Une régression linéaire, effectuée à partir de l'ensemble des points de la figure 4.10.a, conduit à une estimation²³ de la sensibilité de l'ordre de 10 mV pour 1000 molécules déposées par μm^2 (en valeur absolue). Cette valeur est cohérente avec l'ordre de grandeur déterminé au début du paragraphe 4.2.2. Le graphique 4.10.b fait apparaître deux comportements distincts. Une première zone où ΔU_{SE} augmente en valeur absolue en fonction de la densité moléculaire (gamme $I_{Fluo2} < 0,45$ u.a) et au delà, une saturation du signal électronique correspondant à des variations de tension comprises entre 60 mV et 100 mV. Une régression linéaire effectuée sur les points appartenant à la zone non-saturante, conduit à une variation de l'ordre de 10 mV pour 100 molécules adsorbées par μm^2 . Par ailleurs, la saturation correspond à des ΔU_{SE} de l'ordre de 100 mV, soit 1000 molécule adsorbées par μm^2 ou, en tenant compte de la déperdition de molécules évaluée à partir des deux mesures de fluorescence, 10000 molécules déposées par μm^2 . Dans la partie non-saturante de la courbe 4.10.b, on peut observer que pour une intensité de fluorescence donnée, donc à densité surfacique fixée, les variations de tension se répartissent sur ± 15 mV de part et d'autre de la droite figurant la régression linéaire. Ceci semble indiquer qu'un même nombre de molécules puisse être détecté dans une gamme de 30 mV, reflétant éventuellement des caractéristiques locales différentes de la couche de polylysine déposée sur les capteurs.

4.2.3 Conclusions

Différentes estimations menées indépendamment ont conduit à une évaluation de la sensibilité des capteurs en fonction du nombre de molécules initialement déposées, de l'ordre de 10 mV pour 1000 molécules (oligonucléotides de 20 bases) déposées par μm^2 , avec une saturation du signal électronique pour des concentrations surfaciques supérieures à 10^4 oligonucléotides déposés par μm^2 . Par ailleurs, l'expérience détaillée précédemment (paragraphe 4.2.2) a permis d'évaluer que seulement 10% des oligonucléotides initialement déposés sur la surface restent adsorbés sur la couche de polylysine après une première immersion dans un électrolyte de mesure puis un rinçage du réseau. En ce qui concerne la sensibilité de la détection électronique en fonction de la concentration surfacique d'oligonucléotides adsorbés sur la couche de polylysine au moment de la mesure électronique, il apparaît que les variations de tension sont proportionnelles au nombre moyen de molécules adsorbées tant que celui-ci reste inférieure à 1000 oligonucléotides par μm^2 , avec une variation de 10 mV pour 100 oligonucléotides adsorbées par μm^2 . Pour des concentrations surfaciques adsorbées supérieures à 1000 molécules par μm^2 , une saturation du signal est observable, ΔU_{SE} étant alors de l'ordre de 100 mV. Enfin, l'étude présentée dans l'appendice B a montré que l'intensité de fluorescence variait linéairement en fonction de la densité surfacique de molécules déposées dans la gamme $\sigma_M < 5 \times 10^4$ molécules par μm^2 . Au delà, une saturation du signal de fluorescence apparaît.

²³Cette estimation est réalisée en utilisant la relation $I = 5,5 \times 10^{-4} \sigma_M$ déterminée précédemment.

Chapitre 5

Influence de l'électrolyte de mesure sur la détection électronique

Parmi l'ensemble des paramètres influençant la détection d'ADN et de polylysine sur un réseau de transistors à effet de champ, la concentration en sel de l'électrolyte de mesure apparaît comme l'un des plus importants. En effet, la variation de tension engendrée par la présence de molécules chargées sur la surface d'oxyde de silicium ne dépend pas uniquement du nombre de charges apporté à l'interface électrolyte/oxyde, mais également de leur environnement. En particulier, la concentration de l'électrolyte de mesure influence la structure de la couche d'écrantage et donc la portée du champ électrique engendré par les biomolécules. Dans le cadre d'une détection électronique de l'hybridation, l'étude de ce facteur est très importante puisque les caractéristiques de la réaction de reconnaissance entre simples-brins complémentaires dépendent fortement de la concentration en sel du solvant dans lequel elle est effectuée (cf chapitre 7).

Ce chapitre ainsi que le suivant ont pour but d'exposer les différents résultats que nous avons obtenus concernant l'influence de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure sur la détection électronique. De manière générale, les expériences ont été réalisées sur des réseaux soit partiellement recouverts de polylysine, l'une des extrémités restant nue, soit préparés par incubation globale dans la polylysine puis dépôt d'une microgoutte d'oligonucléotides couvrant quelques capteurs. L'influence de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure sur les caractéristiques des transistors peut alors être évaluée en distinguant le comportement des différentes zones, appelées par la suite zone SiO₂, zone polylysine ou zone ADN suivant les cas. Le même protocole expérimental a toujours été suivi :

- acquisition d'un fichier de référence en utilisant un électrolyte de mesure de faible concentration en sel (généralement 10⁻⁵ M). Cet enregistrement est effectué avant dépôt de polylysine ou avant dépôt d'ADN suivant l'étude menée.
- Dépôt des solutions de polylysine ou d'ADN.
- Augmentation progressive de la concentration de l'électrolyte par ajouts successifs de solutions plus concentrées dans le bain de mesure. L'acquisition des caractéristiques des transistors à chaque étape permet alors l'étude des variations de tension des différentes

zones par comparaison à la référence.

Il s'est avéré que pour des concentrations de l'électrolyte de mesure inférieures¹ à quelques millimolaires environ, les zones polylysine et ADN suivent un comportement modélisable dans le cadre de la théorie de Gouy Chapman. Dans la gamme haut sel (concentrations de l'électrolyte supérieures à quelques millimolaires), il apparaît un phénomène baptisé "inversion de pics" sortant du cadre de cette théorie. Ce chapitre est consacré à la description du comportement des différentes zones en fonction de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure. Il a pour but de présenter les observations expérimentales, les méthodes d'analyse ainsi que les modèles théoriques que nous avons développés. La première partie présente une expérience réalisée avec deux micro-dépôts de polylysine déposés sur un réseau de transistors. Cet exemple permettra d'introduire les principales caractéristiques de l'influence de la concentration de l'électrolyte sur le comportement des zones SiO₂ et polylysine dans la gamme bas sel. Les évolutions des variations de tension en fonction de la concentration seront également comparées aux modèles unidimensionnels du système FET/électrolyte que nous avons développés. La seconde partie sera consacrée à la mise en évidence expérimentale et à la caractérisation du phénomène d'inversion de pics observé sur des réseaux partiellement recouverts de polylysine dans la gamme haut sel. Les études menées sur le comportement des zones ADN+polylysine sont regroupées dans la dernière partie de ce chapitre.

Toutes les expériences ont été menées avec un électrolyte de KCl et le traitement des données a été effectué pour le point de fonctionnement ($U_{SD} = 1,2$ V ; $I_{SD} = 50$ μ A).

5.1 Réseaux partiellement recouverts de polylysine dans la gamme bas sel

5.1.1 Observations expérimentales

La figure 5.1 présente les effets de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure sur la détection du signal associé à deux microdépôts de polylysine de concentration c_0 , déposés sur un réseau de 31 transistors.

Après nettoyage de la structure, une première acquisition des caractéristiques des transistors nus est effectuée en utilisant un électrolyte de chlorure de potassium de concentration 0,01 mM. Cette mesure servira de référence pour le calcul des variations de la tension U_{SE} dans toutes les étapes suivantes. Deux microdépôts de polylysine sont ensuite réalisés, couvrant chacun environ cinq transistors du réseau, puis la structure est rincée et séchée sous un jet d'air comprimé. Une seconde mesure dans le même électrolyte ($[KCl] = 0,01$ mM) est ensuite effectuée. Les variations de U_{SE} entre la mesure après dépôt et la mesure référence (première courbe en étoiles à partir du bas) font apparaître deux pics positifs (premier pic : moyenne des signaux des transistors 5 à 9 : 105 ± 8 mV, deuxième pic : transistors 23 à 26, moyenne = 88 ± 15 mV) associés aux deux dépôts de polylysine. Une solution concentrée de KCl est alors injectée² dans le bain de mesure afin

¹Cette gamme sera dans toute la suite appelée gamme bas sel.

²Lors de chaque ajout de solution plus concentrée dans le bain de mesure, une agitation par pipetage est effectuée afin d'homogénéiser le mélange.

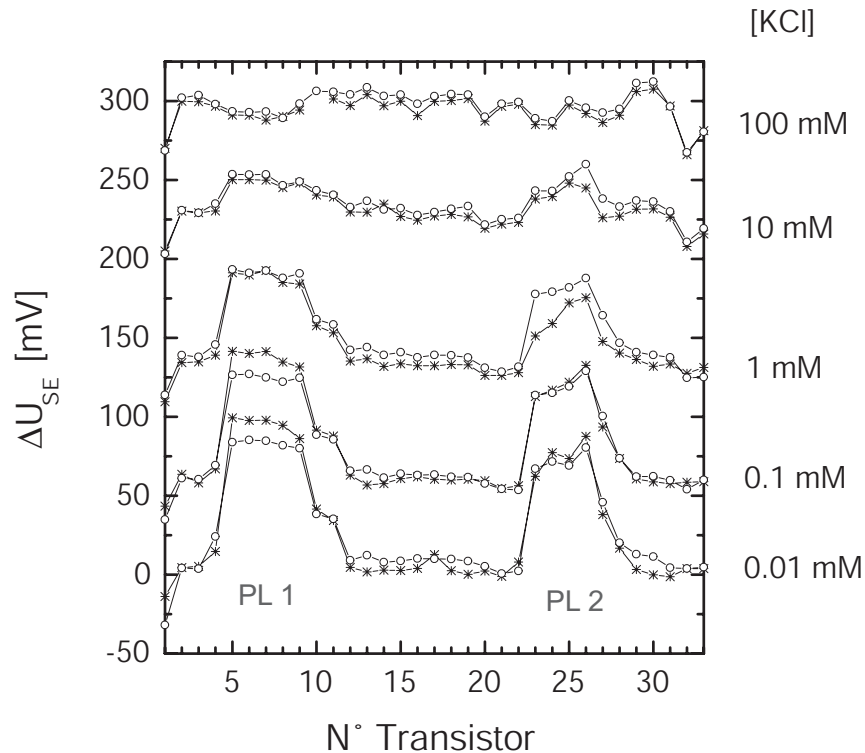


FIGURE 5.1: Effets de la variation de la concentration en sel d'un électrolyte de KCl sur la détection de deux microdépôts de polylysine de concentration c_0 . Les étoiles représentent la première série et les cercles la seconde. La référence correspond à un enregistrement effectué avant dépôt, dans un électrolyte $[KCl] = 0,01 \text{ mM}$.

d'obtenir une concentration finale en sel de $0,1 \text{ mM}$. L'acquisition du signal correspondant permet de tracer la variation de la tension U_{SE} par rapport à la mesure de référence (seconde courbe en étoile en partant du bas). Cette expérience a été poursuivie en augmentant la concentration en sel de l'électrolyte de mesure par décades jusqu'à 100 mM (courbes en étoiles). La structure a ensuite été rincée puis la manipulation recommencée en partant à nouveau d'une concentration initiale de $0,01 \text{ mM}$ en KCl. Les courbes correspondant à la deuxième phase de l'expérience sont représentées en cercles sur la figure 5.1.

Ces deux séries d'expériences montrent que l'augmentation de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure engendre un décalage positif global des courbes et une diminution de l'amplitude des pics de polylysine par rapport à la ligne de base constituée des transistors nus. Par ailleurs, on peut observer une bonne reproductibilité entre les deux séries : la superposition des courbes indique que le nombre de molécules de polylysine détecté est resté constant au cours de cette expérience et qu'aucune désorption de biopolymères, notamment lors du rinçage, n'a eu lieu. La diminution de l'amplitude des pics de polylysine apparaît donc corrélée à l'augmentation de la force ionique. On peut également remarquer sur les courbes obtenues dans $[KCl] = 100 \text{ mM}$, que la zone associée au microdépôt de gauche passe sous la ligne de base correspondant aux signaux des transistors nus. Ce phénomène d'inversion de pic, a été régulièrement observé et sera détaillé au paragraphe 5.2.

5.1.2 Modélisation des effets de sel : le modèle σ_{eff} constant

Une modélisation théorique unidimensionnelle³ de l'influence de la concentration de l'électrolyte de mesure sur le système FET/SiO₂/électrolyte est présentée dans l'appendice C. Cette description part de l'idée qu'à I_{SD} et U_{SD} fixés, le potentiel ϕ_0 de l'interface oxyde/électrolyte est constant. Dans ces conditions, les variations de la tension U_{SE} dues à l'apport de sel ne sont attribuables qu'à des modifications du saut de potentiel $\Delta\phi_{aq}$ entre l'interface oxyde/électrolyte et le corps métallique de l'électrode. En utilisant le modèle de la double couche électrochimique, il est possible de décrire l'interface SiO₂/électrolyte en prenant en compte une couche condensée de quelques angströms, modélisant la structure de l'interface, suivie d'une couche diffuse décrite par la théorie de Gouy-Chapman [75, 76]. La figure 5.2 résume les principales caractéristiques du modèle retenu.

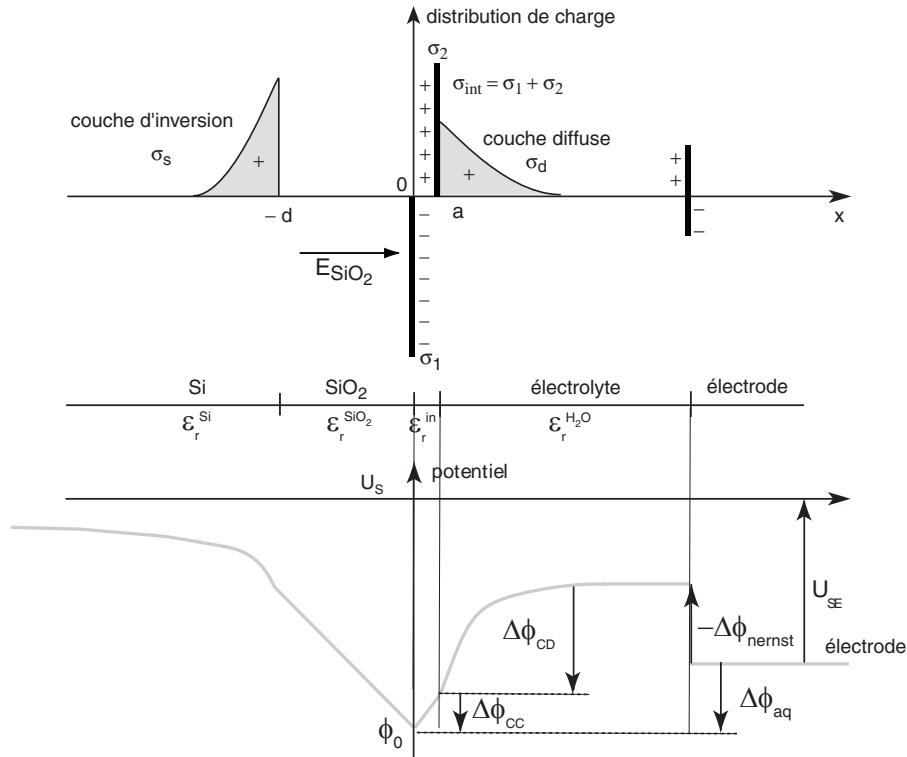


FIGURE 5.2: Modélisation unidimensionnelle du système FET/SiO₂ nu/électrolyte. L'axe x est orienté suivant la direction source/électrolyte/électrode. σ_S désigne la densité de charges de canal du transistor, σ_1 la densité de charges portée par l'interface SiO₂/électrolyte, σ_2 la densité de charges portée par le plan de Helmholtz et σ_d la densité de charges associée à la couche diffuse.

Le saut de potentiel entre le volume de l'électrolyte loin de la surface et le corps métallique de l'électrode s'exprimant comme l'opposé du potentiel de Nernst de l'électrode d'argent, $\Delta\phi_{aq}$

³Cette description modélise la tension source-électrode, U_{SE} , du système FET/SiO₂/électrolyte dans la direction perpendiculaire à la surface active des transistors. Aucune dépendance latérale de U_{SE} n'est prise en compte. Cette approximation est couramment admise dans les articles visant à décrire le couplage FET/électrolyte d'une structure EOSFET [74].

(différence de potentiel entre l'interface oxyde/électrolyte et le corps métallique de l'électrode) peut s'écrire :

$$\Delta\phi_{aq} = \Delta\phi_{CC} + \Delta\phi_{CD} - \Delta\phi_{Nernst} \quad (5.1)$$

où $\Delta\phi_{CC}$ désigne le saut de potentiel dans la couche condensée, $\Delta\phi_{CD}$, celui dans la couche de Gouy-Chapman et $\Delta\phi_{Nernst}$ le potentiel de Nernst de l'électrode Ag/AgCl. La tension source-électrode s'écrit alors (cf appendice C) pour une concentration $[Cl^-]$ de l'électrolyte de KCl :

$$U_{SE} = -(\phi_0) + \left(\frac{\sigma_1 + \sigma_S}{\epsilon_0 \epsilon_r^{in}} a\right) + \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-] 8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}}} \right) + \frac{kT}{e} \ln \left(\frac{a(Cl^-)}{a(Cl^-)_{PZC}} \right) \quad (5.2)$$

Cette expression fait intervenir quatre termes :

- le premier est le potentiel ϕ_0 de l'interface oxyde/électrolyte.
- Le deuxième correspond au saut de potentiel entre l'interface oxyde/électrolyte et le plan de Helmholtz.
- Le troisième est le potentiel de couche diffuse et est donné par la théorie de Gouy-Chapman. Il correspond au saut de potentiel entre un plan portant une densité de charge σ_{eff} et le volume de la solution de concentration $[Cl^-]$, loin de l'interface FET/électrolyte. σ_{eff} peut être défini comme la densité de charge vue par le début de la couche diffuse et inclut la charge de canal du transistor, σ_S , et la charge associée à l'interface FET/électrolyte, notée $\sigma_{int} = \sigma_1 + \sigma_2$. σ_{eff} s'écrit donc $\sigma_{eff} = \sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_S$.
- Le quatrième terme correspond à la différence de potentiel entre le volume de la solution et le corps métallique de l'électrode ; il est égal à l'opposé du potentiel de Nernst de l'électrode Ag/AgCl. La fonction $a(Cl^-)$ désigne l'activité des ions chlorure en solution [75] et $a(Cl^-)_{PZC}$, l'activité au point de charge zéro. Dans la limite des basses concentrations en sel, $a(Cl^-) = [Cl^-]$.

Cette description prévoit qu'à I_{SD} et U_{SD} fixés, un changement de la concentration ionique de $[Cl^-]_{ref}$ à $[Cl^-]$, engendre une variation de la tension U_{SE} , évaluée par rapport à la mesure de référence, de la forme (cf appendice C) :

$$\Delta U_{SE} = U_{SE}^{sel} - U_{SE}^{ref} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O} [Cl^-]}} \right) + \frac{kT}{e} \ln (a(Cl^-)) + C \quad (5.3)$$

Cette équation, qui sera appelée par la suite équation du modèle charge effective constante, fait intervenir deux paramètres : la quantité σ_{eff} , supposée indépendante de la concentration en

sel de l'électrolyte de mesure dans cette description⁴ et la constante C, contenant les différences de potentiel de Nernst et de couche diffuse associées à l'électrolyte de concentration $[Cl^-]_{ref}$.

L'équation 5.3 du modèle charge effective constante correspond à la description de l'interface FET/SiO₂/électrolyte. Dans la situation où des biopolymères ont été déposés sur la couche d'oxyde de silicium, la principale difficulté d'une modélisation du système réside dans la description de la couche condensée oxyde/biopolymères/électrolyte au voisinage de la surface, conduisant à une réécriture du saut de potentiel $\Delta\phi_{CC}$ associé. Cependant, tant que les effets liés à la variation de la concentration en sel de l'électrolyte restent essentiellement localisés dans la couche diffuse et n'ont qu'une influence faible sur $\Delta\phi_{CC}$, il sera possible de modéliser la couche condensée par une charge d'interface σ_{int} constante, contribuant à la charge σ_{eff} ressentie par le début de la couche de Gouy-Chapman. Dans ce cas, les différents termes liés à la modélisation de $\Delta\phi_{CC}$, peu sensibles aux variations de concentration en sel du bain de mesure, peuvent être reportés dans la constante⁵ C. Dans ces conditions, lorsque des biopolymères ont été déposés sur la couche d'oxyde, une modélisation particulièrement simple consiste à garder l'expression 5.3 du modèle charge effective constante, en faisant évoluer σ_{eff} et C du fait de la présence de biomolécules à l'interface oxyde/électrolyte.

De manière générale, l'obtention d'un ajustement correct des courbes expérimentales $\Delta U_{SE} = f([KCl])$ par l'équation 5.3, semble indiquer que les effets d'écrantage sont essentiellement localisés dans la couche diffuse et correspondent à la diminution de la longueur de Debye dans

⁴Dans cette modélisation, les paramètres σ_1 , σ_2 et σ_S sont supposés indépendants de la concentration de l'électrolyte de mesure. Un changement de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure de $[Cl^-]_{Ref}$ à $[Cl^-]_{Sel}$ n'entraîne donc pas de modification de σ_{eff} (soit $\sigma_{eff}^{Sel} = \sigma_{eff}^{Ref}$) et pas de modification du potentiel de couche condensée (soit $\Delta\phi_{CC}^{Sel} = \Delta\phi_{CC}^{Ref}$).

⁵L'étude de l'influence de la concentration en sel de l'électrolyte sur les zones ADN et polylysine a été menée en mesurant les variations de tension entre des enregistrements effectués après dépôt de biopolymères, pour différentes concentrations de l'électrolyte, et une même acquisition référence, correspondant à la situation avant dépôt. Dans le cadre du modèle, à I_{SD} et U_{SD} fixés, la tension $U_{SE}^{après}$, associée à une mesure quelconque après dépôt, peut s'écrire en toute généralité :

$$U_{SE}^{après} = \Delta\phi_{CC}^{après} + \Delta\phi_{GC}^{après} - \Delta\phi_{Nernst}^{après} \quad (5.4)$$

La différence de tension ($U_{SE}^{après} - U_{SE}^{ref}$) s'exprime alors :

$$(U_{SE}^{après} - U_{SE}^{ref}) = [\Delta\phi_{CC}^{après} + \Delta\phi_{GC}^{après} - \Delta\phi_{Nernst}^{après}] - [\Delta\phi_{CC}^{ref} + \Delta\phi_{GC}^{ref} - \Delta\phi_{Nernst}^{ref}] \quad (5.5)$$

Tant que les variations de la concentration en sel de l'électrolyte n'influent que très peu sur le terme $\Delta\phi_{CC}^{après}$, il est toujours possible de réécrire ΔU_{SE} sous la forme :

$$(U_{SE}^{après} - U_{SE}^{ref}) = \Delta\phi_{GC}^{après} - \Delta\phi_{Nernst}^{après} + C \quad (5.6)$$

en ne conservant apparent que les termes dépendant explicitement de la concentration de l'électrolyte $[Cl^-]_{après}$ et en reportant tous les autres dans la constante C. Un raisonnement analogue à celui détaillé dans l'appendice C, conduit alors à l'expression :

$$(U_{SE}^{après} - U_{SE}^{ref}) = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}^{après}}{\sqrt{8kT\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}[Cl^-]_{après}}} \right) + \frac{kT}{e} \ln(a(Cl^-)_{après}) + C \quad (5.7)$$

où $\sigma_{eff}^{après}$ désigne la charge effective vue par le début de la couche diffuse, en présence d'une couche de biopolymères déposée sur la surface d'oxyde. Il est à noter que dans le corps de texte, la notation Δ désigne aussi bien les variations du type mesure après dépôt-mesure avant dépôt (dans $\Delta U_{SE} = (U_{SE}^{après} - U_{SE}^{ref})$ par exemple), que les sauts de potentiel entre deux plans de charges (dans $\Delta\phi_{CC}$ par exemple).

l'électrolyte. Cependant, même dans le cas d'un bon accord théorie-expérience, il apparaît difficile de déterminer avec précision l'origine des différentes contributions. Il serait par exemple possible que des modifications dans la couche condensée puissent engendrer des variations de potentiel ayant une forme analogue à celle de l'équation 5.3.

5.1.3 Ajustement des courbes $\Delta U_{SE} = f([KCl])$ par le modèle σ_{eff} constant

L'ajustement des résultats expérimentaux par le modèle σ_{eff} constant a été effectué en moyennant pour chaque concentration de l'électrolyte de mesure, les variations de tension associées aux différentes zones du système étudié. Pour chacune des courbes de la figure 5.1, trois régions ont été distinguées : le premier pic de polylysine (PL₁, transistors 5 à 9), le deuxième pic de polylysine (PL₂, transistors 23 à 26) et la surface d'oxyde de silicium nue (SiO₂, transistors 2,3, 12 à 21, 30 et 31). La détermination des moyennes des variations de tension sur chacune de ces régions permet de tracer, pour chaque série d'expériences, les courbes représentées par des points sur les figures 5.3.a et 5.3.b. Cette analyse peut alors être directement comparée au modèle théorique σ_{eff} constant en ajustant les paramètres σ_{eff} et C de l'équation 5.3 avec le logiciel Origin.

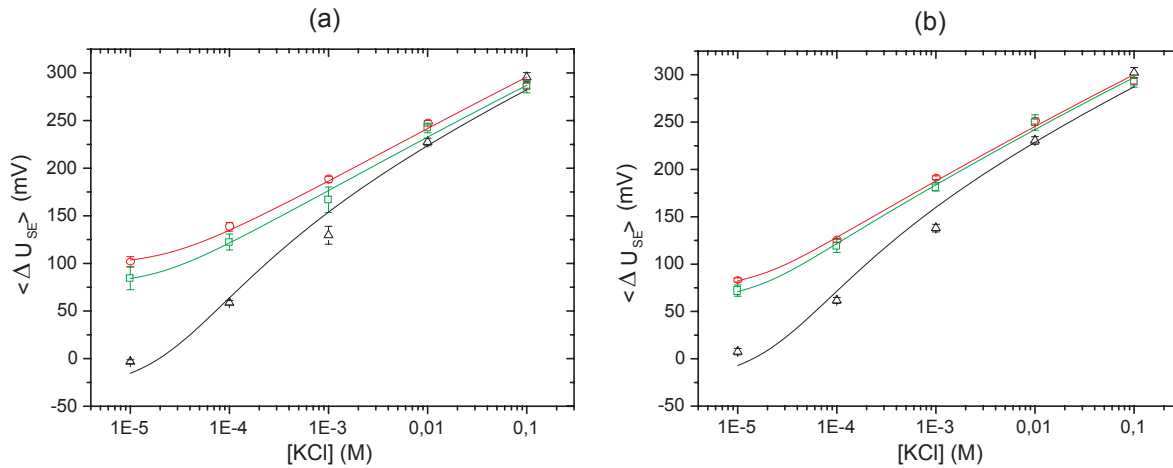


FIGURE 5.3: **(a) : Première série en sel** : moyennes et ajustements par le modèle σ_{eff} constant, des variations de tension associées aux zones polylysine (en rouge PL₁, en vert PL₂) et SiO₂ (en noir) de la première série en sel de l'expérience 5.1. Les définitions des régions PL₁, PL₂ et SiO₂ sont précisées dans le texte. **(b) : Deuxième série en sel** : moyennes et ajustements par le modèle σ_{eff} constant, des variations de tension associées aux zones polylysine (rouge) et SiO₂ (noir) de la deuxième série en sel de l'expérience 5.1.

Pour chaque zone, les ajustements obtenus sont tracés en traits continus sur les figures 5.3.a et b, et les valeurs de σ_{eff} et C associées sont reportées dans le tableau 5.1.

Concernant les zones polylysine, les figures 5.3.a et 5.3.b montrent que l'équation 5.3 semble modéliser correctement les variations de tension jusqu'à des concentrations d'environ 10mM. Dans cette gamme, ces résultats indiquent globalement que les effets liés à la concentration en sel de l'électrolyte de mesure sont essentiellement localisés dans la couche de Gouy-Chapman et que le saut de potentiel dans la couche condensée semble peu sensible aux effets de sel. Pour ce qui est

zones	Première série en sel		Deuxième série sel	
	σ_{eff} (C/m^2)	C (mV)	σ_{eff} (C/m^2)	C (mV)
Surface "nue" : SiO₂	(-14 ± 0.6).10⁻⁴	350 ± 12	(-13 ± 0.6).10⁻⁴	354 ± 13
Pic de polylysine : PL₁	(2 ± 0.9).10⁻⁴	361 ± 4	(-0.6 ± 0.7).10⁻⁴	366 ± 4
Pic de polylysine : PL₂	(0.9 ± 1).10⁻⁴	352 ± 5	(-1.5 ± 0.7).10⁻⁴	363 ± 3

TABLEAU 5.1: Paramètres σ_{eff} et C correspondant aux ajustements, par l'expression (C.10), des évolutions des variations de tension moyennes des figures 5.3.a et 5.3.b.

des zones SiO₂ nu, les ajustements apparaissent en revanche moins satisfaisants. Une description plus fine de l'interface oxyde de silicium/électrolyte sera présentée au paragraphe 5.1.4. Il est par ailleurs intéressant de constater que, d'après les résultats des ajustements du tableau 5.1, les valeurs des constantes C sont toutes du même ordre de grandeur et qu'aucune différence significative n'apparaît lorsque l'on compare les zones SiO₂ et les zones polylysine. L'adsorption de polylysine ne se traduit donc pas par une modification du saut de potentiel dans la couche condensée, mais plutôt par une variation de la charge effective. Les valeurs de σ_{eff} obtenues pour les surfaces d'oxyde recouvertes de polylysine, légèrement positives pour la première série (0.9 et $2 \times 10^{-4} C.m^{-2}$) et légèrement négatives pour la seconde série (-0.6 et $-1.5 \times 10^{-4} C.m^{-2}$), sont un ordre de grandeur plus petites (en valeur absolue) que celles de la surface nue (charge effective négative : -14 et $-13 \times 10^{-4} C.m^{-2}$). Il semblerait donc que l'adsorption de biopolymères tende à neutraliser la charge effective du système, voir à légèrement la surcompensée. Cet aspect sera développé au chapitre suivant.

Plusieurs expériences montrant des effets similaires ont été réalisées. Concernant les zones SiO₂, une évaluation sur huit manipulations donne un σ_{eff} moyen de $-1,3 \times 10^{-3} \pm 1,2 \times 10^{-4} C.m^{-2}$. Des études chimiques montrent que cette charge négative résulte de la présence de groupements silanol ionisés et dépend de manière importante de la concentration en sel de l'électrolyte [77]. Pour ce qui est des ajustements des variations de tension moyennes obtenues sur les zones polylysine, sur quinze expériences, les σ_{eff} trouvés valent en moyenne $2 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-5} C.m^{-2}$, confirmant une adsorption de polymères jusqu'à neutralisation ou légère surcompensation de la charge de surface.

5.1.4 Modélisation de l'interface SiO₂/électrolyte avec un paramètre σ_{eff} variable

Sur les figures 5.3.a et 5.3.b, les ajustements par le modèle σ_{eff} constant des résultats associés aux zones SiO₂ n'apparaissent pas très satisfaisants. Cette constatation s'avère assez générale et nous a amenés à essayer de mieux rendre compte des évolutions des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([KCl])$ dans le cas des surfaces nues d'oxyde de silicium. Ce paragraphe présente une modélisation plus générale de l'interface FET/SiO₂/électrolyte, prenant en compte une variation de la charge de surface de l'interface SiO₂/électrolyte en fonction de la concentration en ions chlorure.

Observations expérimentales

Les figures 5.4.a et 5.4.b présentent deux séries de variations de la concentration de l'électrolyte de mesure, effectuées sur différents réseaux nus de 29 transistors. Le fichier de référence correspond à un enregistrement effectué à une concentration de $[KCl] = 5 \times 10^{-6} M$.

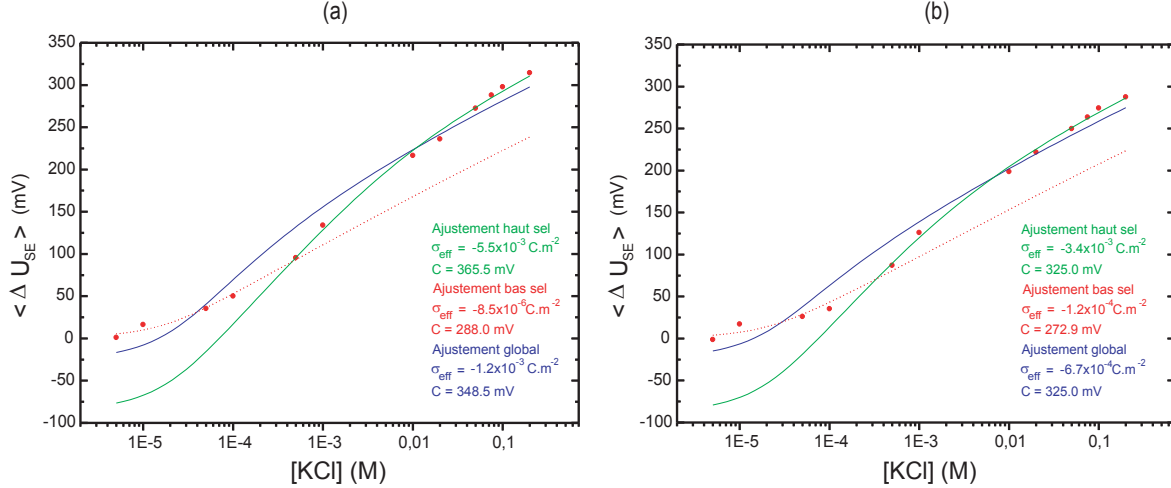


FIGURE 5.4: Variations de tension moyennes de deux réseaux différents de 29 transistors nus, lors de l'augmentation de la concentration en sel d'un électrolyte de KCl. Dans les deux cas, la référence correspond à un enregistrement dans $[\text{KCl}] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$. Pour les figures (a) et (b) : points rouges : mesures expérimentales, traits pointillés rouges : ajustement de la zone bas sel par le modèle σ_{eff} constant, ligne verte : ajustement de la zone haut sel, ligne bleue : ajustement global.

L'augmentation du nombre de mesures à différentes concentrations en KCl, permet d'obtenir une meilleure définition des courbes et d'ajuster les résultats avec le modèle σ_{eff} constant en prenant en compte : soit tous les points expérimentaux (ajustement global), soit ceux appartenant à la région bas sel (concentrations inférieures à $5 \times 10^{-3} \text{ M}$), soit à la région haut sel (concentrations supérieures à $5 \times 10^{-3} \text{ M}$). Les ajustements donnent des valeurs de σ_{eff} négatives, systématiquement plus petites (en valeur absolue) dans la région bas sel que dans la région haut sel, les σ_{eff} associés aux ajustements globaux étant toujours compris entre ces deux valeurs. Le tableau 5.2 résume les valeurs moyennes des paramètres σ_{eff} et C , obtenues en ajustant dans les différentes gammes, les résultats de huit expériences effectuées sur des réseaux nus (zones SiO_2).

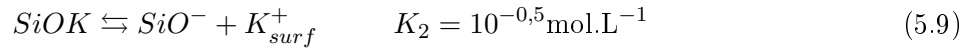
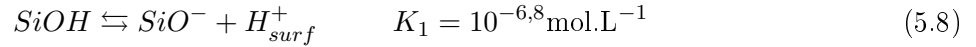
	σ_{eff} (C.m^{-2})	C (mV)
Ajustement bas sel	$-1,8 \times 10^{-4} \pm 1,6 \times 10^{-4}$	$295,8 \pm 16 \text{ mV}$
Ajustement haut sel	$-33 \times 10^{-4} \pm 1,5 \times 10^{-4}$	$346,6 \pm 19 \text{ mV}$
Ajustement global	$-13 \times 10^{-4} \pm 4,18 \times 10^{-4}$	$331,7 \pm 15 \text{ mV}$

TABLEAU 5.2: Valeurs moyennes des paramètres σ_{eff} et C , obtenues en ajustant dans les différentes gammes, les résultats de huit expériences de variation en sel effectuées sur différents réseaux nus de transistors.

Ces résultats indiquent l'existence d'une augmentation (en valeur absolue) de la charge de surface de l'oxyde de silicium en fonction de la quantité de sel introduite dans le bain de mesure, ainsi que des variations relativement importantes du paramètre C entre les différents types d'ajustements. Ces évolutions tendent à refléter des modifications de la couche condensée. Afin de rendre compte de ce phénomène, nous avons essayé d'améliorer le modèle σ_{eff} constant en introduisant différents équilibres chimiques intervenant dans la description de la charge de l'interface SiO_2 /électrolyte de KCl.

Modélisation de l'interface SiO₂/électrolyte avec un paramètre σ_{eff} variable

Le modèle σ_{eff} constant développé de manière détaillée dans l'appendice C et décrit au paragraphe 5.1.2, a été dérivé en faisant intervenir deux plans de charges : le plan SiO₂/électrolyte, associé à la densité surfacique de charge σ_1 et le plan de Helmholtz (première couche de solvation) décrit par σ_2 . Malgré les variations du paramètre C observées précédemment, il semble que les modifications physiques de la couche condensée puissent en première approximation, être globalement reproduites par une modification du paramètre σ_{eff} . Sous ces hypothèses, une description fine de type double couche de la zone d'interface n'apparaît pas nécessaire. Dans ce paragraphe, la modélisation a été simplifiée en assimilant la couche condensée à un unique plan de charges, caractérisé par une densité de charges σ_{int} , immédiatement suivi de la couche diffuse. La différence entre ce modèle et le modèle σ_{eff} constant porte sur la prise en compte des propriétés chimiques d'une surface de SiO₂ en contact avec un électrolyte de KCl, induisant des variations de σ_{int} en fonction de la concentration de l'électrolyte de KCl utilisé lors de la mesure. Cette description est présentée en détail dans le dernier paragraphe de l'appendice C. Il apparaît qu'il est possible en première approximation, de modéliser l'évolution de la charge de surface, σ_{int} , en introduisant les équilibres chimiques :



Les charges d'interface σ_{int} et effective $\sigma_{eff} = \sigma_{int} + \sigma_S$ (σ_S désignant la densité surfacique de charges du canal source-drain) s'écrivent alors :

$$\sigma_{int} = -e([SiO^-]) \quad (5.10)$$

$$\sigma_{eff}([KCl]) = \sigma_{int}([KCl]) + \sigma_S \quad (5.11)$$

où σ_S représente la densité surfacique de charges de canal du transistor. Le couplage de ces différentes équations avec la relation de Boltzmann, ainsi que la relation de fermeture :

$$N_S = [SiO^-] + [SiOH] + [SiOK] \quad (5.12)$$

dans laquelle N_S désigne la densité surfacique totale de sites pouvant participer aux équilibres chimiques 5.8 et 5.9, conduit à l'équation finale :

$$\ln\left[\frac{eN_S}{\sigma_S - \sigma_{eff}} - 1\right] = -2Ash\left(\frac{8,4 \times \sigma_{eff}}{\sqrt{[K^+]_\infty}}\right) + \ln\left[\frac{10^{-pH}}{K_1} + \frac{[K^+]_\infty}{K_2}\right] \quad (5.13)$$

qui définit intrinsèquement la valeur de σ_{eff} en fonction de la concentration de l'électrolyte de KCl.

La résolution numérique de cette équation donne l'allure de la variation de $\sigma_{eff} = f([KCl])$ en fonction des paramètres K_1 , K_2 , N_S , de la charge du canal ⁶ σ_S et du pH.

La figure 5.5 représente l'évolution de σ_{eff} obtenue par résolution numérique de l'équation 5.13, en utilisant les valeurs "nominales" [77] des paramètres (cf appendice C) : $K_1 = 10^{-6,8}$, $K_2 = 10^{-0,5}$, $N_S = 5 \times 10^{18} \text{ m}^{-2}$, $\sigma_S = 0$ et pH = 7.

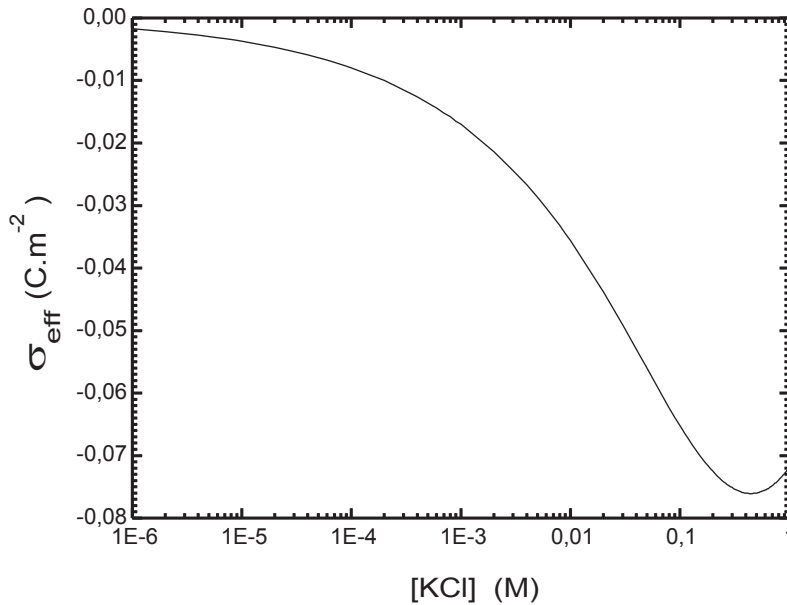


FIGURE 5.5: Simulation de l'évolution de σ_{eff} en fonction de la concentration de l'électrolyte de mesure de KCl, obtenue à partir de la résolution numérique de l'équation 5.13. Les valeurs des différents paramètres utilisées sont : $K_1 = 10^{-6,8}$, $K_2 = 10^{-0,5}$, $N_S = 5 \times 10^{18} \text{ m}^{-2}$, $\sigma_S = 0$ et pH = 7.

La courbe observée sur la figure 5.5 est en relativement bon accord avec les mesures expérimentales rapportées dans [77] et présente les effets attendus. Via l'équilibre 5.9, l'augmentation de la concentration en KCl aurait tendance à diminuer le nombre de groupements siloxane (SiO^-) et donc à neutraliser la surface, conduisant à une diminution (en valeur absolue) de la charge d'interface⁷ négative. Cependant, cette réaction ne commence à intervenir que pour des

⁶La charge du canal a été considérée comme un paramètre ajustable du modèle, indépendant de la concentration en sel de l'électrolyte. La comparaison aux données expérimentales montrera qu'elle semble, de toute façon, négligeable devant $|\sigma_{int}|$.

⁷La charge de canal étant prise égale à zéro, σ_{eff} est équivalent à σ_{int} .

concentrations en KCl supérieures à quelques centaines de millimolaires⁸. Cette tendance est observée sur la partie haut sel de la courbe numérique (cf figure 5.5), présentant un minimum puis une augmentation de σ_{eff} . Pour des concentrations de l'électrolyte inférieures à 100 mM, seul l'équilibre 5.8 intervient. Le comportement de σ_{eff} dans ce domaine, peut être compris qualitativement à partir de l'équation de Boltzmann permettant de relier les concentrations proches de la surface (indiquées par $>$) et les concentrations en volume (indiquées par ∞), loin de l'interface : $\frac{[H^+]>}{[H^+]_\infty} = \frac{[K^+]>}{[K^+]_\infty} = e^{\frac{-e(\phi_0 - \phi_\infty)}{kT}}$, dans laquelle $(\phi_0 - \phi_\infty)$ désigne la différence de potentiel entre la surface du transistor et le volume de l'électrolyte. Cette expression met en évidence qu'une augmentation de la concentration en KCl entraîne une variation du saut de potentiel $|\phi_0 - \phi_\infty|$ et modifie la répartition des ions H^+ entre la surface et le volume de la solution. Dans la partie très faible sel, le terme $|\phi_0 - \phi_\infty|$ est très grand et les ions H^+ sont essentiellement localisés sur l'interface, ce qui conduit à une valeur de σ_{eff} petite (en valeur absolue). Lorsque KCl augmente, $|\phi_0 - \phi_\infty|$ diminue et les ions H^+ s'équilibrent petit à petit entre la surface et le volume, induisant une diminution de σ_{eff} observée sur la figure 5.5. Lorsque la répartition des ions dans la solution tend à devenir uniforme, l'introduction supplémentaire de sel dans le bain de mesure n'engendre plus de variations significatives de $|\phi_0 - \phi_\infty|$ et σ_{eff} reste localement constant, avant que l'équilibre 5.9 ne commence à intervenir. Sur la plus grande partie de la gamme de concentration, les ions K^+ ne commandent pas la variation de σ_{eff} via l'équilibre 5.9, mais via la différence de potentiel $|\phi_0 - \phi_\infty|$ qui gouverne l'association H^+/SiO^- .

Pour un jeu de paramètres ($K_1, K_2, N_S, \sigma_S, pH$) donné, et pour chaque concentration en KCl, il est possible de résoudre numériquement l'équation 5.13 et d'obtenir les valeurs numériques de σ_{eff} . La réintroduction de ces solutions dans l'expression :

$$\Delta U_{SE} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{8kT\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}[Cl^-]}} \right) + \frac{kT}{e} \ln(a(Cl^-)) + C \quad (5.14)$$

permet de simuler l'allure des courbes $\Delta U_{SE} = f([KCl])$ et de les comparer aux expériences effectuées sur le SiO_2 nu. Les calculs ont été automatisés par un programme écrit sous CVI et les comparaisons théorie-expérience ont été effectuées en essayant d'ajuster au mieux les paramètres du modèle afin d'obtenir une courbe numérique $\Delta U_{SE} = f([KCl])$ aussi proche que possible des données expérimentales. Afin de conserver un sens à la simulation, le nombre de paramètres a été réduit : K_1, K_2 ont systématiquement été pris égaux aux valeurs nominales ($K_1 = 10^{-6,8}$ et $K_2 = 10^{-0,5}$, cf [77] et appendice C) et σ_S fixé à 0. L'ajustement n'est alors effectué qu'en variant N_S, C et le⁹ pH. Les figures 5.6.a et 5.6.b montrent la comparaison entre données expérimentales, ajustement par le modèle σ_{eff} constant et simulation numérique prenant en compte la variation de la charge d'interface du SiO_2 , pour les expériences déjà présentées sur les figures 5.4.a et b.

Une méthode numérique permettrait sans doute d'optimiser les procédures d'ajustement entre simulations et données expérimentales. Cependant, l'introduction de la dépendance de la charge

⁸La définition de K_2 : $K_2 = \frac{[SiO^-][K^+]>}{[SiOK]} = 10^{-0,5}$, conduit à $[SiO^-] = [SiOK]$ pour $[K^+]> = 10^{-0,5} \sim 300$ mM. L'influence de K_2 sur la charge de surface ne commence donc à intervenir que pour des concentrations en $[KCl]$ supérieures à une centaine de millimolaire.

⁹Le pH est ici considéré comme un paramètre de contrôle. L'obtention d'ajustements corrects avec des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 7 assure une certaine pertinence de la simulation.

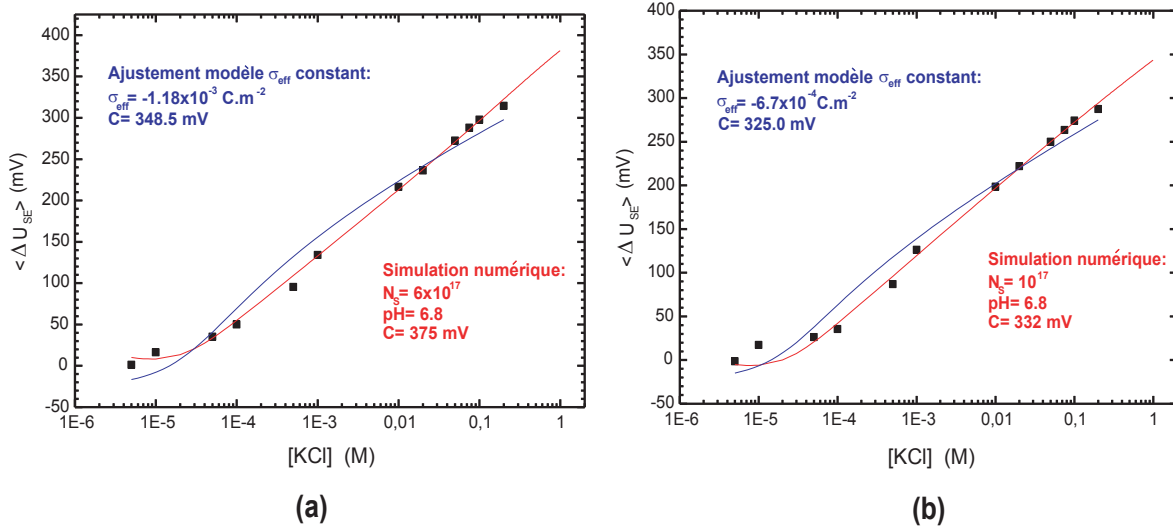


FIGURE 5.6: Comparaison entre données expérimentales, ajustement par le modèle σ_{eff} constant et simulation numérique prenant en compte la variation de la charge d'interface du SiO_2 . (a) Données expérimentales correspondant à la figure 5.4.a. (b) Données expérimentales correspondant à la figure 5.4.b. Les valeurs des différents paramètres utilisés sont précisées sur les graphiques ; K_1 , K_2 et σ_S ayant été pris égaux à respectivement : $10^{-6,8}$, $10^{-0,5}$ et 0.

d'interface de l'oxyde de silicium en fonction de la concentration de l'électrolyte de mesure, décrit globalement mieux l'évolution des courbes expérimentales que le modèle σ_{eff} constant. Il est intéressant de constater que l'utilisation des valeurs de K_1 et K_2 couramment admises dans la littérature [77], permet une description correcte du système FET/ SiO_2 /électrolyte moyennant essentiellement un ajustement du paramètre N_S . En effet, sur une série de huit expériences, il a été systématiquement possible d'obtenir des simulations satisfaisantes avec des valeurs de N_S égales en moyenne à $1,95 \times 10^{17} \pm 7,2 \times 10^{16} \text{ m}^{-2}$ et des pH compris entre 6,5 et 6,8. Cela indique une bonne cohérence des résultats. En particulier, pour toutes les structures de transistors utilisées, N_S est environ un ordre de grandeur plus petit que la valeur généralement acceptée [77]. Il est cependant à noter que d'après [77], la méthode d'obtention de l'oxyde de silicium (oxydation naturelle, croissance thermique...) peut considérablement affecter les propriétés d'interface¹⁰. Par ailleurs, des ajustements corrects ayant été systématiquement obtenus avec $\sigma_S = 0$, il semble que la contribution de la charge de canal à la densité de charge effective $\sigma_{eff} = \sigma_{int} + \sigma_S$ soit négligeable et donc que $\sigma_S \ll |\sigma_{int}|$.

5.2 Réseaux partiellement recouverts de polylysine dans la gamme haut sel. Phénomènes d'inversion de pics

L'étude de la détection électronique d'ADN et de polylysine dans la gamme de concentrations comprises entre quelques millimolaires et quelques centaines de millimolaires, dite gamme haut sel, est très importante puisque toutes les réactions d'hybridation qui seront décrites au chapitre

¹⁰Dans les structures que nous utilisons, les surfaces actives d'oxyde de silicium sont obtenues par oxydation thermique à 1100°C .

7 ont été réalisées dans ce domaine. Concernant la polylysine, plusieurs expériences menées sur des réseaux partiellement recouverts de polymères ont permis de comparer systématiquement les variations de tension moyennes associées aux zones SiO_2 et polylysine. Il s'est avéré que dans la gamme haut sel les évolutions des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([\text{KCl}])$ associées à la polylysine sortaient du cadre du modèle σ_{eff} constant. La caractérisation de ce phénomène a été rendue difficile du fait de la diversité des résultats obtenus. Il a cependant été possible de dégager un comportement global qui est présenté dans ce paragraphe. L'origine physique de ce phénomène d'inversion de pics n'a pas pu être clairement identifiée mais sera discutée au chapitre suivant. Les résultats concernant l'influence de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure sur la détection d'ADN sont présentés au dernier paragraphe de ce chapitre.

5.2.1 Observations expérimentales

Le graphique 5.7.a présente une série de variations de la concentration d'un électrolyte de KCl, effectuée sur les transistors centraux d'un réseau de 29 FETs partiellement recouvert de polylysine. Un fichier référence associé à $[\text{KCl}] = 10^{-5}$ M a d'abord été enregistré, puis une macrogouttelette de polylysine (concentration c_0 ; volume déposé de $1 \mu\text{L}$; temps d'incubation en chambre humide : 20 mn) a été déposée afin de couvrir une dizaine de capteurs de la partie gauche du réseau, l'autre extrémité restant nue.

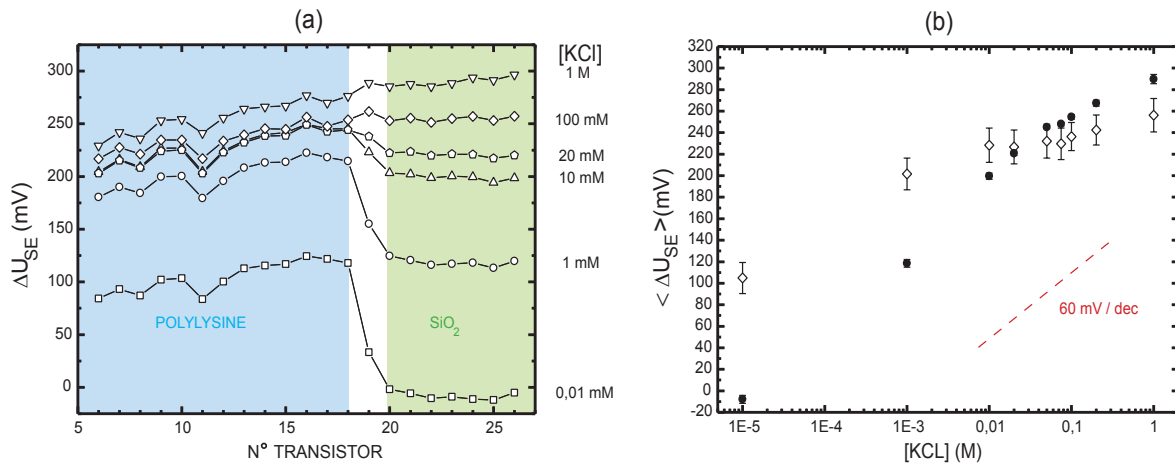


FIGURE 5.7: (a) Variations de tension ΔU_{SE} , des différents transistors d'un réseau partiellement recouvert de polylysine, lors de l'augmentation progressive de la concentration d'un électrolyte de KCl. La référence correspond à un enregistrement effectué avant dépôt dans $[\text{KCl}] = 10^{-5}$ M. La correspondance entre les différentes courbes et les concentrations de l'électrolyte utilisées, est donnée à droite du graphique. (b) Variations de tension moyennes en fonction de la concentration en KCl, associées à la zone polylysine (Transistors 6 à 18, losanges) et à la zone SiO_2 (Transistors 20 à 26, cercles), évaluées à partir des données de la figure 5.7.(a).

Conformément à ce qui a été observé au paragraphe 5.1, l'augmentation de la concentration de l'électrolyte entraîne un décalage positif global des courbes ainsi qu'une diminution de la différence de tension entre les zones polylysine et SiO_2 . Entre 10 mM et 100 mM, le signal correspondant à la polylysine reste quasiment constant, tandis que celui enregistré sur la zone SiO_2 continue à augmenter. Cette évolution se poursuit et conduit au-delà de dix millimolaires, à une inversion de la position relative des deux zones. Cet effet sera par la suite appelé inversion

de pics. Les variations moyennes de tension associées à chaque zone sont représentées sur le graphique 5.7.(b). Dans la gamme [10 mM, 100 mM], le comportement décrit précédemment se traduit par l'apparition d'un plateau de tension sur la courbe $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([\text{KCl}])$ associée à la polylysine. L'inversion de pics se manifeste au-delà de dix millimolaires, par un croisement des courbes associées aux deux zones.

Les principales caractéristiques des variations de tension attendues dans le cadre du modèle charge effective constante sont présentées dans l'appendice C (figure C.2), pour différentes valeurs du paramètre σ_{eff} . Dans la gamme [1 mM, 100 mM], les variations de U_{SE} attendues sont de l'ordre de 60 mV par décade de concentration de l'électrolyte, correspondant à la prédominance du terme d'électrode et ce indépendamment de la valeur de la charge effective initiale. L'influence de σ_{eff} ne se manifeste que pour des concentrations inférieures à 1 mM. En particulier, des valeurs de la charge effective positives et croissantes, tendent à diminuer la pente des courbes $U_{SE} = f([\text{KCl}])$. Dans la gamme haut sel, l'existence d'un plateau de tension sur la zone polylysine n'est pas prévue dans le cadre du modèle σ_{eff} constant. Cela semble indiquer que la variation de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure entraîne des modifications de l'interface, qui ne peut plus être décrite par le seul paramètre σ_{eff} indépendant de la concentration.

5.2.2 Caractérisation du phénomène d'inversion de pics

Différentes expériences analogues à celles présentées précédemment ont été réalisées afin de mettre en évidence le phénomène d'inversion de pics dans la gamme haut sel. Lors de chaque manipulation, la caractérisation du comportement de la polylysine a été effectuée en traçant la différence entre les courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([\text{KCl}])$ (courbes analogues à celles présentées sur la figure 5.7.b) associées respectivement aux zones polylysine et SiO_2 du réseau. Afin d'alléger les notations, cette grandeur¹¹ sera par la suite notée $(\Delta U_{SE})_{\text{SiO}_2}^{PLL} = \langle \Delta U_{SE} \rangle^{PLL} - \langle \Delta U_{SE} \rangle^{\text{SiO}_2}$. La figure 5.8 présente les résultats de dix expériences de variations de la concentration d'un électrolyte de KCl sur des réseaux différents et partiellement recouverts de polylysine¹².

La différence de comportement entre les zones SiO_2 et polylysine se manifeste dans la gamme haut sel, par une décroissance systématique des courbes $(\Delta U_{SE})_{\text{SiO}_2}^{PLL}$ se prolongeant jusqu'à 100 mM. Au-delà d'une concentration seuil dépendant de l'expérience considérée mais de l'ordre de dix à trente millimolaires, la différence de tension entre les deux zones devient dans la plupart des cas négative, traduisant un croisement des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([\text{KCl}])$ et l'existence d'inversions de pics. La comparaison des données expérimentales avec la simulation obtenue à partir du modèle charge effective constante (cf courbe rouge de la figure 5.8), montre clairement l'écart entre le comportement observé expérimentalement et celui attendu théoriquement.

Afin de mieux caractériser cet effet, une étude a été effectuée dans la gamme haut sel en assimilant les courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([\text{KCl}])$ associées aux zones polylysine et SiO_2 , à des droites caractérisées par leur coefficient directeur exprimé en mV par décade de concentration. Pour rendre compte des évolutions en tension, il est possible de déterminer à partir des graphiques

¹¹Les analyses présentées dans la suite de ce manuscrit montreront que cette quantité apparaît intéressante en pratique pour caractériser la détection de polymères. Sa signification physique semble cependant beaucoup plus difficile à interpréter.

¹²Les dépôts ont systématiquement été réalisés avec une solution de polylysine de concentration c_0 et, pour toutes les expériences, la zone SiO_2 suit un comportement proche de celui attendu théoriquement.

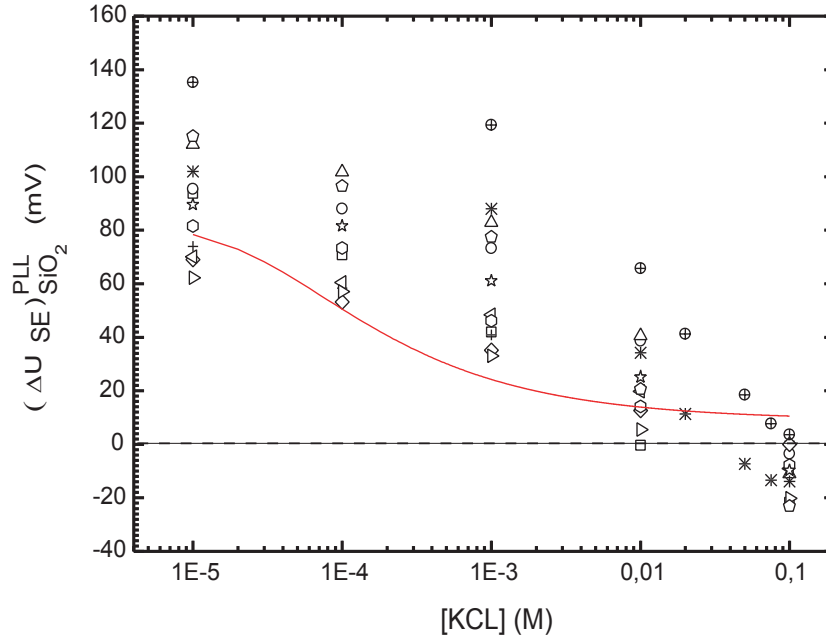


FIGURE 5.8: Différences entre les évolutions expérimentales des variations de tension $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([KCl])$ associées respectivement aux zones polylysine et SiO_2 , pour dix expériences réalisées dans des conditions similaires. Les références sont toutes enregistrées avec un électrolyte $[KCl] = 10^{-5}$ M, avant dépôt de polylysine. Pour indication, une simulation de la différence de tension attendue dans le cadre du modèle σ_{eff} constant a été tracée en rouge sur la figure. Cette courbe correspond à la différence des U_{SE} , calculée à partir de l'équation 5.3 pour une même constante C et des σ_{eff} égaux respectivement à $-1,5 \times 10^{-4}$ C.m $^{-2}$ (σ_{eff} moyen issu des ajustements sur les zones polylysine. Cf paragraphe 5.1.3) et -13×10^{-4} C.m $^{-2}$ (σ_{eff} moyen, issu des ajustements sur les zones SiO_2 . Cf paragraphe 5.1.3).

$\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([KCl])$ (identiques à celui de la figure 5.7.b), les coefficients directeurs "absolus" associés aux différentes zones, ainsi que la différence entre ces coefficients directeurs absolus. Cette dernière valeur, appelée par la suite coefficient directeur relatif, peut être obtenue directement en effectuant un ajustement linéaire des données $(\Delta U_{SE})_{SiO_2}^{PLL}$ de la figure 5.8, dans la gamme haut sel. Les coefficients directeurs absolus de la polylysine s'étalent entre 3 et 53 mV par décade, avec une moyenne de 27,2 mV par décade. Ces valeurs reflètent d'importantes différences de comportement d'une expérience à l'autre, qui pourraient éventuellement être reliées à des variations des caractéristiques de la couche de polylysine déposée entre les différentes manipulations. A priori, l'information disponible traduisant le mieux les propriétés de la couche de polylysine déposée est contenue dans la différence de tension moyenne, évaluée sur la zone polylysine, entre un enregistrement effectué immédiatement après dépôt de polylysine dans $[KCl] = 10^{-5}$ M, et l'enregistrement référence acquis avant dépôt, également dans $[KCl] = 10^{-5}$ M. Sur chacune des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([KCl])$ associées à la polylysine (analogues à la courbe en losanges de la figure 5.7.b), cette valeur correspond à l'ordonnée du point d'abscisse $[KCl] = 10^{-5}$ M et sera notée $\langle \Delta U_{SE} \rangle^0$ par la suite. La figure 5.9 présente l'évolution des coefficients directeurs absolus (figure 5.9.a) et relatifs (figure 5.9.b), obtenus pour les dix expériences de la figure 5.8, en fonction du décalage de tension $\langle \Delta U_{SE} \rangle^0$ mesuré dans $[KCl] = 10^{-5}$ M.

Le graphique 5.9.b montre l'existence d'une corrélation entre les coefficients directeurs relatifs

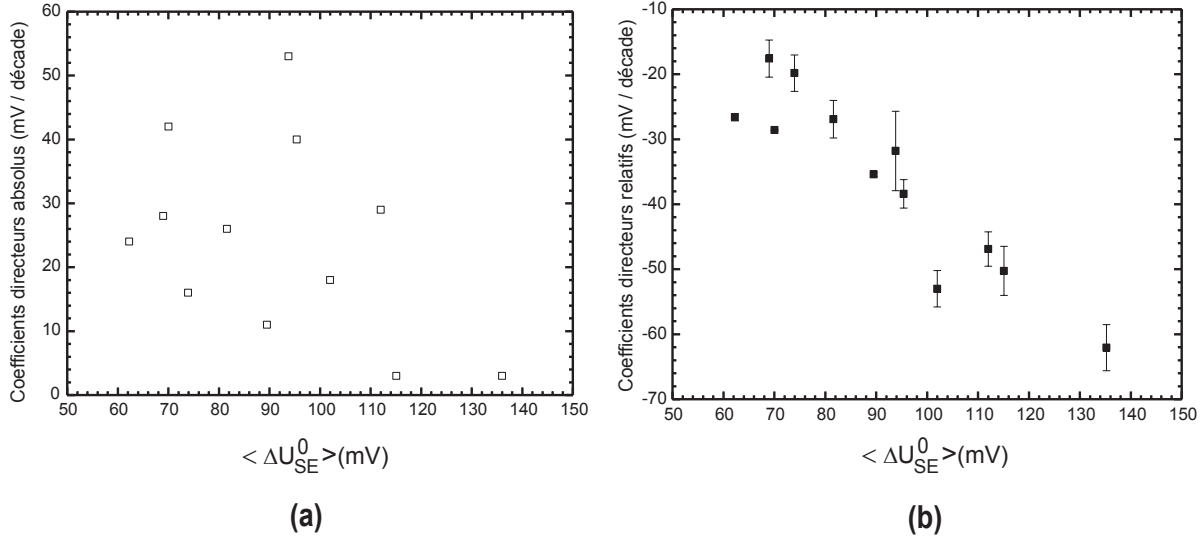


FIGURE 5.9: (a) Evolution des coefficients directeurs absolus caractérisant les zones polylysine des expériences de la figure 5.8 dans la gamme [1 mM, 100 mM], en fonction du décalage de tension $\langle \Delta U_{SE} \rangle^0$ mesuré dans $[\text{KCl}] = 10^{-5}$ M. (b) Evolution des coefficients directeurs relatifs des zones polylysine évalués dans la gamme [1 mM, 100 mM] à partir des courbes de la figure 5.8, en fonction du décalage de tension $\langle \Delta U_{SE} \rangle^0$ mesuré dans $[\text{KCl}] = 10^{-5}$ M.

et les décalages de tension $\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle$ mesurés dans $[\text{KCl}] = 10^{-5}$ M, alors qu'aucune dépendance n'apparaît sur le graphique 5.9.a. Ceci suggère un lien entre les propriétés des zones SiO_2 et polylysine. Cependant, si les variations de tension des régions SiO_2 étaient systématiquement proches de celles attendues théoriquement (dans la gamme haut sel, 60 mV par décade de concentration correspondant à la prédominance du terme d'électrode, cf appendice C), la dispersion des points de la figure 5.9.a devrait être la même que celle observée sur la figure 5.9.b, les deux courbes ne présentant qu'un décalage global de 60 mV. Ces résultats semblent donc indiquer l'existence de comportements anormaux des zones SiO_2 à haut sel. La bonne corrélation entre les coefficients directeurs relatifs et les $\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle$ de la figure 5.9.b montre que la mesure différentielle est fiable, tandis que la mesure absolue ne l'est pas (absence de corrélation des coefficients directeurs absolus de la figure 5.9.a). Ce résultat est éventuellement attribuable à d'éventuels artéfacts liés à l'utilisation de l'électrode d'argent ne présentant pas un comportement Nernstien à haut sel. L'analyse en termes de coefficient directeurs relatifs permet alors de se départir du terme d'électrode.

Par ailleurs, il apparaît sur la figure 5.9.b que les caractéristiques initiales de la couche de polylysine déposée, supposées reliées à $\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle$ dans cette analyse et vraisemblablement liées à l'état de charge des surfaces d'oxyde de silicium avant dépôt, semblent influencer sur les variations des caractéristiques des transistors associés aux zones polylysine lors de changements de la concentration en sel du bain de mesure. Le chapitre 6 reviendra sur le phénomène d'inversion de pics observé sur la polylysine et discutera des mécanismes physiques possibles permettant d'expliquer ces effets.

5.3 Inversions de pics sur le système ADN/polylysine/SiO₂

Les expériences présentées dans cette partie ont été menées sur des réseaux globalement incubés dans une solution de polylysine de concentration c_0 suivant le protocole habituel, puis partiellement recouverts de microdépôts d'oligonucléotides d'une vingtaine de bases. L'étude de l'influence de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure sur la détection d'ADN a été effectuée en suivant une démarche similaire à celle suivie lors de l'étude des réseaux partiellement recouverts de polylysine. La première section détaillera une manipulation mettant en évidence le phénomène d'inversion de pics sur le système SiO₂/polylysine/ADN. La deuxième partie sera consacrée à l'analyse des variations de tension des différentes zones du réseau en fonction de la concentration de l'électrolyte de mesure et à la comparaison au modèle σ_{eff} constant. L'allure des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{PLL}^{ADN}$, y sera également présentée. Enfin, la dernière partie détaillera l'influence de séries successives d'augmentations de la concentration en sel d'un électrolyte de mesure sur le comportement des pics d'ADN, et montrera l'existence de réorganisations de la couche de biomolécules lors de cycles en sel répétés. Toutes les expériences ont été effectuées dans un électrolyte de KCl.

5.3.1 Mise en évidence du phénomène

La figure 5.10 présente une expérience mettant en évidence le phénomène d'inversion de pics sur des réseaux partiellement recouverts d'ADN, lors de l'augmentation de la concentration d'un électrolyte de chlorure de potassium. Ce résultat a été obtenu lors de la phase de dépôt des sondes d'une expérience d'hybridation.

Après incubation d'un réseau de 29 transistors dans une solution de polylysine de concentration c_0 et acquisition des caractéristiques dans un électrolyte de $[KCl] = 0,01$ mM (acquisition de référence), deux microdépôts d'oligonucléotides d'environ 5 nL ont été réalisés à chaque extrémité de la ligne de capteurs en utilisant le nanopotter GESIM. La gouttelette de gauche correspond à une solution d'ADN simple-brin de vingt bases¹³, de concentration 1 μM , diluée dans KCl à 1 mM. La solution déposée à droite ne diffère de la précédente que par la séquence des oligonucléotides¹⁴. La structure a ensuite été mesurée dans un électrolyte de KCl à 0,01 mM (courbe noire, échelle verticale de gauche : différence entre mesure après dépôt d'ADN et la mesure de référence), puis rincée et mesurée à nouveau en utilisant cette fois un électrolyte de KCl à 20 mM (courbe bleue, échelle verticale de droite). Lors du remplacement de $[KCl] = 0,01$ mM par $[KCl] = 20$ mM, il apparaît un phénomène d'inversion de pics assez spectaculaire puisque l'amplitude des pics d'ADN passe d'environ -15 mV à 0,01 mM, à +80 mV à 20 mM. Par ailleurs, sur la courbe bleue, le signal électronique associé au microdépôt de gauche s'étale sur environ 100 mV. On peut notamment remarquer que les variations de tension correspondant aux transistors 6 à 9, relativement proches du niveau de la polylysine sur la courbe noire, ont un comportement sur la courbe bleue ($[KCl] = 20$ mM) très différent de celui des autres capteurs exposés à l'ADN. Ceci suggère une dépendance du phénomène d'inversion à la quantité d'ADN présente sur la couche de polylysine.

¹³5'-CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC-3', synthétisés par Thermo Hybrid.

¹⁴5'-CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT-3', synthétisés par Thermo Hybrid.

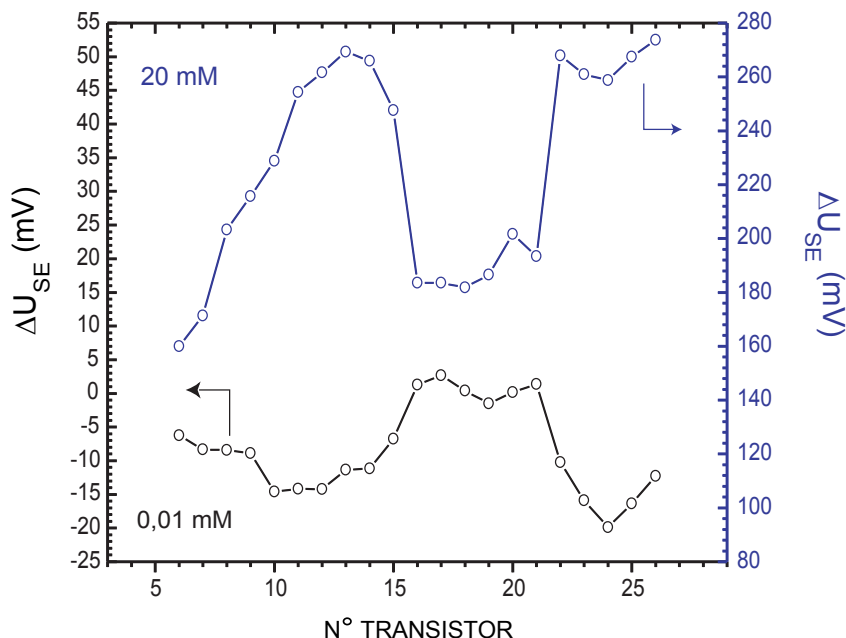


FIGURE 5.10: Courbe noire, échelle verticale de gauche : variations de tension des 21 capteurs centraux d'un réseau de 29 transistors, d'abord globalement incubé dans la polylysine puis recouvert à chaque extrémité par deux microdépôts ($V \sim 5$ nL) de deux solutions d'oligonucléotides de séquences différentes (~ 20 bases), de concentrations $1 \mu M$ diluées dans $[KCl] = 1$ mM. La mesure après dépôt d'ADN a été effectuée dans un électrolyte de KCl à 0,01 mM; la mesure de référence correspond à une acquisition effectuée dans $[KCl] = 0,01$ mM, avant dépôt d'ADN. Courbe bleue, échelle verticale de droite : variations de tension des capteurs du réseau précédent mesurées dans un électrolyte de KCl à 20 mM (la mesure de référence reste la même que précédemment).

5.3.2 Evolutions des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([KCl])$ et comparaison au modèle σ_{eff} constant

Afin d'étudier plus précisément le phénomène d'inversion de pics mis en évidence précédemment, plusieurs séries de variations de la concentration d'un électrolyte de KCl ont été effectuées sur différentes structures partiellement recouvertes d'ADN. La figure 5.11 présente les résultats obtenus lors d'une manipulation sur un réseau d'abord incubé globalement dans la polylysine, puis recouvert à une extrémité par un macrodépôt d'oligonucléotides (solution d'oligonucléotides de 20 bases¹⁵, de concentration $5 \mu M$, diluée dans l'eau déionisée; volume déposé d'environ $0,4 \mu L$, temps d'incubation de 15 mn). De manière analogue à la démarche suivie lors de l'étude du comportement des réseaux partiellement recouverts de polylysine, les variations de tension moyennes $\langle \Delta U_{SE} \rangle$ associées respectivement aux zones ADN + polylysine et polylysine seule, ont été calculées pour chaque concentration de l'électrolyte de mesure. Les courbes, $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([KCl])$ obtenues sont présentées sur le graphique 5.11, en rouge pour la région polylysine seule et en bleu pour la partie du réseau exposée à la solution d'oligonucléotides.

Le comportement de la courbe associée à la zone polylysine nue (cercles rouges) est conforme à celui mis en évidence dans le paragraphe 5.2. En effet, pour des concentrations en sel inférieures à

¹⁵5'-CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT-3', synthétisés par Thermo Hybrid.

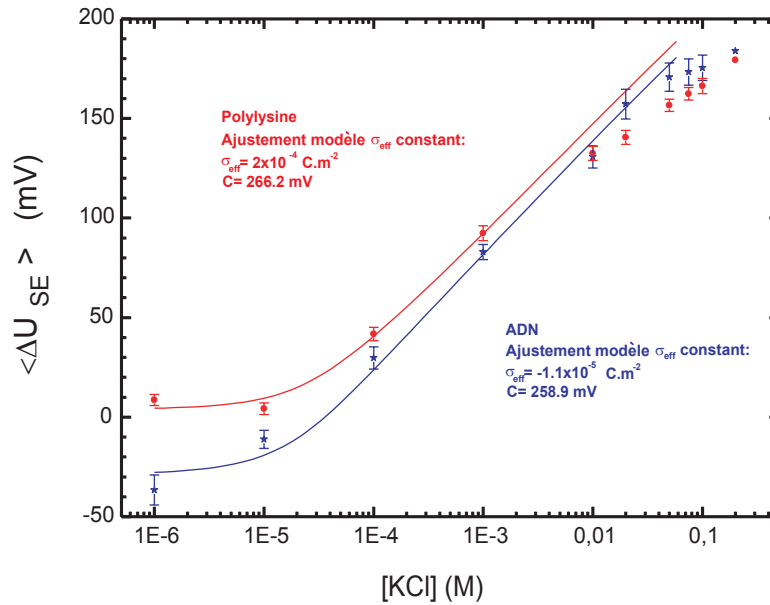


FIGURE 5.11: Cercles rouges : variations de tension moyennes de la zone polylysine nue d'un réseau de transistors partiellement recouvert d'ADN (cf texte pour les détails), en fonction de la concentration d'un électrolyte de chlorure de potassium. Etoiles bleues : courbe $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([\text{KCl}])$ associée à la région exposée à la solution d'oligonucléotides. Les courbes en trait continu rouge et bleu correspondent aux résultats de l'ajustement par le modèle σ_{eff} constant.

1 mM environ, le modèle σ_{eff} constant décrit relativement bien l'évolution $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([\text{KCl}])$. L'ajustement présenté en trait continu rouge sur la figure 5.11, a été effectué en ne prenant en considération que les quatre premiers points de la courbe. Les valeurs des paramètres obtenus sont $\sigma_{eff} = 2 \times 10^{-4} \pm 0,4 \times 10^{-4} \text{ C.m}^{-2}$ et $C = 266,2 \text{ mV}$. Au-delà de 1 mM, l'évolution des variations de tension associées à la zone polylysine s'éloignent notablement de la description σ_{eff} constant. La région recouverte de la solution d'oligonucléotides présente globalement un comportement assez similaire à celui de la partie polylysine nue. En effet, il apparaît que la courbe en étoiles bleues suit, pour des concentration inférieures à 20 mM environ, une évolution bien ajustée par le modèle σ_{eff} constant¹⁶. Les valeurs de σ_{eff} et C obtenues valent respectivement $\sigma_{eff} = -1,1 \times 10^{-5} \pm 0,5 \times 10^{-4} \text{ C.m}^{-2}$ et $C = 258,87$. La comparaison des σ_{eff} associés respectivement à la zone polylysine nue ($\sigma_{eff} = 2 \times 10^{-4} \pm 0,4 \times 10^{-4} \text{ C.m}^{-2}$) et à la zone ADN + polylysine ($\sigma_{eff} = -1,1 \times 10^{-5} \pm 0,5 \times 10^{-4} \text{ C.m}^{-2}$), indique que le dépôt d'ADN tend à diminuer la charge effective de surface de la polylysine, ce qui est cohérent avec un apport de molécules négativement chargées sur une surface globalement positive.

Sur la courbe de la figure 5.11 associée à la zone ADN, au-delà de 20 mM, un décrochement analogue à celui observé dans le cas de la polylysine nue apparaît. Le phénomène d'inversion de pics, correspondant au croisement des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([\text{KCl}])$ en étoiles et en cercles pour une concentration de 10 mM environ, semble pouvoir être associé à l'influence des oligonucléotides

¹⁶Les courbes associées à la polylysine et à l'ADN de la figure 5.11, ont été ajustées en prenant successivement en compte les trois premiers points bas sel, les quatre premiers points etc..., jusqu' à ce que la valeur de la constante C trouvée varie notablement. Ce critère indique que des effets intervenant dans le volume de la couche condensée doivent alors être pris en considération et que le modèle σ_{eff} constant n'est plus relevant.

présents dans la couche de polylysine. L'effet de ces derniers tendraient à "repousser" le seuil de concentration en contre-ions à partir duquel des modifications commencent à intervenir dans le volume de la couche condensée ADN/polylysine, élargissant ainsi le domaine de concentration dans lequel le modèle σ_{eff} constant reste valable. Le croisement des courbes peut alors être interprété comme un décrochement de la courbe associée à la polylysine nue apparaissant à plus faible concentration de l'électrolyte de mesure que celui des zones ADN. Pour des concentrations en KCl supérieures à 50 mM, la courbe en étoiles semble tendre vers un comportement analogue à celui de la polylysine nue. L'ensemble de ces observations est caractéristique des évolutions des variations de tension moyennes observées lors des expériences que nous avons effectuées sur des réseaux partiellement recouverts d'ADN. Ce comportement apparaît plus clairement lors de l'analyse des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{ADN}^{PLL} = f([KCl])$ correspondant pour chaque expérience, aux différences entre l'évolution moyenne des zones polylysine et ADN.

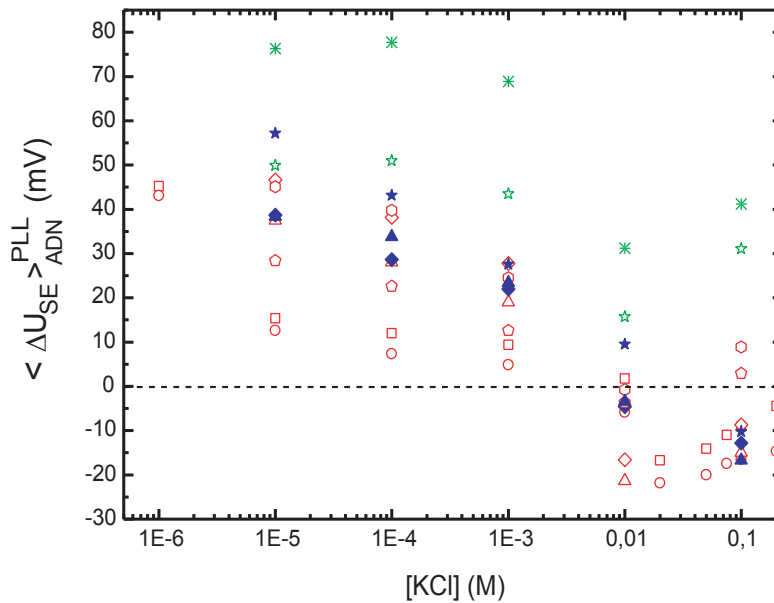


FIGURE 5.12: Variations des différences de tension moyennes $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{ADN}^{PLL}$ en fonction de la concentration en sel d'un électrolyte de chlorure de potassium, obtenues à partir de dix manipulations réalisées sur des réseaux de transistors partiellement recouverts de polylysine. Les différentes couleurs ne servent qu'à identifier les expériences présentant un comportement similaire.

La figure 5.12 présente l'évolution des différences de tension moyennes $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{ADN}^{PLL}$ en fonction de la concentration en sel de l'électrolyte de chlorure de potassium, obtenues à partir de dix manipulations réalisées sur des réseaux de transistors partiellement recouverts de polylysine. A bas sel, l'amplitude des pics d'ADN évaluée par rapport à la ligne de base polylysine est négative, conduisant à des valeurs de $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{ADN}^{PLL}$ positives. Conformément à l'expérience présentée dans le paragraphe 5.3.1, le phénomène d'inversion de pics se traduit par une inversion des positions relatives des zones ADN et polylysine, l'amplitude des pics d'ADN devenant positive. Cet effet est visible sur la figure 5.12, lors de l'apparition de $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{ADN}^{PLL}$ négatifs. La plupart des évolutions des différences de tension moyennes présentent un comportement similaire. Il apparaît en effet une décroissance systématique de $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{ADN}^{PLL}$ entre 10^{-4} M et 10 mM. Cependant, dans le cas des courbes représentées en bleu, cette décroissance se pour-

suit entre 10 mM et 100 mM, tandis que les résultats des manipulations tracées en rouge et en vert présentent une remontée du signal au-delà de 10 mM. A l'exception des courbes du groupe vert, la différence de tension devient dans la plupart des cas négative pour des concentrations de l'électrolyte de mesure supérieure à 10 mM. Cela traduit l'existence d'inversions de pics, le niveau des zones ADN passant au dessus de celui des régions polylysine nues. Etant donné le peu de points de mesure, une étude fondée sur les coefficients directeurs analogue à celle effectuée sur les réseaux partiellement recouverts de polylysine, n'a pas été possible. Il apparaît cependant que la quantité d'oligonucléotides déposée semble influencer sur les évolutions des différences de tension à haut sel. En effet, les courbes du groupe vert ne présentent pas d'inversions de pics et correspondent à des amplitudes initiales des pics d'ADN importantes¹⁷, traduisant une densité surfacique d'oligonucléotides adsorbée élevée. Au contraire, le phénomène d'inversion de pics se manifeste systématiquement sur les courbes du groupe rouge obtenues avec des concentrations d'ADN initiales plus faibles.

De manière générale, les évolutions des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{ADN}^{PLL}$ en fonction de la concentration en KCl apparaissent difficiles à caractériser. En effet, elles dépendent à la fois du comportement des zones polylysine nues, qui d'après le paragraphe 5.2 varient en fonction des propriétés de la couche de polylysine déposée, et de celui des zones ADN + polylysine, vraisemblablement influencé par la densité surfacique d'ADN adsorbée. Il est cependant admis dans le domaine des polymères [78] et des multicouches de films minces [79], l'existence d'une concentration en sel seuil, à partir de laquelle les contre-ions pénètrent dans la couche de polymères. On peut raisonnablement penser que le dépôt d'oligonucléotides entraîne une modification du seuil au-delà duquel l'entrée des contre-ions dans la couche de polylysine nue d'une part, et dans la structure ADN-polylysine d'autre part, commence à engendrer des modifications. Il ressort par ailleurs de la littérature que l'effet de la pénétration de contre-ions dans une couche de polyélectrolyte positivement chargée, et dans une couche de ce même polyélectrolyte modifiée par la présence de molécules négativement chargées, peut être radicalement différent. Odberg et collaborateurs [80] ont par exemple mis en évidence par mesures ellipsométriques, une diminution de l'épaisseur d'une couche de polyacrylamides déposée sur un substrat d'oxyde de silicium et un gonflement de cette même structure préparée en introduisant des particules colloïdales négativement chargées, lors de l'augmentation de la concentration d'un électrolyte de NaCl.

5.3.3 Réorganisation de la structure polylysine/ADN lors de séries d'augmentations de la concentration de l'électrolyte de mesure

La fixation d'ADN sur la couche polylysine est essentiellement liée aux interactions électrostatiques du squelette phosphate avec les groupements NH_3^+ portés par la polylysine, ainsi qu'aux interactions hydrophobes des bases. L'ensemble de ces mécanismes engendre l'apparition d'un complexe polyélectrolytique polylysine/ADN. Lors du dépôt d'oligonucléotides sur la surface de polylysine, il y a au départ formation d'un gel peu compact, les molécules d'ADN formant des ponts entre chaînes distinctes de polylysine [79]. Ce paragraphe présente l'analyse d'une expérience comportant deux séries d'augmentations de la concentration d'un électrolyte

¹⁷Les points d'abscisse $[\text{KCl}] = 10^{-5} \text{ M}$ de la figure 5.12 correspondent à l'opposé de l'amplitude à bas sel des pics d'ADN.

de KCl, effectuées sur un réseau partiellement recouvert d'ADN. Les résultats obtenus semblent indiquer l'existence d'une réorganisation de la couche de biopolymères polylysine/ADN lors de cycles d'augmentations de la concentration en sel.

Observations expérimentales

Sur la figure 5.13, ont été tracées les variations de tension d'un réseau de 96 transistors incubé dans une solution de polylysine puis recouvert de cinq microdépôts de solutions d'oligonucléotides¹⁸ diluées dans l'eau, obtenues lors de deux séries d'augmentations de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure.

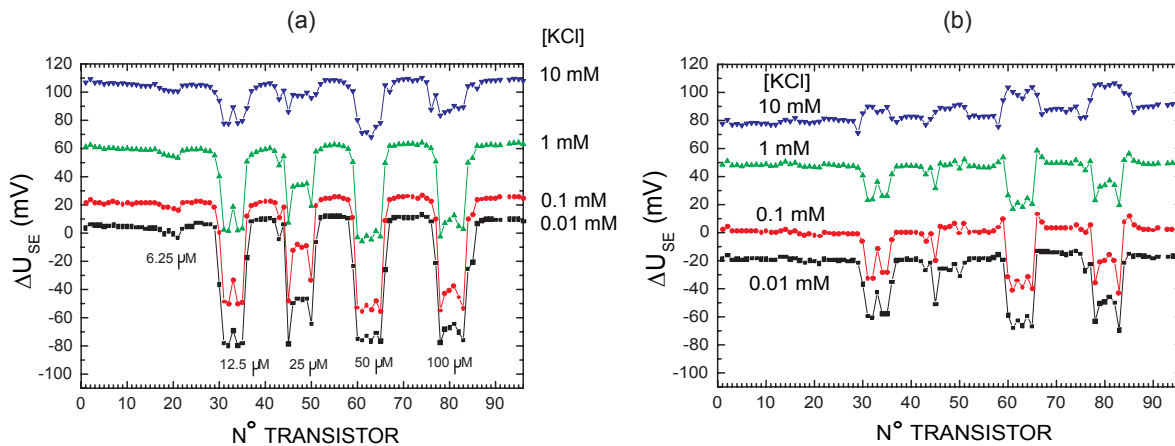


FIGURE 5.13: (a) : variations de tension des capteurs d'un réseau de 96 transistors partiellement recouvert d'ADN, obtenues lors d'une première série d'augmentations de la concentration en sel d'un électrolyte de [KCl]. (b) : variations de tension des différents transistors obtenues lors de la deuxième série d'augmentations de la concentration en sel de l'électrolyte de [KCl]. Les deux séries sont espacées par un rinçage à l'eau déionisée.

Les gouttelettes ont été réalisées à l'aide d'une pointe à ascension capillaire ($V \sim 1$ nL) et les dépôts localisés au niveau des transistors 18, 32, 48, 62 et 80, correspondent respectivement à des concentrations en oligonucléotides de 6.25, 12.5, 25, 50 et 100 μM . Ces valeurs étant toutes supérieures à l'ordre de grandeur de la densité maximale d'oligonucléotides de vingt bases pouvant être adsorbée dans une monocouche de polylysine (cf chapitre 4), la très faible amplitude du pic correspondant à 6.25 μM semble indiquer une mauvaise qualité du dépôt. Une première série d'augmentations de la concentration en KCl a d'abord été effectuée ; les résultats sont présentés sur le graphique 5.13.a. L'augmentation de la quantité de sel dans le bain de mesure entraîne un décalage positif global des courbes ainsi qu'une diminution de l'amplitude des pics. Pour une concentration de 10 mM de l'électrolyte, aucune inversion de pics n'apparaît. Après cette dernière mesure, le réseau a été rincé à l'eau déionisée et une nouvelle série d'augmentations a été effectuée en utilisant les mêmes concentrations de l'électrolyte que lors de la première phase. Les variations de tension obtenues sont rassemblées sur le graphique 5.13.b. Il apparaît sur cette figure que le rinçage a entraîné une diminution importante de l'amplitude des différents pics¹⁹ : il

¹⁸5'-CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC-3', synthétisés par Thermo Hybrid.

¹⁹Pour la première série, l'amplitude des pics saturants peut être estimée autour de -80 mV, à [KCl] = 0,01 mM et pour la seconde à environ -30 mV, toujours pour [KCl] = 0,01 mM.

n'est plus possible de distinguer le pic associé à $6.25 \mu\text{M}$. On peut par ailleurs constater que cette diminution globale d'amplitude semble être corrélée à l'apparition d'un phénomène d'inversion à 10 mM, inexistant lors de la première série. A l'issue de la deuxième série d'augmentations de la concentration, la structure a été à nouveau rincée à l'eau déionisée, puis une dernière acquisition effectuée dans un électrolyte à 0,01 mM. Le graphique 5.14 rassemble les différentes variations de tension obtenues : à 0,01 mM, avant la première série (courbe noire), à 0,01 mM avant la deuxième série (courbe en gris foncé) et, toujours à 0,01 mM, après le dernier rinçage (courbe en gris clair).

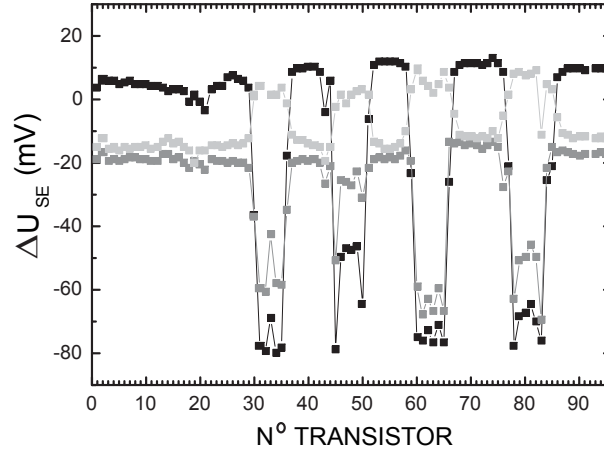


FIGURE 5.14: Variations de tension des 96 transistors de la figure 5.13, mesurées dans $[\text{KCl}] = 0,01 \text{ mM}$: en noir, avant la première série, en gris foncé, avant la deuxième série, en gris clair, à l'issue de la deuxième série. Toutes ces étapes sont séparées par un rinçage à l'eau déionisée.

Le graphique 5.14 montre que le dernier passage de 10 mM à 0,01 mM semble avoir "figé" le système ADN/polylysine puisque les inversions de pics restent visibles sur la courbe en gris clair correspondant à $[\text{KCl}] = 0,01 \text{ mM}$.

Interprétation

De manière générale, la modélisation du système FET/biomolécules/électrolyte fait intervenir une couche compacte engendrant un saut de potentiel dont le signe dépend des interactions à courte portée entre biomolécules, suivie d'une couche diffuse. Dans le cadre du modèle σ_{eff} constant, le potentiel de couche diffuse a été écrit sous la forme :

$$\Delta\phi_{CD} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{8kT\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}[\text{Cl}^-]}} \right) \quad (5.15)$$

Un ajustement par le modèle σ_{eff} constant des données issues de la première série en sel (figure 5.13.a), conduit à des valeurs de σ_{eff} de l'ordre de $2 \times 10^{-4} \pm 0,6 \times 10^{-4} \text{ C.m}^{-2}$ pour les zones polylysine et de $1,3 \times 10^{-4} \pm 1,4 \times 10^{-4} \text{ C.m}^{-2}$ pour les zones ADN + polylysine. Le saut de potentiel de couche diffuse, calculé à 10^{-5} M à partir de ces σ_{eff} et de l'équation 5.15, est respectivement égal à 30 mV pour la région polylysine et de l'ordre de 0 mV pour la partie ADN

+ polylysine. Cependant, la première mesure à $[KCl] = 10^{-5}$ M présentée sur la figure 5.13.a et effectuée immédiatement après la phase de dépôt, fait apparaître des pics négatifs sur les zones ADN + polylysine de l'ordre de 80 mV par rapport à la ligne de base de la polylysine nue. Cette valeur étant beaucoup plus importante que celle des différences de potentiel de couche diffuse (30 mV) associées aux deux régions, il apparaît que les pics d'ADN sont essentiellement dus au potentiel de couche compacte qui est donc juste après dépôt, environ 50 mV plus négatif sur la région ADN que sur la région polylysine nue. Ceci indique que, dès la première immersion à bas sel, les oligonucléotides ont au moins partiellement atteint la couche compacte.

La possibilité d'ajuster correctement les variations de tension avec le modèle σ_{eff} constant pour de faibles concentrations de l'électrolyte de mesure, indique que la structure de la couche ADN + polylysine reste relativement figée à bas sel et que les effets sont essentiellement localisés dans la couche diffuse. A haut sel, les complexes ADN/polylysine vont se dissocier, des contre-ions prenant la place de certains monomères chargés, ce qui permet aux oligonucléotides de diffuser dans la couche de polylysine : la réalisation d'augmentations successives de la concentration de l'électrolyte de mesure espacées de rinçages, va permettre graduellement au système de se réorganiser. La situation finale correspond à un état où les oligonucléotides ont complètement remplacé les contre-ions à proximité de l'oxyde de silicium, et interagissent donc directement avec la surface de SiO_2 [79]. Lors de cycles en sel, la différence de potentiel de couche compacte entre les zones ADN + polylysine et polylysine seule est modifiée petit à petit. D'après les figures 5.13.a, 5.13.b et 5.14, il apparaît expérimentalement qu'elle varie graduellement jusqu'à devenir positive :

- au départ, elle vaut -50 mV.
- A la fin de la première montée en sel (courbe à 10 mM de la figure 5.13.a), le pic d'ADN est de -30 mV, alors qu'à cette salinité les potentiels de couches diffuses sont de l'ordre du millivolt. La différence de potentiel de couche compacte n'est donc plus que de -30 mV.
- Lors du premier retour à bas sel (courbe à 10^{-5} M de la figure 5.13.b), les pics ont une amplitude de l'ordre de -30 mV, indiquant que la différence de potentiel de couche compacte est de l'ordre de 0 mV.
- A la fin de la deuxième montée en sel (courbe à 10 mM de la figure 5.13.b), les pics d'ADN sont devenus positifs, avec une amplitude de l'ordre de +20 mV.
- Lors de la dernière descente à faible sel (courbe en gris clair, figure 5.14), les pics d'ADN restent positifs et de hauteur pratiquement stable, alors que la région polylysine voit son potentiel de couche diffuse augmenter de 30 mV : la couche compacte ADN + polylysine continue à se réorganiser, la différence de potentiel de couche compacte augmentant de 30 mV pour atteindre +50 mV.

Ces variations concernent la différence de potentiel de couche compacte entre les zones ADN + polylysine et les zones polylysine nue. Elles peuvent à priori aussi bien être attribuées à des réorganisations de la structure ADN + polylysine qu'à des modifications de la couche de polylysine seule. Il apparaît sur la figure 5.14, qu'à l'issue de la première série d'augmentations en sel, le niveau de la polylysine nue s'est décalé d'environ 20 mV vers le bas²⁰ (courbe en gris foncé)

²⁰Ce résultat peut être comparé à celui obtenu lors de l'expérience présentée sur le graphique 5.1 du paragraphe 5.1. Il était apparu que l'amplitude des pics de polylysine, évaluée par rapport à la ligne de base SiO_2 , variait de quelques dizaines de millivolts entre les deux mesures dans $[KCl] = 0,01$ mM et espacées d'un rinçage.

par rapport à la mesure effectuée à 0,01 mM avant la première phase de l'expérience (courbe noire). Cet effet pourrait être dû à l'existence de réorganisations de la couche de polylysine. La figure 5.14 montre par ailleurs, que les courbes en gris clair (mesure à 0,01 mM à l'issue du premier rinçage) et en gris foncé (mesure à 0,01 mM à l'issue du deuxième rinçage) associées aux zones polylysine sont confondues. Il semble donc qu'après la première montée en sel, la structure de la couche de polylysine se soit stabilisée. Les variations des différences de potentiel de couche compacte observées lors de la deuxième série d'augmentations de la concentration en sel paraissent donc essentiellement attribuables à des modifications de la structure ADN + polylysine.

Il ressort de ces différentes analyses que l'évolution des pics d'ADN à bas sel s'interprète correctement en terme de couche diffuse. A haut sel, les potentiels de couche compacte apparaissent jouer un rôle prédominant et leurs variations conduisent à l'apparition de "pics d'ADN" pouvant avoir un signe opposé à celui correspondant au potentiel de couche diffuse, et d'amplitudes nettement plus grandes que celles dues au seul terme de couche diffuse associé à ces concentrations élevées.

De manière générale, le comportement de la couche de biopolymères ADN + polylysine à haut sel, apparaît comme un problème compliqué, pouvant faire intervenir aussi bien les mécanismes engendrant le phénomène d'inversion de pics mis en évidence sur la polylysine nue (paragraphe 5.2), que la réorganisation de la structure ADN + polylysine décrite précédemment. Etant donnée la complexité d'une étude du système ADN + polylysine, nous nous sommes intéressés au phénomène d'inversion de pics observé sur la polylysine nue. Le chapitre suivant regroupe les différentes analyses complémentaires que nous avons effectuées afin d'essayer d'isoler les mécanismes responsables du comportement "anormal" de la polylysine à haut sel.

Chapitre 6

Analyse du phénomène d'inversion de pics de polylysine à haut sel

Ce chapitre présente une analyse complémentaire du phénomène d'inversion de pics observé sur la polylysine, dans la gamme haut sel. La première partie rend compte de différents résultats publiés dans la littérature et qui nous ont incités à effectuer quelques expériences complémentaires. La seconde section montrera notamment que le phénomène d'inversion de pics apparaît être dépendant de la nature des contre-ions de l'électrolyte de mesure. L'ensemble de ces résultats suggère que l'effet d'effondrement d'une brosse de polymères à haut sel rapporté dans la littérature, puisse être l'un des mécanismes impliqué dans le comportement inattendu de la polylysine. Afin de confronter les évolutions expérimentales des variations de tension avec cette hypothèse, un modèle très simple de l'interface SiO_2 /polylysine/électrolyte a été développé. Cette analyse théorique fera l'objet de la dernière partie de ce chapitre.

6.1 Structures et propriétés d'une couche de polyélectrolytes déposée sur une surface chargée

Durant les vingt dernières années, la physique des polymères a fait l'objet d'un travail considérable, aussi bien d'un point de vue expérimental que théorique. Il ressort de la littérature que l'analyse du comportement des polyélectrolytes forts¹ constitue un problème difficile. En ce qui concerne les phénomènes caractérisés dans le chapitre précédent, la complexité est encore accrue du fait de la polydispersité de la solution de polylysine utilisée, de la présence d'une surface chargée d'oxyde de silicium au voisinage de la couche de polyélectrolytes ainsi que des variations de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure. Cette partie a pour but de présenter les informations sur le système polylysine/ SiO_2 que nous avons pu trouver dans la littérature.

¹Les polyélectrolytes constituent une classe de polymères, caractérisés par l'existence, le long de la chaîne, de groupes ionisables en solution.

6.1.1 Structures d'une couche de polyélectrolytes déposée sur une surface chargée

L'adsorption de polyélectrolytes sur une surface chargée a été très largement étudiée d'un point de vue théorique [81, 82, 83, 84, 85]. Il apparaît qu'une couche de polyélectrolytes déposée sur une surface chargée peut avoir différentes structures, dépendant entre autre de la charge du polymère, de la charge du substrat sur lequel elle est adsorbée, ainsi que de la concentration en sel de l'électrolyte environnant [86, 87, 88]. En ce qui concerne la couche de polylysine déposée sur la surface d'oxyde de silicium, nous avons choisi d'adopter une modélisation du système de type double couche, faisant intervenir :

- une couche compacte ou condensée, formée par les fragments de polymères collés sur la surface. La charge globale de cette couche, constituée de la charge du substrat, de celle des polymères condensés et des contre-ions éventuels, est faible devant la charge du substrat solide (SiO_2 dans nos expériences). La chute de potentiel à la traversée de cette couche compacte peut être important et son signe dépend du détail des interactions à courte portée.
- suivie d'une couche diffuse, formée par les boucles et les queues "libres" des polymères greffés sur la couche compacte et entourées de contre-ions. Le potentiel de cette couche diffuse est faible car les contre-ions écrantent un profil de charges variant continûment. Le signe de ce potentiel est celui de la charge globale de la couche condensée. Dans le cas d'une couche de polylysine positivement chargée sur une surface de SiO_2 négativement chargée, le potentiel de couche diffuse est positif.

6.1.2 Caractérisations de la couche de polylysine déposée

Taille des chaînes polylysine et distance interchaîne

Cette section présente quelques ordres de grandeurs permettant de caractériser la couche de polylysine déposée sur les surfaces d'oxyde des réseaux de transistors. Les résultats des mesures électroniques exposés dans les chapitres précédents ont permis d'estimer la distance moyenne entre chaînes de polymères. Par ailleurs, des mesures ellipsométriques récemment entreprises, ont donné une première évaluation de l'épaisseur de la couche de polylysine. Par la suite, on distinguera les densités surfaciques de polymères, notées $\tilde{\sigma}$ des densités surfaciques de charges associées, notées σ .

Les molécules de polylysine sont constituées de monomères lysine dont la formule semi-développée est donnée sur la figure 6.1.

La taille caractéristique, notée a , d'un monomère lysine peut être évaluée à partir de l'ordre de grandeur de la longueur d'une unique liaison covalente carbone-carbone : $l(\text{C-C}) = 0,15$ nm. On peut par ailleurs distinguer entre la partie du monomère incluse dans le squelette du polymère ($a_{\parallel} \sim 0,45$ nm, cf figure 6.1) et celle correspondant à la chaîne latérale ($a_{\perp} \sim 0,75$ nm). La taille caractéristique a sera prise égale à environ 0,5 nm. D'après le fabricant, la masse molaire M ,

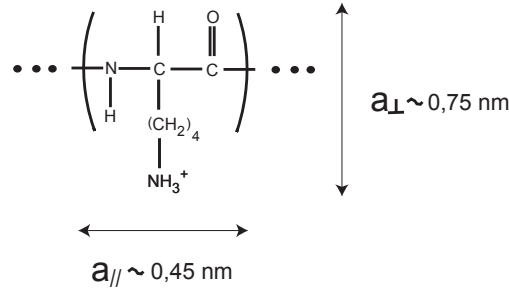


FIGURE 6.1: Structure chimique d'un monomère lysine.

de la solution de polylysine utilisée est comprise entre 150 et 300 kDa. La masse molaire d'un monomère étant d'environ 130 g.mol^{-1} , l'indice de polymérisation N , est compris entre 1150 et 2300 monomères environ. N est donc de l'ordre de 1500. Les valeurs de N et de a permettent également d'estimer la longueur, L_{max} du polymère étiré ($L_{max} = N \times a$). L_{max} est compris entre 550 nm et 1150 nm, soit $L_{max} \sim 850 \text{ nm}$.

La première étape du protocole que nous avons utilisé consiste à incuber globalement les structures dans une solution de polylysine, afin d'obtenir une couche de polymères par adsorption sur les surfaces d'oxyde négativement chargées. La concentration caractéristique de la solution, c_0 , a été estimée à environ $800 \mu\text{M}$ en monomères lysine et est diluée dans un tampon phosphate PBS 0,1X, ayant une concentration globale en sel (essentiellement des ions chlorure et sodium) de l'ordre de 20 mM. Les conclusions du chapitre 4 ont montré que, dans nos expériences, la concentration c_0 correspondait à la saturation de la surface et à une densité surfacique de l'ordre de $50 \text{ lysines.nm}^{-2}$. En supposant une géométrie de type brosse de polymères, la densité surfacique de polylysine à saturation, notée $\tilde{\sigma}_{PLL}$, peut être obtenue en divisant la densité surfacique en monomères lysine par l'indice de polymérisation, N . $\tilde{\sigma}_{PLL}$ est trouvé compris entre 0,021 et 0,043 chaînes par nm^2 . Toujours dans une conformation de type brosse, il est également possible à partir de $\tilde{\sigma}_{PLL}$, d'estimer la distance moyenne entre chaînes, D , par la relation : $D = (\tilde{\sigma}_{PLL})^{-\frac{1}{2}}$, qui conduit à $D \sim 5 \text{ nm}$.

Dans [80], Odberg et collaborateurs relatent une étude par ellipsométrie de l'adsorption de chaînes polyacrylamide positivement chargées (masse molaire $\sim 5 \times 10^6 \text{ Da}$), sur des surfaces d'oxyde de silicium préalablement activées par un traitement dans un mélange d'eau oxygénée et d'acide chlorhydrique. Les résultats obtenus conduisent à une quantité adsorbée de l'ordre de 10^{-4} polymères par nm^2 , soit encore, avec un indice de polymérisation de $N \sim 60000$, 6 monomères par nm^2 . Cette valeur serait donc dix fois plus faible que l'estimation que nous avons obtenue. Cependant, le taux d'adsorption dépend fortement de la concentration en sel et du pH, ainsi que de la charge du polymère étudié. D'autre part, en 2004, Biesalski et collaborateurs [89] ont étudié les changements de conformations de brosses de polyélectrolytes fixées par une extrémité et de manière covalente sur une surface, en fonction de la nature et de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure dans lequel elles sont immergées. La détermination des masses molaires (comprises entre 1,2 et 2,6 MDa) des polymères utilisés par chromatographie d'exclusion et les mesures de l'épaisseur des couches par ellipsométrie dans un environnement sec, conduisent à des densités surfaciques de polymères greffés, $\tilde{\sigma}$ de l'ordre de $0,013 \text{ nm}^{-2}$ à $0,118 \text{ nm}^{-2}$.

Les ordres de grandeur caractérisant la couche de polylysine déposée sur la surface d'oxyde

apparaissent donc cohérents avec les valeurs typiquement trouvées dans la littérature et obtenus sur des systèmes proches ou similaires. Certains des travaux cités précédemment seront détaillés au paragraphe 6.1.3

Mesures ellipsométriques de l'épaisseur de la couche de polylysine déposée

Afin d'obtenir un ordre de grandeur de l'épaisseur de la couche de polylysine déposée, des mesures ellipsométriques ont été entreprises. Ces expériences ont été réalisées grâce au concours de Gérard Vuye et d'Eric Charon du laboratoire d'optique des solides de Paris VI. L'ellipsométrie permet de mesurer les changements de polarisation d'un faisceau lumineux réfléchi sur une surface, les modifications engendrées étant très sensibles à la présence d'une fine couche de matériau ou de molécules adsorbée. De manière simplifiée, l'ellipsométrie donne accès au rapport complexe, $\rho = \frac{R_p}{R_s}$, R_p et R_s étant les coefficients de réflexion complexes associés respectivement à une polarisation parallèle (p) et perpendiculaire (s) au plan d'incidence. En notation complexe, ρ est conventionnellement exprimé sous la forme $\tan(\psi)e^{i\Delta}$, où Δ et ψ sont les grandeurs mesurées par l'ellipsomètre. A partir de ces valeurs, il est possible de déterminer l'épaisseur et l'indice optique d'une couche déposée sur un substrat, moyennant la connaissance des propriétés optiques de ce dernier. Dans l'appareil que nous avons utilisé, l'échantillon peut être éclairé par un faisceau de lumière blanche sous différents angles d'incidence. La lumière réfléchie passe à travers un spectromètre, permettant d'obtenir, pour un angle donné, les variations de Δ et ψ en fonction de la longueur d'onde, dans la gamme $[0,3 \mu\text{m}; 0,8\mu\text{m}]$. Les résultats obtenus par ellipsométrie peuvent être dépendants du modèle choisi pour ajuster les spectres. L'utilisation de différentes longueurs d'onde et de plusieurs angles d'incidence permet de s'assurer de la cohérence des résultats.

Les échantillons testés ont été préparés sur des lamelles de silicium, recouvertes d'une couche de SiO_2 de même nature que celui utilisé dans la fabrication des réseaux de transistors², et toutes les mesures ont été effectuées à sec. En un premier temps, les spectres de deux échantillons différents, non recouverts de polylysine, ont été mesurés, avec, à chaque fois, deux angles d'incidence différents. Ceci a permis de constituer une référence. Les résultats ont systématiquement conduit à des épaisseurs de la couche d'oxyde d'environ 100 ± 4 nm, avec des indices optiques de l'ordre de 1.457, ordres de grandeur cohérents avec les valeurs fournies par le groupe de P. Fromherz. En un deuxième temps, deux autres lamelles ont été incubées dans une solution de polylysine de concentration c_0 , rincées et séchées sous un jet d'air comprimé, puis positionnées directement sous le faisceau lumineux de l'ellipsomètre. Les spectres associés ont été mesurés en utilisant successivement les deux mêmes angles d'incidence que pour la référence. Nous avons ajusté les résultats en utilisant un modèle à trois couches³ prenant en compte le substrat de silicium, la couche d'oxyde caractérisée par les paramètres issus des mesures de référence, et la couche de polylysine supposée d'épaisseur L_{el} et d'indice n_{el} . Les quatre mesures ont fait apparaître l'exis-

²Ces lamelles test ont été fabriquées par l'équipe de P. Fromherz, à Munich. L'épaisseur de la couche d'oxyde de silicium y a été caractérisée par ellipsométrie indépendamment de la mesure que nous avons effectuée, et a été estimée à 100 nm environ. Toutes les lamelles ont été découpées dans un même bloc et possèdent, a priori, les mêmes caractéristiques.

³Le modèle de couche dense utilisé pour ajuster les spectres expérimentaux, et caractérisé par l'utilisation d'un indice optique constant, nécessiterait éventuellement d'être corrigé. En effet, l'indice local dans la couche, dépend de la fraction volumique de polymères, qui varie avec la distance à la surface. L'utilisation d'un indice moyen constant, entraîne a priori une erreur qui ne semble cependant pas pouvoir remettre en question les ordres de grandeur obtenus lors des mesures que nous avons effectuées (cf [89]).

tence d'une couche "épaisse", L_{el} valant respectivement, dans chacune des expériences, 532 ± 2 nm, 533 ± 2 nm, 540 ± 1 nm, 538 ± 1 nm (les indices sont trouvés compris entre 1,451 et 1,462).

Dans [89], les auteurs ont mesuré, par ellipsométrie et dans un environnement sec, les épaisseurs de brosses de polymères fixées de manière covalente par une extrémité sur un substrat. Les masses molaires des polymères sont environ dix fois supérieures à celle de la polylysine que nous utilisons. Les épaisseurs ellipsométriques obtenues varient entre 20 et 220 nm suivant la nature chimique de la solution saline utilisée lors de la préparation. Cependant, il est à noter que nos expériences ont été menées dans une salle climatisée, possédant un taux d'humidité de l'air très important⁴. Bien que les mesures aient été réalisées dans "un environnement sec", sans immersion de l'échantillon dans une solution, l'état de la couche de polymères n'est pas clairement défini. Il n'est pas exclu que les caractéristiques mesurées correspondent à une structure "gonflée" présentant des queues libres⁵. Ces résultats indiquent globalement l'existence d'une couche épaisse, vraisemblablement liée à la présence de chaînes de polymères étirées au sein de la couche de polylysine. Par manque de temps, il n'a pas été possible de mener plus avant ces caractérisations et notamment d'essayer de mettre en évidence une éventuelle influence de l'environnement de mesure.

6.1.3 Variations de l'épaisseur de couches de polyélectrolytes en fonction de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure

Quelques articles ont relaté la mise en évidence expérimentale de variations de l'épaisseur d'une couche de polyélectrolytes, déposée sur une surface, en fonction de la force ionique de la solution dans laquelle elle est immergée. En particulier, dans le cas de brosses de macromolécules chargées, greffées par une extrémité sur un substrat, une diminution importante de l'épaisseur du système lors de l'augmentation de la concentration en contre-ions dans son environnement, a d'abord été prévue théoriquement avant d'être mise en évidence expérimentalement. Cette section expose certains de ces résultats présentant des similitudes avec les observations expérimentales que nous avons effectuées.

En 1995, Odberg et collaborateurs [80] ont étudié par ellipsométrie l'influence de la concentration d'un électrolyte de chlorure de sodium sur l'épaisseur d'une couche de polyélectrolytes positivement chargés (polyacrylamides substitués, masse molaire de l'ordre de 5 MDa), préalablement adsorbés sur un substrat d'oxyde de silicium. Il apparaît un doublement de l'épaisseur de la couche entre 1 et 500 mM. Ce phénomène est attribué à une diminution de l'influence de la charge de la surface d'oxyde, lors de l'augmentation de la concentration en sel. En 1999, les mêmes auteurs ont publié un autre article dans lequel ils ont étudié un système qui ne diffère du précédent que par l'introduction de particules colloïdales, négativement chargées, dans la solution utilisée pour déposer le polymère. Après rinçage, l'augmentation de la concentration d'un électrolyte de NaCl pur (sans particules colloïdales), provoque une diminution d'un facteur

⁴Ces expériences ont été réalisées par une belle journée d'été, la température extérieure étant supérieure à 30°C. Le taux d'humidité dans la salle climatisée était vraisemblablement très important.

⁵Dans une solution à très faible teneur en sel (régime dit osmotique), les répulsions électrostatiques entre monomères provoquent un étirement des molécules. L'épaisseur de la couche est alors de l'ordre de celle d'une chaîne étirée, qui, d'après [88, 89], peut être estimée par la formule $L_{max} \simeq au^{\frac{1}{3}}f^{\frac{2}{3}}N$, u désignant le rapport entre la longueur de Bjerrum et la longueur a d'un monomère et f , la fraction de monomères chargés dans le polymère constitué de N monomères. Cette évaluation conduit, avec $f = 1$, à $L_{max} \sim 850$ nm, supérieur à $L_{el} \sim 530$ nm.

cinq de l'épaisseur de la couche, toujours dans la gamme [1 mM, 500 mM]. Parallèlement à ces études, Pincus [78] a développé, en 1991, une théorie d'échelle modélisant le comportement d'une brosse de polymères chargés en fonction de la concentration d'un électrolyte 1:1. Il ressort de ce travail que pour de faibles concentrations, les effets d'écrantage restent localisés à l'extérieur de la brosse et l'épaisseur de cette dernière reste constante. Si la concentration extérieure augmente et devient de l'ordre de grandeur de celle des contre-ions déjà présents à l'intérieur de la brosse⁶, la pression osmotique responsable de l'étirement des chaînes diminue. Cette variation, bien que contre-balancée par le terme d'élasticité entropique, provoque l'effondrement. Globalement, deux régimes peuvent être distingués : le premier à bas sel, dit régime osmotique, dans lequel les chaînes sont étirées, ce qui conduit à une épaisseur de la brosse, $L \simeq Naf^{\frac{1}{2}}$ (f désigne la fraction de monomères chargés), et le second, à haut sel, dit régime d'écrantage fort, dans lequel $L \propto Naf^{\frac{2}{3}}\tilde{\sigma}^{\frac{1}{3}}c_S^{-\frac{1}{3}}$, où $\tilde{\sigma}$ désigne la densité surfacique des points d'ancrage des polymères sur la surface, f la fraction de monomères chargés, a la longueur d'un monomère, N l'indice de polymérisation et c_S , la concentration de l'électrolyte environnant. Ce modèle prévoit donc, lors d'une augmentation de la concentration en sel, une diminution de $L \propto c_S^{-\frac{1}{3}}$. La vérification expérimentale de cette théorie a été rendue compliquée du fait de la difficulté qu'il y a à préparer des systèmes de brosses. Dans [90], Tran et collaborateurs ont étudié le comportement d'une brosse de polystyrène portant des groupes sulfonate, greffée sur une surface de silicium recouverte d'une couche d'oxyde à l'état natif. Des mesures effectuées par diffusion de neutrons, font apparaître une épaisseur constante de la brosse pour des concentrations en NaCl inférieures à 1 M, puis une décroissance de l'épaisseur suivant une loi de type $L \propto c_S^{-\frac{1}{3}}$ jusqu'à 10 M.

En 2004, Biesalski et collaborateurs [89] ont étudié, par ellipsométrie, le comportement d'une brosse de polymères (polyvinylpyridine converti en polyélectrolyte positivement chargé par une réaction de quaternisation) attachée de manière covalente sur une surface d'oxyde de silicium. Les résultats sont présentés sur la figure 6.2. Le comportement de la brosse dépend de la nature chimique des contre-ions en présence. Dans tous les cas, il apparaît l'existence d'une concentration seuil prévue théoriquement. Au-delà de cette limite, la brosse de polymères "s'effondre" en suivant une loi de la forme $L \propto c_S^{-\frac{1}{3}}$ dans le cas des ions bromure et chlorure. En ce qui concerne les ions iodure, la diminution de l'épaisseur de la couche ne semble pas pouvoir être modélisable par cette relation.

Ces résultats présentent des similitudes avec l'évolution des variations de tension des zones polylysine détaillées au chapitre précédent. Il y est notamment apparu l'existence d'une concentration seuil d'environ 10 mM, correspondant à l'ordre de grandeur de la concentration en sel de la solution utilisée pour déposer la polylysine (20 mM), et au-delà de laquelle les courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([KCl])$ associées à la polylysine ne suivent plus le comportement prévu dans le cadre du modèle σ_{eff} constant. Ce changement a été interprété comme dû à l'apparition de phénomènes physiques intervenant dans le volume de la couche de polylysine, et entraînant une modification du paramètre σ_{eff} , ne pouvant plus être considéré comme constant. Des variations de l'épaisseur de la couche de polylysine à partir d'une concentration seuil, pourraient éventuellement être à l'origine d'un tel effet. Il est cependant à noter que la comparaison entre les résultats obtenus lors des expériences de détection électronique et les effets induits par un effondrement de la couche de polylysine, nécessite la mise en place d'un modèle permettant de relier les carac-

⁶Les contre-ions présents à l'intérieur de la brosse proviennent de la solution utilisée lors de la phase de dépôt.

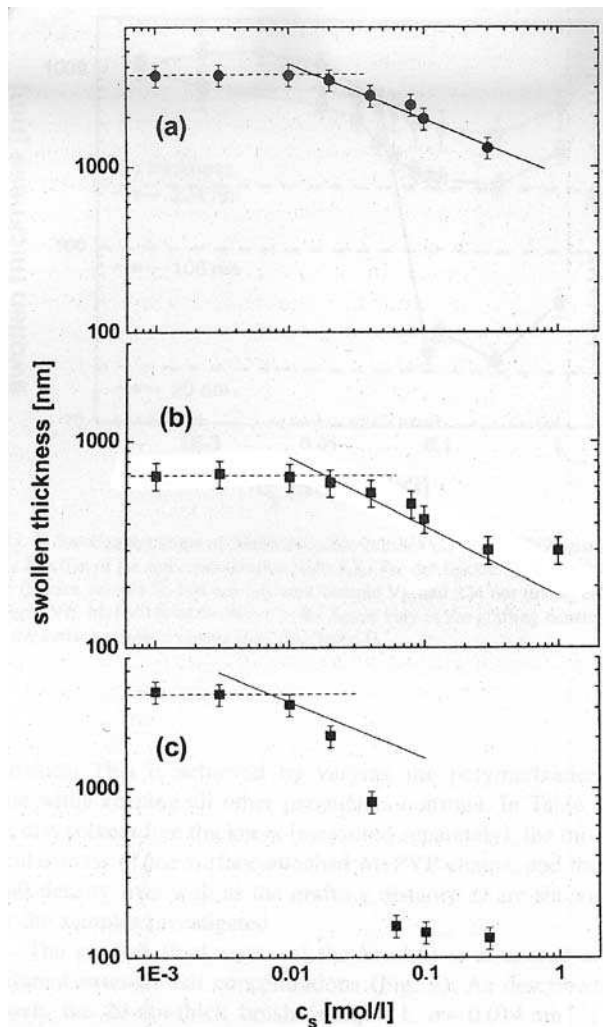


FIGURE 6.2: Variations de l'épaisseur d'une brosse de polyélectrolytes, greffée sur une surface d'oxyde de silicium, lors de l'augmentation de la concentration de trois électrolytes de mesure différents. En haut : brosse de polyvinylpyridine (PVP), initialement préparée dans une solution contenant des ions chlorure. Le système est ensuite rincé et des mesures ellipsométriques successives de l'épaisseur, sont réalisées en augmentant progressivement la concentration d'un électrolyte "extérieur" de chlorure de sodium. L'épaisseur de la brosse, L_{sec} , mesurée dans un environnement sec, a donné 21 nm. Au milieu : brosse de PVP, préparée dans une solution contenant des ions bromure. Electrolyte de mesure extérieur : KBr, $L_{sec} = 62$ nm. En bas : brosse de PVP, préparée dans une solution contenant des ions iodure. Electrolyte de mesure extérieur : KI, $L_{sec} = 74$ nm. Les traits continus représentent l'évolution théorique : $L \propto c_S^{-\frac{1}{3}}$. Figure extraite de [89].

téristiques physiques de la couche de polymères à la différence de potentiel entre la surface des capteurs et le volume de l'électrolyte. Cet aspect sera détaillé au paragraphe 6.2.3.

De manière générale, les résultats relatés dans les différentes publications apparaissent globalement différents. Cela laisse supposer que l'évolution du système puisse dépendre de nombreux

paramètres : nature des contre-ions présents dans la solution de dépôt et dans l'électrolyte extérieur, nature du polyélectrolyte, voire même du substrat utilisé.

6.2 Analyses complémentaires du comportement de la polylysine à haut sel

Les résultats tirés de la littérature et exposés précédemment, nous ont suggérés quelques analyses complémentaires qui vont être détaillées dans ce paragraphe. La première partie présente une étude de l'influence de la charge de canal du transistor sur le phénomène d'inversion de pics. La seconde section est consacrée au comportement de la polylysine lors de l'utilisation d'un électrolyte de nitrate de potassium, différent de la solution de mesure de KCl utilisée jusqu'à présent. Enfin la dernière partie reviendra sur une description théorique du système FET/polylysine/électrolyte que nous avons développée et qui permettra d'introduire l'influence d'une variation d'épaisseur de la couche de polylysine sur les évolutions des variations de tension $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f([\text{KCl}])$.

6.2.1 Influence de la charge de canal

Toutes les analyses menées dans les chapitres précédents ont été réalisées en utilisant le point de fonctionnement ($I_{SD} = 50 \mu A$, $U_{SD} = 1,2 \text{ V}$) pour déterminer les variations de la tension U_{SE} , lors de modifications des caractéristiques des différents transistors d'un même réseau. D'après les explications fournies dans l'appendice C, le couple (I_{SD} , U_{SD}) détermine complètement la valeur de la charge de canal, σ_S . Une éventuelle influence de σ_S sur le comportement de la polylysine dans la gamme haut sel, peut donc à priori être mise en évidence en traçant les courbes $(\Delta U_{SE})_{SiO_2}^{PLL} = f([\text{KCl}])$ pour différents points de fonctionnement. Cette étude a été réalisée à partir de l'expérience présentée dans le paragraphe 5.2.1 du chapitre 5 (figure 5.7). Les graphiques 6.3 donnent l'allure des différences $(\Delta U_{SE})_{SiO_2}^{PLL} = f([\text{KCl}])$ pour des valeurs de U_{SD} valant 0,2 V, 1,2 V et 2,2 V et des valeurs de I_{SD} variant entre 10 μA et 110 μA .

Le résultat des évaluations des coefficients directeurs relatifs associés aux différents couples (I_{SD} , U_{SD}) donne, pour $U_{SD} = 0,2 \text{ V}$ (figure 6.3.(a)), une valeur moyenne de $-49,3 \pm 2,0 \text{ mV}$ par décade de concentration, pour $U_{SD} = 1,2 \text{ V}$ (figure 6.3.(b)), une valeur moyenne de $-49,5 \pm 1,5 \text{ mV}$ par décade et pour $U_{SD} = 2,2 \text{ V}$ (figure 6.3.(c)), une valeur moyenne de $-50,3 \pm 2,9 \text{ mV}$ par décade. Les barres d'erreur peu importantes indiquent, que pour une valeur de U_{SD} donnée, les écarts moyens de tension entre la zone polylysine et la zone SiO_2 varient peu en fonction du courant. Toutes les moyennes étant très proches, les coefficients directeurs relatifs ne semblent pas dépendre du point de fonctionnement choisi. On peut cependant remarquer sur les graphiques de la figure 6.3, qu'à U_{SD} donné, l'augmentation de I_{SD} entraîne un décalage négatif des différentes courbes. Ceci traduit un phénomène d'inversion de pics (valeurs de $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ devenant négatives) apparaissant pour des concentrations en KCl de plus en plus petites lorsque I_{SD} augmente (à U_{SD} donné). Le seuil de concentration à partir duquel se manifeste l'inversion de pics semble donc légèrement dépendre du point de fonctionnement choisi. Les coefficients directeurs relatifs restant cependant identiques, l'évolution globale de la couche de polylysine dans la gamme haut sel n'apparaît pas dépendre de la charge de canal.

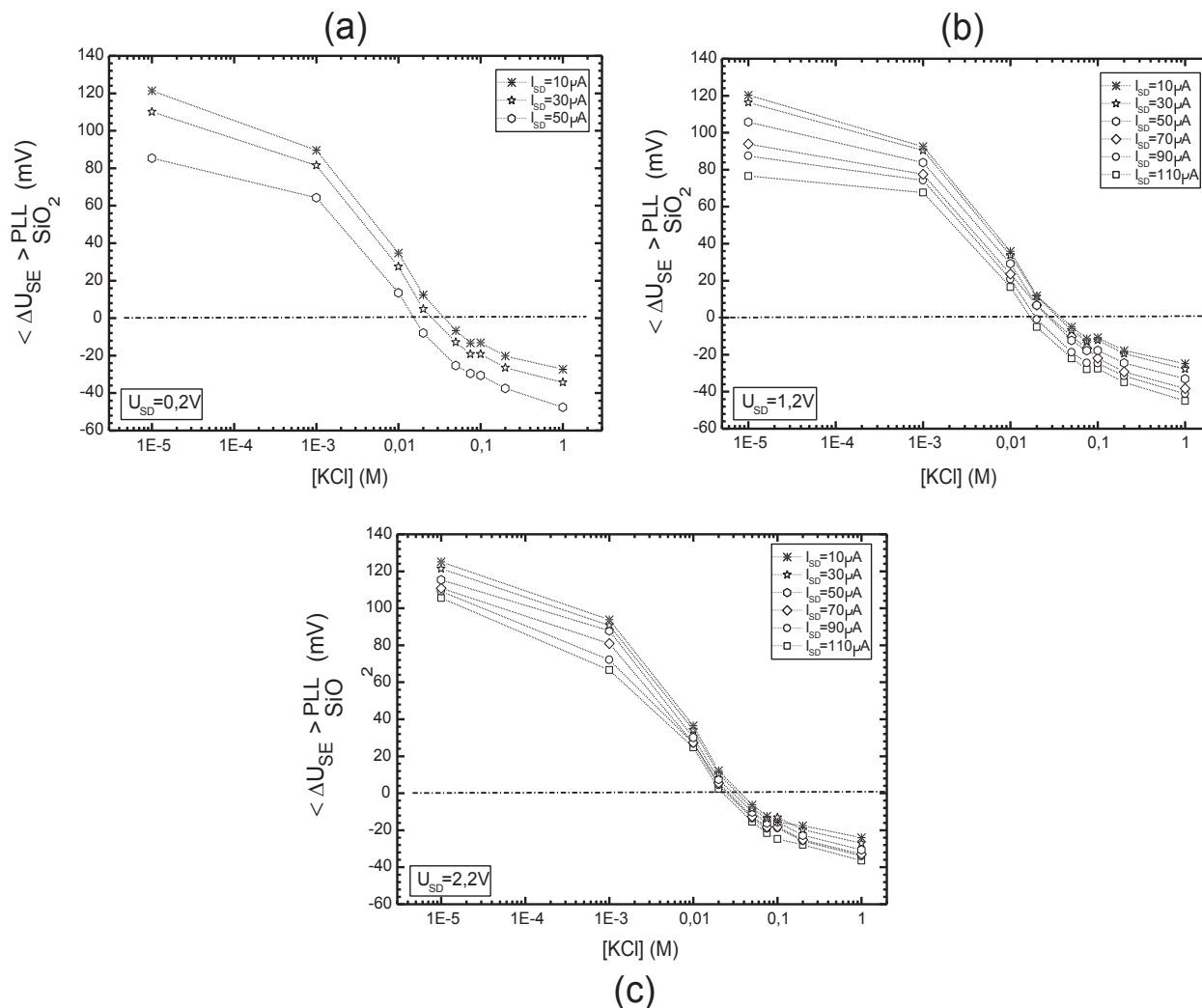


FIGURE 6.3: Courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL} = f([KCl])$ calculées pour des points de fonctionnement (I_{SD}, U_{SD}) différents. (a) $U_{SD} = 0,2 V$. (b) $U_{SD} = 1,2 V$. (c) $U_{SD} = 2,2 V$. Les valeurs de I_{SD} correspondant à chaque courbe sont précisés sur les graphiques.

6.2.2 Influence de la nature de l'électrolyte de mesure

La nature des contre-ions introduits dans le bain de mesure est un paramètre expérimental qui n'a pas été varié jusqu'à présent, puisque toutes les manipulations ont été effectuées dans une solution de chlorure de potassium (KCl). Etant donné les résultats présentés dans le paragraphe 6.1.3, il est apparu intéressant d'essayer de mettre en évidence une éventuelle influence de la nature de l'électrolyte de mesure utilisé sur le comportement de la polylysine à haut sel. Cette section présente les résultats que nous avons obtenus avec un électrolyte de nitrate de potassium (KNO_3). La polylysine étant positivement chargée, il a été choisi de modifier l'espèce cationique. Par ailleurs les ions chlorure et nitrate, ayant respectivement des tailles caractéristiques de l'ordre de 0,18 nm et 0,25 nm, présentent des propriétés physico-chimiques différentes : l'ion chlorure, très électronégatif, est considéré comme "actif" tandis que l'ion nitrate est plus inerte chimiquement.

Les manipulations faisant intervenir un électrolyte de nitrate de potassium ont nécessité quelques aménagements du système de détection. En particulier, l'électrode que nous avons utilisée jusqu'à présent avec le chlorure de potassium, est constituée d'un microfil d'argent sur lequel a été déposé du chlorure d'argent à l'état solide. L'ensemble trempe directement dans la solution de KCl et le potentiel entre le volume de l'électrolyte et le corps métallique de l'électrode dépend de la concentration des ions chlorure. En présence de KNO_3 , son utilisation entraînerait la dissolution du chlorure d'argent solide (cf appendice C, paragraphe corrections de solubilité) dans l'électrolyte et l'apparition d'une différence de potentiel, électrode / solution non contrôlée. Pour remédier à ce problème, il est possible d'utiliser une électrode de référence, dont le potentiel est indépendant de la nature chimique et notamment de la concentration en ions chlorure de l'électrolyte dans lequel elle est immergée. Cette microélectrode d'argent a été développée au laboratoire d'énergétique et réactivité aux interfaces de Paris 6, et nous a été prêtée par le professeur Letellier. Elle est constituée d'un microfil d'argent (cf figure 6.4) trempant dans une solution saturée de chlorure de potassium.

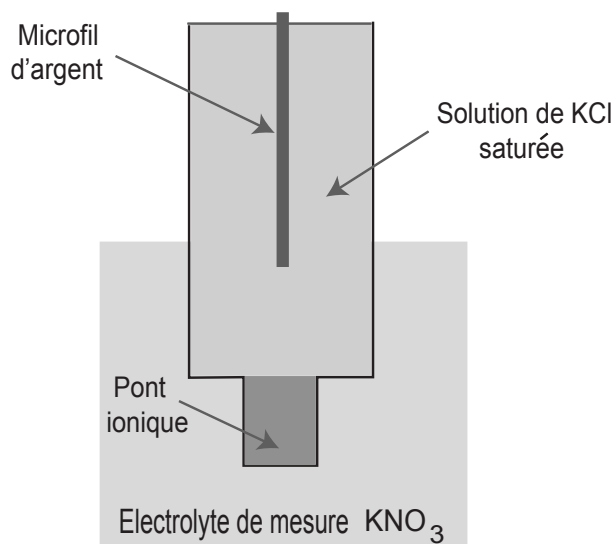


FIGURE 6.4: Schéma de l'électrode d'argent utilisée lors des mesures effectuées dans un électrolyte de KNO_3 .

La principale différence avec l'électrode que nous avons régulièrement utilisée, réside dans l'existence d'une gaine plastique permettant d'isoler la partie microfil d'argent/solution de KCl de l'électrolyte extérieur de KNO_3 dans lequel l'ensemble est immergé. Lors de son utilisation, un pont ionique situé à l'extrémité de la gaine et contenant un gel polymère, permet une circulation d'ions assurant la fermeture du circuit électrique. Le fil d'argent trempant en permanence dans une solution saturée en KCl de concentration fixée, la différence de potentiel existant entre le corps métallique et l'électrolyte de mesure extérieur reste constante, indépendamment des changements pouvant intervenir dans la solution de mesure.

Les courbes rouges de la figure 6.5 présentent une série d'augmentations de la concentration d'un électrolyte de nitrate de potassium pur, effectuée sur un réseau de 29 FETs préparé en incubant un macrodépôt de polylysine (concentration c_0 ; volume déposé de $1 \mu\text{L}$; temps d'incubation en chambre humide : 20 mn) sur la partie droite du réseau, l'autre extrémité restant nue. La mesure de référence correspond à un enregistrement avant dépôt de polylysine, dans

une solution de KNO_3 pur, de concentration 1 mM. A l'issue de cette série d'augmentations, le réseau a été rincé, puis une seconde série a été effectuée en utilisant un électrolyte contenant des ions chlorure et des ions nitrate en proportions égales. A chaque étape de la deuxième série, la force ionique⁷ de la solution de mesure contenant KCl et KNO_3 , a été prise égale à celle de l'électrolyte de KNO_3 pur employé lors de la première série. Ceci permet d'obtenir les évolutions de la tension moyenne des zones polylysine et SiO_2 en fonction de la force ionique de la solution de mesure, la première fois pour un électrolyte de nitrate de potassium pur et la seconde pour un électrolyte contenant des ions chlorure et des ions nitrate en quantités égales. Les résultats correspondant à la deuxième série sont présentés en bleu sur le graphique 6.5.(a).

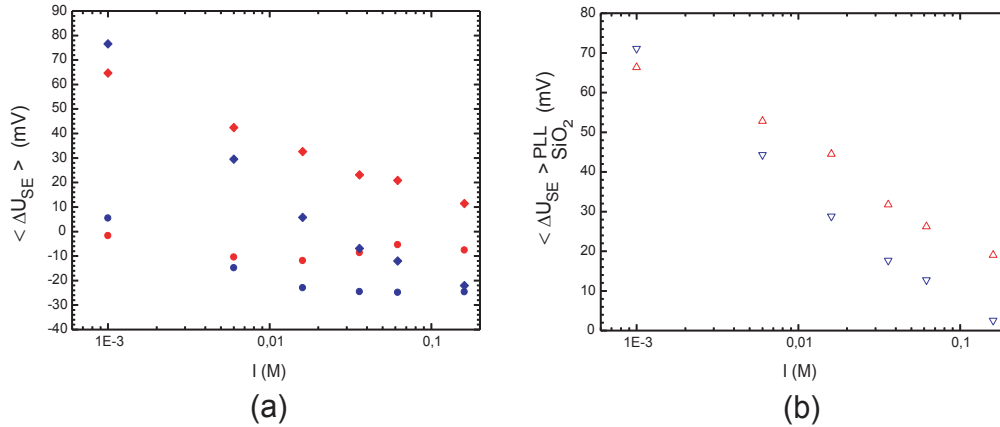


FIGURE 6.5: (a) : effets de la variation de la force ionique d'un électrolyte de nitrate de potassium (courbes rouges) et d'un électrolyte contenant des ions chlorure et des ions nitrate en proportions égales (courbes bleues), sur les variations de tension des différentes zones d'un réseau partiellement recouvert de polylysine. Les cercles correspondent à la zone SiO_2 et les losanges à la zone polylysine. Le fichier de référence a été enregistré dans KNO_3 pur à 1 mM. Les caractéristiques sont traitées au point de fonctionnement ($I_{SD} = 50 \mu\text{A}$; $U_{SD} = 1,2 \text{ V}$). (b) : différences de tension moyennes, entre les zones polylysine et SiO_2 , associées aux expériences de la figure a. En rouge, série effectuée avec l'électrolyte de nitrate de potassium pur ; en bleu, celle réalisée avec l'électrolyte contenant les ions nitrate et chlorure.

Par rapport aux expériences réalisées précédemment avec un électrolyte de KCl pur, l'utilisation d'une électrode de référence entraîne une disparition du terme de Nernst, qui engendrait une variation de tension de 60 mV par décade. Dans cette configuration, les courbes expérimentales $\langle \Delta U_{SE} \rangle = f(I)$ permettent donc une visualisation directe des modifications des différences de potentiel associées aux termes de couche condensée et de couche diffuse. Lors de la série effectuée avec le nitrate de potassium pur, la tension correspondant à la zone SiO_2 (courbe en cercles rouges de la figure 6.5.(a)) reste quasiment constante puisqu'à priori, dans la gamme [1 mM, 100 mM], les effets de changement de concentration de l'électrolyte, essentiellement localisés dans la couche diffuse, sont très faibles. Par contre, la décroissance de l'ordre de 30 mV, qui apparaît entre 1 mM et 20 mM sur la zone SiO_2 , lors de la deuxième série (courbe en cercles bleus de la figure 6.5.(a)) est plus difficile à expliquer. L'augmentation de la force ionique induit, aussi bien

⁷ Afin de rendre compte de la concentration globale en ions d'une solution contenant différentes espèces, il est possible de définir la force ionique, I , du système par $I = \frac{1}{2} \sum (c_i z_i^2)$ où c_i et z_i désignent les concentrations et les charges des différentes espèces ioniques, i , de la solution.

avec KNO_3 pur qu'avec l'électrolyte contenant les ions nitrate et chlorure, une diminution de la différence de tension moyenne entre les zones SiO_2 et polylysine, se traduisant par un rapprochement des courbes en cercles et en losange de la figure 6.5.(a). Cependant, dans la première série d'expériences, pour $I = 100$ mM, la zone polylysine est encore environ 20 mV au dessus de la zone SiO_2 , tandis que dans la seconde, la différence de tension entre les deux zones est proche de zéro. Ce dernier effet correspond à une décroissance plus rapide en fonction de I , de la différence de tension zone polylysine / zone SiO_2 en présence d'ions chlorure, qu'avec le nitrate de potassium pur. Les graphiques $(\Delta U_{SE})_{\text{SiO}_2}^{PLL} = f(I)$ de la figure 6.5.(b) montrent clairement cet effet. Le coefficient directeur relatif associé à KNO_3 pur est trouvé égal à -44,4 mV par décade (courbe rouge) et celui obtenu avec l'électrolyte contenant des proportions égales d'ions nitrate et chlorure vaut -62,2 mV par décade (courbe bleue).

Le manque de structures n'a pas permis une analyse complète de ce phénomène. Les cercles de couleur de la figure 6.6 représentent l'ensemble des mesures $(\Delta U_{SE})_{\text{SiO}_2}^{PLL} = f([\text{KNO}_3])$ que nous avons recueilli, pour différentes concentrations d'un électrolyte de KNO_3 pur. Ces données ont été collectées à partir de dix expériences réalisées sur cinq structures. Afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de comportement entre les études effectuées dans une solution de KCl et dans une solution de KNO_3 , les résultats des mesures $(\Delta U_{SE})_{\text{SiO}_2}^{PLL} = f([\text{KCl}])$ déjà présentés au chapitre 5, ont été tracés en cercles noirs sur la figure 6.6.

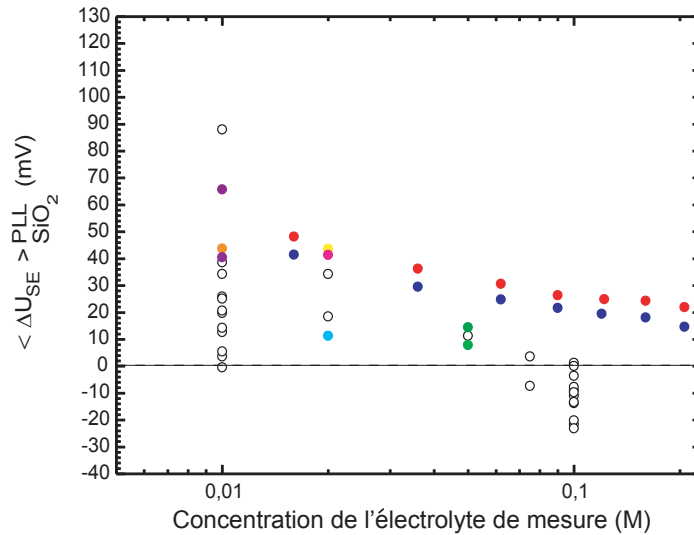


FIGURE 6.6: Comparaison des évolutions des différences de tension $(\Delta U_{SE})_{\text{SiO}_2}^{PLL} = f(\text{Concentration de l'électrolyte})$, mesurées d'une part dans un électrolyte de KNO_3 pur (cercles colorés) et d'autre part dans un électrolyte de KCl pur (cercles noirs). Pour les expériences effectuées dans KNO_3 pur, chaque couleur correspond à une expérience différente.

Etant donné le peu de points de mesure, il apparaît difficile de conclure de manière définitive. Il semble cependant que la nature des contre-ions présents dans la solution de mesure ait une réelle influence sur le phénomène d'inversion de pics. On peut notamment remarquer que sur les courbes rouge et bleu de la figure 6.6, la différence de tension entre les zones polylysine et SiO_2 est encore de l'ordre de 20 mV à 200 mM en KNO_3 . Cette valeur de l'amplitude des pics de polylysine est celle qui est observée vers 10 mM dans une solution de KCl (cf cercles noirs).

Il semblerait donc que le phénomène d'inversion de pics soit "repoussé" à des concentrations beaucoup plus élevées lors de l'utilisation d'ions nitrate.

6.2.3 Un modèle simple

Le phénomène d'effondrement d'une brosse de polymères décrit dans la littérature, présente les similitudes suivantes avec les observations expérimentales sur le comportement de la polylysine dans la gamme haut sel : existence d'une concentration seuil, phénomène dépendant de la nature et de la concentration en contre-ions de l'électrolyte de mesure utilisé. La comparaison de nos résultats avec une description théorique prenant en compte une loi de variation de l'épaisseur de la couche de polyélectrolytes de la forme⁸ $L \propto c_S^{-\frac{1}{3}}$ (loi de Pincus [78]), nécessite une expression permettant de relier l'épaisseur de la couche de polymères à la différence de potentiel existant entre la surface d'oxyde et le volume de l'électrolyte de mesure, loin de l'interface. Il ressort de la littérature [86, 88, 91], qu'une modélisation de l'écrantage des molécules de polylysine par les contre-ions de l'électrolyte fondée sur la théorie de Gouy-Chapman apparaît avoir une portée limitée. En effet, cette approximation de champ moyen reste valable tant que la longueur de Gouy-Chapman⁹ reste supérieure à la distance moyenne entre macromolécules. Au-delà, la description Poisson-Boltzmann ne semble plus pouvoir s'appliquer car les répulsions électrostatiques entre molécules deviennent dominantes et imposent une organisation forte des polyélectrolytes sur la surface. Le modèle champ moyen ne peut alors plus décrire ces phénomènes, car il ne prend pas en compte l'existence de corrélations fortes entre macromolécules. La mise en place d'une telle modélisation sortant du cadre du travail présenté dans ce manuscrit, nous avons développé une description de l'interface SiO₂/couche de polylysine/électrolyte, dérivée d'une analyse fondée sur la théorie de Gouy-Chapman linéarisée. Ce modèle simple sera présenté dans la première partie de ce paragraphe. Les résultats obtenus permettront, en un deuxième temps, de comparer les courbes expérimentales $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL} = f(c_S)$ avec les prévisions théoriques issues de la modélisation.

Dans cette nouvelle description, la couche de polylysine est supposée d'épaisseur L et est modélisée par une distribution volumique de charges de densité $\rho = Ne$, positive (N désigne la concentration volumique de charges dans la couche) et de permittivité relative ϵ_r' . Cette couche est déposée sur un plan portant une densité surfacique de charges σ_0 , négative, positionnée en $x=0$, et est immergée dans un électrolyte 1:1 (permittivité $\epsilon_r = 80$, concentration c_S) occupant tout le demi-espace $x > L$. Les caractéristiques du modèle sont rassemblées sur la figure 6.7.

L'équation de Gouy-Chapman, appliquée aux deux régions ($0 < x < L$) et ($x > L$), permet de décrire l'évolution du potentiel $\phi(x)$ par le système d'équations :

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = \frac{2ec_S}{\epsilon_0\epsilon_r'} \sinh\left(\frac{e\phi}{kT}\right) - \frac{eN}{\epsilon_0\epsilon_r'} \quad \text{pour } 0 < x < L \quad (6.1)$$

⁸Dans toute la suite, L désignera l'épaisseur de la couche de polylysine et c_S , la concentration en contre-ions de l'électrolyte extérieur.

⁹La longueur de Gouy-Chapman est définie par $\lambda_{GC} \simeq \frac{e}{2\pi l_B f N \sigma}$, $l_B = \frac{e^2}{\epsilon kT}$ désignant la longueur de Bjerrum (l'énergie d'interaction électrostatique entre deux charges élémentaires e , séparées par la longueur de Bjerrum dans un solvant de permittivité diélectrique ϵ , est égale à l'énergie d'agitation thermique kT), f la fraction de monomères chargés et σ la densité surfacique de charges de polymères.

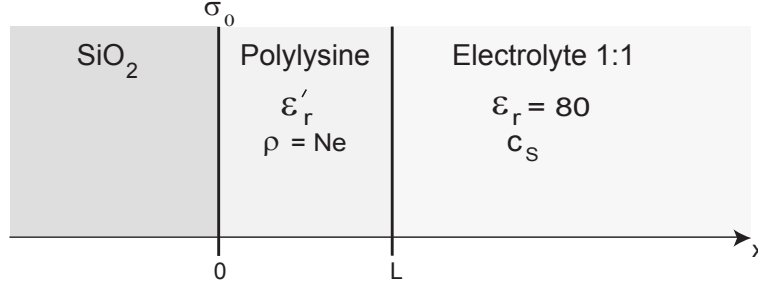


FIGURE 6.7: Caractéristiques du modèle retenu afin de décrire l'écrantage, par un électrolyte de type 1 : 1 (concentration c_S), d'une couche de polylysine d'épaisseur finie, L , déposée sur une surface chargée négativement.

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = \frac{2ec_S}{\epsilon_0\epsilon_r} \sinh\left(\frac{e\phi}{kT}\right) \quad \text{pour } L < x < \infty \quad (6.2)$$

Le potentiel de couche diffuse restant faible à haut sel (de l'ordre de quelques millivolts, cf chapitre 5 et paragraphe 6.1.1), il apparaît légitime de développer une approche fondée sur la linéarisation des équations 6.1 et 6.2, en supposant $|\frac{e\phi}{kT}| \ll 1$. L'introduction des longueurs de Debye dans la couche de polylysine¹⁰ $\lambda_{D'} = \sqrt{\frac{\epsilon_0\epsilon_r kT}{2e^2 c_S}}$ et dans l'électrolyte : $\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0\epsilon_r kT}{2e^2 c_S}}$, permet alors de réécrire le système sous la forme :

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = \frac{1}{\lambda_{D'}^2} \phi - \frac{\rho}{\epsilon_0\epsilon_r'} \quad \text{pour } 0 < x < L \quad (6.3)$$

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = \frac{1}{\lambda_D^2} \phi \quad \text{pour } L < x < \infty \quad (6.4)$$

La forme des solutions est imposée par les conditions aux limites : $\epsilon_{r'} \left(-\frac{d\phi}{dx}\right)_{x=0+} = \sigma_0\epsilon_{r'}$, $\epsilon_{r'} \left(-\frac{d\phi}{dx}\right)_{x=L-} = \epsilon_r \left(-\frac{d\phi}{dx}\right)_{x=L+}$, $\phi(L^-) = \phi(L^+)$, $\phi(\infty) = 0$, $\left(\frac{d\phi}{dx}\right)_{x=\infty} = 0$.

La résolution analytique complète de ce système est possible. Cependant, les hypothèses simplificatrices : $\lambda_D = \lambda_{D'} = \lambda$ et $\epsilon_r = \epsilon_{r'} = \epsilon$ permettent d'alléger la forme des solutions tout en conservant leurs principales caractéristiques dans la gamme haut sel. Dans ces conditions, l'expression de la différence de potentiel $\phi(0) - \phi(\infty)$ est donnée par :

$$\phi(0) - \phi(\infty) = \frac{\sigma_0\lambda}{\epsilon_0\epsilon} + \frac{\rho\lambda^2}{\epsilon_0\epsilon} (1 - e^{-\frac{L}{\lambda}}) \quad (6.5)$$

¹⁰La longueur de Debye dans la couche fait, à priori, intervenir la concentration en contre-ions intérieure à la couche et non la concentration c_S de l'électrolyte à l'infini. Cependant, le modèle sera simplifié par la suite en posant : $\lambda_D = \lambda_{D'} = \lambda$.

En introduisant les densités de charges, $\sigma_{PLL} = \rho L$ et $\sigma_{PLL}^* = \frac{\lambda}{L}(1 - e^{-\frac{L}{\lambda}})\sigma_{PLL}$, correspondant à la densité surfacique de charges de la couche de polylysine, si elle était infiniment mince et située dans le plan $x = 0$, la chute de potentiel $\phi(0) - \phi(\infty)$ peut se réécrire sous la forme :

$$\phi(0) - \phi(\infty) = \frac{(\sigma_0 + \sigma_{PLL}^*)}{\epsilon_0 \epsilon} \lambda \quad (6.6)$$

Une augmentation de la concentration en sel, c_S , de l'électrolyte de mesure entraînant une diminution de $\lambda \propto c_S^{-\frac{1}{2}}$ d'après l'expression de la longueur de Debye, deux cas limites peuvent alors être considérés :

- **Limite bas sel : $\lambda \gg L$**

Dans cette situation, la longueur de Debye, λ est très supérieure à l'épaisseur L de la couche et les effets d'écrantage par l'électrolyte de mesure sont localisés dans la couche diffuse et n'interviennent pas dans le volume de la couche de polylysine. La situation est alors analogue à celle décrite par le modèle σ_{eff} constant, la couche de polylysine pouvant être caractérisée par une densité surfacique de charges équivalente, $\sigma_{PLL} = \rho L$ constante. Un développement limité au premier ordre¹¹ en $\frac{L}{\lambda}$ de l'expression 6.6 conduit à :

$$\phi(0) - \phi(\infty) = \left(\frac{\sigma_0 + \sigma_{PLL}}{\epsilon_0 \epsilon} \right) \lambda \quad (6.7)$$

Les longueurs de Debye pour des concentrations en sel de 0,1 mM, 1 mM et 10 mM valent respectivement 30 nm, 10 nm et 3 nm. Le chapitre 5 a montré que le phénomène d'inversion de pics apparaît pour des concentrations de l'électrolyte de mesure d'environ 10 mM, le comportement de la polylysine étant bien décrit par le modèle σ_{eff} constant pour des concentrations inférieures. Le seuil de 10 mM correspond a priori à la limite au delà de laquelle le modèle σ_{eff} constant n'est plus valable. Dans le cadre de la description présentée dans ce paragraphe, cette limite est donnée par $L \sim \lambda$. Le phénomène d'inversion de pics serait alors lié à l'écrantage d'une couche de quelques nanomètres d'épaisseur ($\lambda = 3$ nm à 10 mM). Cette valeur très éloignée de celle fournie par les mesures ellipsométriques (~ 500 nm), semble indiquer que les modifications engendrant l'inversion de pics ne concerne qu'une faible partie de la couche de polylysine, éventuellement la couche compacte, située immédiatement au voisinage de la surface d'oxyde. Dans ce cas, le modèle développé dans ce paragraphe présente une portée limitée, puisqu'il ne reflète que des variations de potentiel de couche diffuse. Ce point sera repris dans la discussion présentée à la fin de cette section.

- **Limite haut sel : $L \gg \lambda$**

Lorsque L devient de l'ordre de grandeur de λ , les effets d'écrantage commencent à intervenir dans la distribution de charges, ρ , modélisant la couche de polylysine. Pour $L \gg \lambda$, le terme $1 - e^{-\frac{L}{\lambda}}$ devient de l'ordre de 1 et l'équation 6.6 peut se réécrire :

¹¹L'équation 6.7 correspond à la linéarisation du terme $\frac{2KT}{e} \operatorname{ash}\left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{8KT\epsilon_0\epsilon c_S}}\right)$, obtenu dans le modèle σ_{eff} constant, en posant $\sigma_{eff} = \sigma_0 + \sigma_{PLL}$.

$$\phi(0) - \phi(\infty) = \frac{\sigma_0 \lambda}{\epsilon_0 \epsilon} + \frac{\sigma_{PLL} \lambda^2}{\epsilon_0 \epsilon L} = \left(\frac{\sigma_0 + \sigma_{PLL} \frac{\lambda}{L}}{\epsilon_0 \epsilon} \right) \lambda \quad (6.8)$$

Dans la limite haut sel et pour une couche de polylysine d'épaisseur constante, ce modèle prévoit donc une diminution de la charge effective du système SiO₂/polylysine lors d'une augmentation de la concentration de l'électrolyte de mesure.

La couche de polylysine est ici décrite par un seul paramètre $\sigma_{PLL} = \rho L$ constant. D'après l'équation 6.8 et dans la limite haut sel, la différence de potentiel $\phi(0) - \phi(\infty)$ s'écrit $\frac{\sigma_0 \lambda}{\epsilon_0 \epsilon}$ pour la surface de SiO₂ nue et $\frac{\sigma_0 \lambda}{\epsilon_0 \epsilon} + \frac{\sigma_{PLL} \lambda^2}{\epsilon_0 \epsilon L}$ pour la zone SiO₂ + polylysine. Toujours dans la limite haut sel, l'expression théorique de $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ prend donc la forme :

$$\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL} = \frac{\sigma_{PLL} \lambda^2}{\epsilon_0 \epsilon L} \quad (6.9)$$

Il apparaît d'emblée que ce modèle ne permet pas d'expliquer complètement le phénomène d'inversion de pics. En effet, pour de grandes concentrations en sel de l'électrolyte de mesure, les $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ mesurés expérimentalement deviennent négatifs. Ceci impliquerait que les valeurs de σ_{PLL} puissent également devenir négatives. Or $\sigma_{PLL} = \rho L$ est, à priori, une constante positive. Ce résultat semble être dû à la linéarisation des équations de Gouy Chapman, induisant un découplage de la contribution de la surface de SiO₂ nue, $\frac{\sigma_0 \lambda}{\epsilon_0 \epsilon}$, et de celle de la couche de polylysine, $\frac{\sigma_0 \lambda}{\epsilon_0 \epsilon} + \frac{\sigma_{PLL} \lambda^2}{\epsilon_0 \epsilon L}$, dans l'expression 6.8.

Malgré l'insuffisance de ce modèle pour expliquer l'inversion de pics, nous avons essayé de comparer les courbes expérimentales $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL} = f(c_S)$ à celles prévues par cette description en faisant les hypothèses suivantes :

- Les variations de l'épaisseur de la couche de polylysine en fonction de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure ont été modélisées par la loi de Pincus [78] : $L \propto N(\tilde{\sigma}_{PLL})^{\frac{1}{3}} c_S^{-\frac{1}{3}}$, où $\tilde{\sigma}_{PLL}$ désigne la densité surfacique de points d'ancrage de polymères sur la surface.
- La densité surfacique de charges décrivant la couche de polylysine a été supposée proportionnelle à la densité surfacique de points d'ancrage¹², soit : $\sigma_{PLL} \propto \tilde{\sigma}_{PLL}$.
- Dans la limite bas sel, $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ prend la forme : $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL} = \frac{\sigma_{PLL} \lambda}{\epsilon_0 \epsilon}$ (cf équation 6.7). Cette relation relie directement dans le cadre de ce modèle, les décalages expérimentaux mesurés à bas sel, ¹³ $\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle_{SiO_2}^{PLL}$, à σ_{PLL} . La relation $\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle \propto \sigma_{PLL}$ a été conservée.

¹²Ceci constitue une hypothèse. En effet, $\tilde{\sigma}_{PLL}$ désigne la densité de points d'ancrage de polymères à la surface et σ_{PLL} la densité de charges de polymères, tenant compte de l'intégration sur l'épaisseur L de la couche. La relation de proportionnalité entre σ_{PLL} et $\tilde{\sigma}_{PLL}$ n'est pas évidente à priori puisque certaines molécules peuvent ne pas être greffées ou greffées en plusieurs points.

¹³ $\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ désigne la variation de tension obtenue entre une mesure du réseau à 10⁻⁵ M en KCl, effectuée après dépôt de polylysine, et une mesure avant dépôt, dans le même électrolyte.

Le couplage des équations $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL} = \frac{\sigma_{PLL} \lambda^2}{\epsilon_0 \epsilon L}$, $L \propto N \tilde{\sigma}_{PLL}^{\frac{1}{3}} c_S^{-\frac{1}{3}}$, $\sigma_{PLL} \propto \tilde{\sigma}_{PLL}$ et $\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle \propto \sigma_{PLL}$ conduit alors à :

$$\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL} \propto \frac{kT}{e} \langle \Delta U_{SE}^0 \rangle_{SiO_2}^{\frac{2}{3}} c_S^{-\frac{2}{3}}. \quad (6.10)$$

En échelle log-log, cette expression prévoit une variation linéaire de $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ en fonction de c_S , avec un coefficient directeur constant de $-\frac{2}{3}$, et, pour une concentration c_S fixée, une variation linéaire de $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ en fonction $\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle_{SiO_2}^{\frac{2}{3}}$, avec un coefficient directeur $+\frac{2}{3}$.

Sur la figure 6.8.a, ont été reportés, en échelle log-log, les courbes expérimentales $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL} = f(c_S)$ correspondant à quatre manipulations de variation en sel déjà présentées précédemment : deux effectuées dans KCl pur (courbes rouges) et deux effectuées respectivement dans KNO₃ pur (courbe verte, déjà présentée sur la figure 6.5) et dans un mélange contenant KCl et KNO₃ en quantités égales (courbe bleue, déjà présentée sur la figure 6.5). La direction correspondant au comportement théorique attendu, à haut sel, dans le cadre de la description Gouy-Chapmann linéarisée ($\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle_{SiO_2}^{PLL} \propto c_S^{-\frac{2}{3}}$, soit un coefficient directeur de $-\frac{2}{3}$ en échelle log-log) est matérialisée en noir. Sur la figure 6.8.b, les $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ expérimentaux obtenus pour $c_S = [KCl] = 10$ mM lors de l'ensemble des expériences présentées au chapitre 5, sur la figure 5.8, ont été tracées en fonction des $\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle_{SiO_2}^{\frac{2}{3}}$ associés (variations de tension mesurées dans $[KCl] = 10^{-5}$ M). Les échelles utilisées sur la figure 6.8.b étant logarithmiques, le comportement théorique attendu correspond à une droite de coefficient directeur $+\frac{2}{3}$, matérialisé en rouge.

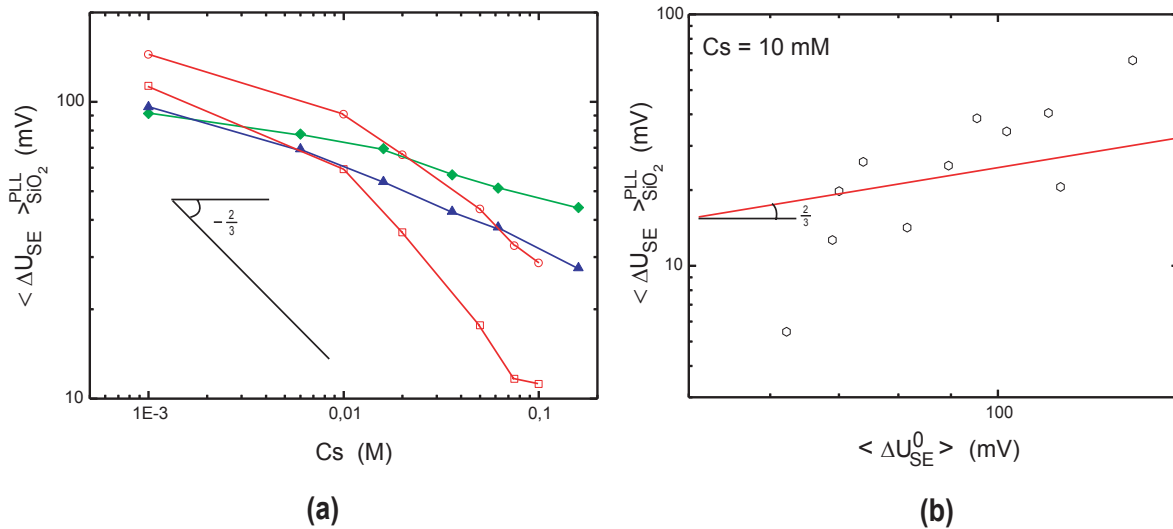


FIGURE 6.8: (a) : comparaison, en échelle log-log, entre les évolutions expérimentales à haut sel des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL} = f(c_S)$ et la relation théorique $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL} \propto c_S^{-\frac{2}{3}}$. En rouge : courbes obtenues dans KCl pur, en vert, dans KNO₃ pur et en bleu dans une solution contenant KCl et KNO₃ en proportions égales. (b) : variations des $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ mesurés pour $c_S = 10$ mM dans KCl pur, en fonction des $\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle_{SiO_2}^{\frac{2}{3}}$ associés. Représentation en échelle log-log.

Les tendances obtenues à partir de la description théorique semblent globalement être celles observées expérimentalement : une décroissance de $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ en fonction de la concentration de l'électrolyte de mesure et, à c_S fixé, une augmentation de $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ en fonction de $\langle \Delta U_{SE}^0 \rangle_{SiO_2}^{PLL} \propto \sigma_{PLL}$. L'apparition de valeurs de $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{SiO_2}^{PLL}$ négatives n'est en revanche absolument pas prédite dans le cadre de ce modèle.

Discussion

Cette section discute des limites du modèle présenté précédemment.

Les résultats commentés au paragraphe 5.2.1 du chapitre 5 (figures 5.7.a et 5.7.b) ont montré que les variations expérimentales de $\langle \Delta U_{SE} \rangle$ associées aux régions polylysine + SiO₂, dans la gamme de concentration [10 mM, 100 mM] de l'électrolyte de mesure, sont importantes, de l'ordre de plusieurs dizaines de millivolts (sans prendre en compte le terme d'électrode). Pour ces concentrations, les différences de potentiel obtenues à partir de l'équation du modèle "Gouy-Chapman linéarisé" (équation 6.8), sont au maximum de quelques millivolts pour le SiO₂ nu, et encore plus faibles en ce qui concerne la polylysine¹⁴. Il apparaît donc que les ordres de grandeur des variations de tension fournis par la modélisation "Gouy-Chapman linéarisé", sont environ dix fois inférieurs à ceux mesurés expérimentalement. Les variations expérimentales des $\langle \Delta U_{SE} \rangle$ sont essentiellement dues à des modifications de la couche compacte, la description présentée dans ce paragraphe ne rendant compte que de variations de potentiels de couche diffuse.

Les résultats expérimentaux montrent que les ions de l'électrolyte pénètrent dans la couche de polymères au-dessus d'une concentration critique de 10 mM environ. Dans le cadre de la modélisation effectuée dans ce paragraphe, il y a alors éventuellement diminution de l'épaisseur de la couche proportionnellement à $c_S^{-\frac{1}{3}}$ et diminution de la longueur d'écran suivant $c_S^{-\frac{1}{2}}$. Ceci entraîne que le potentiel de couche diffuse, de toute manière faible, varie peu. L'entrée d'ions doit cependant profondément modifier la couche condensée de polylysine. On peut considérer que les potentiels de couche compacte à bas sel sont pratiquement égaux pour la polylysine et le SiO₂, puisque les variations de tensions $\langle \Delta U_{SE} \rangle$ se rejoignent vers 10 mM environ¹⁵ (croisement des courbes de la figure 5.7.b du chapitre 5). Le potentiel de couche compacte du SiO₂ nu étant négatif [77], il est vraisemblable que le potentiel de couche compacte de la polylysine, sensiblement constant à bas sel, doit devenir encore plus négatif à fort sel, lorsque l'entrée d'ions commence à modifier la couche condensée. Ce phénomène pourrait être à l'origine des inversions de pics de polylysine. Cependant, la description "Gouy-Chapman linéarisé" ne reflétant que des variations de couche diffuse, ne peut rendre compte de modifications intervenant dans la couche compacte.

De manière générale, le manque d'informations est dû à la méthode différentielle de mesure. Une mesure absolue permettrait de déterminer plus précisément si les évolutions observées sont attribuables à des modifications intervenant sur les zones SiO₂ ou polylysine et quelles régions sont modifiées (couche compacte ou couche diffuse).

¹⁴Les σ_{eff} obtenus au chapitre 5 pour le SiO₂ nu valent (en valeur absolue) quelques 10^{-3} C.m⁻², et sont de l'ordre de 10^{-4} C.m⁻² pour les zones SiO₂ + polylysine.

¹⁵En deçà de 10 mM, seules les variations de potentiel de couche diffuse sont a priori visibles.

6.3 Conclusions

Il ressort de ces différentes études que le phénomène d'effondrement puisse être l'un des mécanismes permettant d'expliquer le comportement de la polylysine à haut sel. La confirmation de cette hypothèse se heurte cependant à la modélisation de la différence de potentiel existant entre la surface de SiO_2 et le volume de l'électrolyte, qui constitue un problème difficile théoriquement. L'existence d'un seuil d'effondrement, correspondant à la concentration en sel présente à l'intérieur de la couche de polymères lors de la phase de dépôt, apparaît cohérente avec les résultats expérimentaux. En supposant que la longueur de Debye soit un paramètre reflétant la portée des interactions dans la couche de polymère, un ordre de grandeur de la concentration en sel intérieure, c_{int} , peut être obtenu en assimilant la distance moyenne entre chaînes de polylysine ($D \simeq 5$ nm, cf paragraphe 6.1.2), à la longueur de Debye intérieure : $D \simeq \lambda_{int} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k T}{2 c_{int} e^2}}$. Ceci conduit à $c_{int} \simeq 3$ mM. Les courbes expérimentales 5.7.b et 5.8 du chapitre 5 semblent effectivement présenter un changement de comportement pour des concentrations de l'ordre de quelques millimolaires¹⁶. L'existence d'une concentration seuil apparaissant expérimentalement, semble donc pouvoir s'expliquer par l'effondrement de la couche de polymères, sans pour autant exclure d'autres phénomènes physiques.

¹⁶Sur la figure 5.7.b du chapitre 5, le phénomène d'inversion de pics se manifeste par une rupture de pente des évolutions des $\langle \Delta U_{SE} \rangle$ associés à la zone SiO_2 + polylysine apparaissant vers 10 mM et entraînant un croisement des courbes correspondant aux régions SiO_2 et SiO_2 + polylysine. Sur la figure 5.8 du chapitre 5, ce phénomène se traduit par une décroissance des courbes $\langle \Delta U_{SE} \rangle_{\text{SiO}_2}^{PLL}$ s'amorçant pour des concentrations en KCl de l'ordre de quelques millimolaires.

Chapitre 7

Détection électronique de l'hybridation avec fixation polylysine

Les chapitres précédents ont montré que l'utilisation de réseaux de transistors à effet de champ permettait une détection reproductible de fragments d'ADN simples-brins fixés électrostatiquement sur une couche de polylysine. Ces résultats encourageants nous ont amenés à poursuivre dans cette voie afin de mettre en évidence la compatibilité de ce système avec la détection d'une réaction d'hybridation. Les protocoles employés généralement lors des études sur puces à ADN avec fixation polylysine, s'inspirent pour la plupart de celui décrit par Pat Brown dans [46]. La première partie de ce chapitre (section 7.1) présente quelques caractéristiques générales des réactions d'hybridation, ainsi que les modifications que nous avons apportées au mode opératoire préconisé par Pat Brown. En particulier, l'utilisation d'une étape de blocage visant à limiter l'adsorption non spécifique lors de la réaction d'hybridation, a été supprimée en un premier temps. La description des expériences sans bloqueur fera l'objet du paragraphe 7.2, les résultats obtenus permettant de conclure à la détection reproductible de l'appariement entre simples-brins complémentaires lors d'expériences réalisées avec un tampon d'hybridation et un électrolyte de mesure de $[KCl] = 20$ mM (cf section 7.2.1). Compte tenu de la meilleure sensibilité du système à bas sel (cf chapitre 4), un protocole expérimental consistant à réaliser la réaction d'hybridation à haut sel et l'étape de détection dans un électrolyte de faible concentration a également été testé afin d'essayer d'augmenter les valeurs des ΔU_{SE} reflétant l'hybridation. Ces manipulations seront décrites dans la section 7.2.2. Les expériences utilisant une étape de blocage feront l'objet de la partie 7.3. Les conclusions générales de cette étude ainsi que la comparaison aux performances des différents modes de détection de l'hybridation proposés dans la littérature, sont regroupées dans la dernière partie.

7.1 Réactions et protocoles d'hybridation

Les expériences présentées dans ce chapitre ont été réalisées en utilisant deux types d'oligonucléotides simples-brins de vingt bases¹ portant des séquences différentes appelées Ars 5 et Ars 3, ainsi que les molécules d'ADN complémentaires notées par la suite Ars 5* et Ars 3*. Ars 5 et Ars 3 correspondent à des parties de la séquence de l'ADN du phage λ et sont très fréquemment utilisés comme amorces lors des réactions d'amplification par PCR (cf appendice A). Ces séquences ont été choisies car elles garantissent la limitation du risque d'hybridation croisée Ars 3 / Ars 5* ou Ars 5 / Ars 3*. Les manipulations détaillées par la suite suivent toutes le même schéma général. Les oligonucléotides simples-brins Ars 5 et Ars 3 sont d'abord déposés respectivement sur chaque extrémité d'un même réseau de transistors. L'étude de la détection de l'hybridation est ensuite réalisée en introduisant dans l'électrolyte de mesure couvrant les capteurs, des cibles portant des séquences complémentaires soit de Ars 5 (cibles Ars 5*), soit de Ars 3 (cibles Ars 3*). Un paramètre important permettant de caractériser les réactions d'association Ars 5 / Ars 5* ou Ars 3 / Ars 3* et plus généralement les réactions d'appariement entre simples-brins complémentaires, est appelé température de fusion ou de « melting », notée T_m . En effet, en augmentant la température, une population monodisperse d'ADN doubles-brins de séquence courte (inférieure à la centaine de bases), passe de l'état double-brin à l'état simple-brin par une transition centrée autour de la température de fusion (figure 7.1). Théoriquement T_m définit la température à laquelle la moitié des molécules doubles-brins se sont dénaturées.

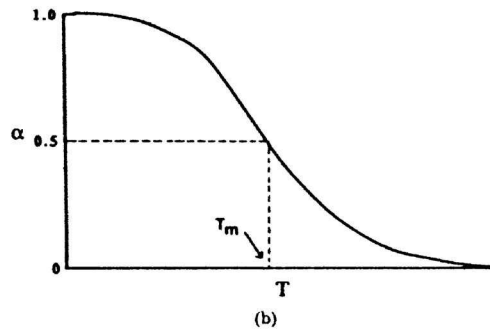


FIGURE 7.1: Allure de l'évolution suivie par spectroscopie UV, de la fraction α de doubles-brins dans une solution monodisperse de molécules d'ADN, en fonction de la température. La transition entre l'état double-brin et l'état simple-brin a lieu par définition à la température de fusion (figure issue de [92]).

L'une des techniques permettant d'étudier la dénaturation de l'ADN double-brin est la spectroscopie UV. Sous éclairage UV, à une longueur d'onde de 260 nm, l'ADN double-brin absorbe en solution environ 60 fois moins que les deux simples-brins désappariés qui le constituent. En mesurant l'intensité absorbée, on peut alors suivre l'évolution de la dénaturation d'une population d'ADN doubles-brins et en déduire des informations de type thermodynamique [92], notamment concernant la valeur de T_m . De nombreuses études ont été effectuées sur ce sujet et il en ressort

¹Ars 5 : 5'-CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT-3' et Ars 3 : 5'-CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC-3', synthétisés par Thermo Hybrid.

que la température de fusion dépend à la fois de la séquence de la molécule, de la nature du tampon de la solution (salinité, pH, ...) et, pour des chaînes courtes, de la concentration en ADN utilisée [92]. Il apparaît notamment que T_m augmente linéairement en fonction du pourcentage molaire en paires GC de la molécule [93] et logarithmiquement en fonction de la concentration en contre-ions de la solution [94]. La stabilité de l'ADN semble être peu perturbée par des modifications de pH restant dans la gamme comprise entre 5 et 11 [95]. Ces recherches ont abouti à la détermination de différentes formules semi-empiriques [96], permettant d'évaluer la température de melting de séquences inférieures à une centaine de bases en fonction des caractéristiques de la solution de dilution utilisée [97]. Différents programmes de calcul disponibles sur internet, permettent d'évaluer la température de fusion de n'importe quelle séquence. Le tableau 7.1 présente l'ordre de grandeur² des températures de fusion de la séquence Ars 3, pour des concentrations en ADN de 10 et 100 nM et des concentrations en contre-ions monovalents de 1 et 100 mM.

	[KCl] = 1 mM	[KCl] = 100 mM
[Ars 3] = 10 nM	39,1°C	72,3°C
[Ars 3] = 100 nM	42,9°C	76,1°C

TABLEAU 7.1: Evolution des températures de fusion d'une solution de Ars 3, en fonction de sa concentration en ADN et en contre-ions. Les T_m associés à la séquence Ars 5 sont environ deux à trois degrés supérieurs à ces valeurs.

Il est généralement admis que les réactions d'hybridation sur surface peuvent être décrites par une température de fusion effective abaissée par rapport au T_m "volumique" correspondant. Dans [98], Vainrub et collaborateurs ont étudié de manière théorique la diminution de la température de melting en fonction de l'état de charge du substrat sur lequel est effectuée la réaction. Une variation du T_M d'environ -10°C semble être un ordre de grandeur couramment admis. Les résultats du tableau 7.1 montrent qu'il est envisageable d'observer l'appariement entre les séquences Ars 3 ou Ars 5 et leur complémentaire, même dans un tampon d'hybridation de faible molarité en sel (~ 10 mM) par rapport à ceux couramment utilisés dans les protocoles d'hybridation sur puces à ADN (typiquement 50 mM à 1 M en sel)³. En raison de la plus grande sensibilité de la détection électronique à bas sel, toutes les réactions d'hybridation détaillées par la suite ont été effectuées dans des solutions ayant des concentrations comprises entre 10 et 50 mM et à température ambiante ($T \sim 25^\circ\text{C}$).

Les caractéristiques précises du protocole d'hybridation sur puces à ADN mis au point par l'équipe de Pat Brown, peuvent être trouvées sur le site internet [46]. Les principales étapes sont résumées ci-dessous :

- préparation de lamelles de verre recouvertes d'une couche de polylysine.
- Dépôt des molécules sondes.
- Réhydratation des microdépôts de sondes en positionnant les lames pendant une à cinq minutes au-dessus d'un courant de vapeur d'eau, puis en les séchant dans un four à 140°C

²Les résultats du tableau 7.1 ont été calculés en utilisant le logiciel proposé sur le site <http://alces.med.umn.edu/rawtm.html>. D'autres logiciels utilisant des formules différentes ont également été testés. Les valeurs des T_m calculées ne diffèrent que de quelques degrés.

³Par exemple, dans le protocole de Pat Brown, le tampon d'hybridation est une solution de SSC 4X, c'est-à-dire à 650 mM en sel.

(quelques secondes). Cette étape semble permettre une uniformisation de la distribution des sondes au sein des différents dépôts.

- Traitement chimique dit de blocage. L'utilisation d'une solution d'anhydride succinique permet de "convertir" les groupements amine positivement chargés ⁴ de la polylysine, en groupements amide neutres, tout en faisant apparaître des groupes carboxylate, négativement chargés. Cette réaction chimique conduit théoriquement à substituer des charges négatives aux charges positives initiales de la polylysine. Dans une vision schématique, il y a alors apparition d'un comportement répulsif entre la surface bloquée et les molécules d'ADN hybridantes (molécules cibles), limitant l'adsorption non spécifique durant la phase d'hybridation. L'utilisation d'un bloqueur conduit à un meilleur rapport signal sur bruit lors de la détection par mesures de fluorescence. La description précise de l'étape de blocage sera détaillée au paragraphe 7.3.
- Hybridation de la puce. La concentration en sel et le pH de la solution contenant les cibles, ainsi que la température à laquelle est effectuée la réaction d'hybridation et sa durée, sont des caractéristiques importantes qui dépendent de la nature des molécules d'ADN utilisées. L'influence des différents facteurs est brièvement décrite ci-dessous.
- Rinçage de la puce. Cette étape s'effectue en plongeant la lamelle dans différentes solutions de rinçage ayant des concentrations en sel de plus en plus faibles.

En un premier temps, nous avons décidé de simplifier le protocole décrit ci-dessus, notamment afin de limiter le nombre de rinçages de la puce après dépôt des sondes. Lors des premières expériences de détection de l'hybridation, l'étape de blocage a été omise. En effet, la suppression de ce traitement chimique permet d'injecter directement la solution contenant les ADN cibles dans l'électrolyte de mesure et évite une modification supplémentaire de l'interface. Par ailleurs, ce protocole simplifié offre également l'avantage de "conserver" les charges positives de la polylysine, ce qui semble avoir une influence importante sur la cinétique de la réaction d'hybridation. La faible concentration en contre-ions du tampon utilisé (~ 10 mM) a pour effet d'augmenter la répulsion électrostatique entre brins d'ADN et réduit fortement la probabilité d'appariement entre brins complémentaires. Ceci conduit à une cinétique d'hybridation beaucoup plus longue à bas sel qu'à haut sel. La présence d'une surface non bloquée (existence de charges positives portées par la polylysine), semble également induire un effet de réduction des répulsions entre cibles et sondes lors de l'hybridation, et conduit à une augmentation de la concentration locale de cibles au voisinage de l'interface. Cette méthode utilisant des surfaces de charges opposées et de basses concentrations en sel, a permis de mettre en évidence la possibilité de réaliser des réactions d'hybridation rapides sur puces [99]. Par ailleurs, en utilisant une surface de polylysine non bloquée, Fritz et collaborateurs [7] ont démontré en octobre 2002 la faisabilité d'une détection électronique d'une hybridation entre oligonucléotides de 12 bases, dans un tampon à 23 mM en sel.

Les résultats associés aux détections d'hybridation sans bloqueur sont présentés dans le paragraphe suivant. L'utilisation de l'étape bloquante sera détaillée dans la section 7.3. Toutes les réactions ont été effectuées avec les séquences Ars 5 et Ars 3, à température ambiante et dans des tampons d'hybridation de l'ordre de quelques dizaines de millimolaires. Le protocole de détection

⁴Les signes des charges indiqués ici sont ceux attribués aux différents groupements dans des conditions de pH proches de la neutralité.

électronique est détaillé ci-dessous. Certaines expériences ont nécessité quelques modifications de ce mode opératoire. Ces aménagements seront détaillés au fur et à mesure.

7.2 Expériences d'hybridation sans étape de blocage

7.2.1 Expériences d'hybridation dans un électrolyte de mesure de KCl à 20 mM

Ce paragraphe regroupe les manipulations d'hybridation effectuées à 20 mM, en utilisant comme électrolyte de mesure, une solution de KCl ayant également une concentration de 20 mM. Les deux premières sections détaillent le protocole et les résultats de deux expériences d'hybridation, l'une effectuée avec des macrodépôts de sondes, l'autre avec des microdépôts. La dernière section présentera le bilan statistique des variations de tension obtenues dans le cadre de cette étude effectuée à 20 mM.

Utilisation de macrodépôts

Dans cette expérience, deux macrodépôts contenant les ADN sondes, ont été déposés sur chaque extrémité d'un réseau de 96 transistors préalablement recouvert de polylysine. Le volume des gouttes est de $0,3 \mu\text{L}$ et la concentration en oligonucléotides de $10 \mu\text{M}$. La séquence Ars 5, appelée par la suite Seq 1, est déposée sur la partie gauche du réseau (transistors 1 et suivants), et la solution de Ars 3, ou Seq 2, sur l'autre extrémité (transistors 96 et précédents). Après quinze minutes d'incubation en chambre humide, le réseau est rincé, séché sous un jet d'air comprimé, puis recouvert par une solution de chlorure de potassium de concentration 20 mM. Une première mesure électronique du signal associé aux sondes (mesure Sonde 1) est alors effectuée. Afin d'évaluer la stabilité du réseau, une seconde mesure est réalisée quinze minutes plus tard (mesure Sonde 2), dans le même électrolyte de mesure. Aucun rinçage n'a eu lieu entre les mesures Sonde 1 et Sonde 2.

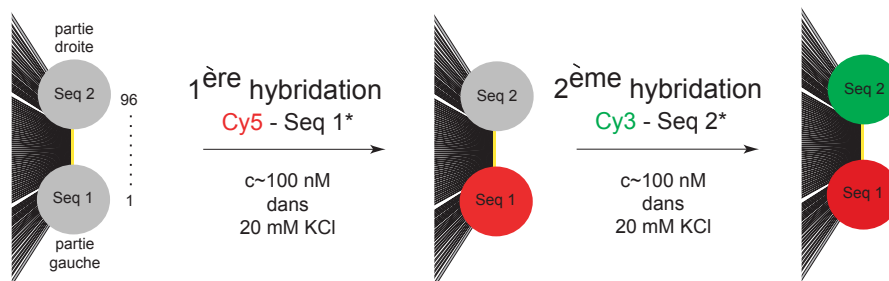


FIGURE 7.2: Déroulement général d'une expérience d'hybridation sur un réseau de 96 transistors.

Une première réaction d'hybridation est ensuite effectuée en utilisant comme cibles des oligonucléotides désignés par Cy5-Seq 1^* , complémentaires de la séquence 1 et modifiés par un fluorochrome Cy5 à l'extrémité 5'. Cette étape est réalisée en injectant une solution concentrée de Cy5-Seq 1^* directement dans l'électrolyte de mesure couvrant le réseau, afin d'obtenir une concentration finale en cibles de 100 nM. Aucun rinçage n'est opéré entre la mesure Sonde 2 et

l'injection des oligonucléotides complémentaires. L'électrolyte de mesure contenant les cibles est laissé en contact avec le réseau pendant cinq minutes, à température ambiante, puis la réaction est stoppée par rinçage⁵ avec une solution de $[KCl] = 20$ mM. Une nouvelle acquisition des caractéristiques est ensuite lancée (mesure Hyb 1). La figure 7.3 présente la différence de tension entre la mesure Sonde 2 et la mesure Sonde 1 (cercles gris), ainsi que la variation de tension (losanges rouges) entre la mesure Hyb 1, effectuée après hybridation, et la mesure Sonde 2 acquise avant injection des cibles.

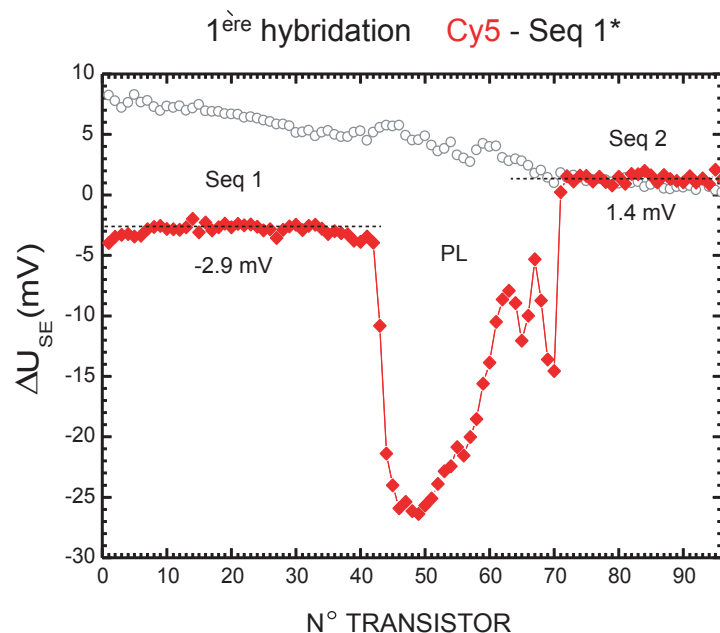


FIGURE 7.3: Cercles gris : différences de tension entre les mesures Sonde 2 et Sonde 1, acquises avant l'injection des cibles Cy5-Seq 1*. Losanges rouges : variations de tension entre la mesure effectuée après la réaction d'hybridation (Hyb 1) et la mesure Sonde 2, enregistrée avant hybridation. Les régions correspondant aux dépôts des sondes (Seq 1 et Seq 2), ainsi que la surface de polylysine nue (PL) sont indiquées sur la figure. Toutes les mesures sont réalisées dans un électrolyte de $[KCl] = 20$ mM.

La différence de tension entre les deux mesures effectuées avant injection des sondes (cercles gris) indique l'existence d'une dérive lente du système, apparaissant graduellement le long du réseau et conduisant à des variations de tension de l'ordre de 6 mV sur la zone associée à Seq 1, et de 1 mV sur la région Seq 2. La courbe correspondant à la différence entre Hyb1 et Sonde 2 (losanges rouges), présente une allure très différente de celle tracée en gris. On peut observer clairement trois comportements distincts correspondant très exactement aux zones de dépôt des sondes Seq 1 et Seq 2 et à celle de la polylysine nue (PL). La partie gauche (transistors 1 à 41) se décale d'environ -3 mV, tandis que la partie droite (transistors 72 à 95) présente une variation plus petite, comparable à celle observée entre les mesures Sonde 1 et Sonde 2 (variation de l'ordre de 1 mV). La zone centrale présente une variation de tension négative importante allant de -5 mV à -25 mV. Cette dernière tendance peut s'expliquer par l'absence de l'étape de blocage dans le protocole. En effet, la polylysine nue conservant une charge positive importante, les molécules cibles auront tendance à s'adsorber sur cette partie. Cette interaction non spécifique peut à

⁵Ce rinçage s'effectue par remplacement progressif de l'électrolyte, sans mise à nue et séchage de la surface.

priori être également présente sur les zones Seq 1 et Seq 2, mais serait alors modifiée par la présence des oligonucléotides sondes. Elle est cependant très peu visible en électronique sur la région Seq 2 où les sondes sont non complémentaires des cibles (décalage positif de l'ordre de 1 mV). La variation de tension négative de -3 mV observée sur la partie Seq 1 où devrait avoir lieu l'hybridation, pourrait éventuellement être attribuée à une adsorption non spécifique plus importante sur la partie Seq 1 que sur la partie Seq 2. La différence de comportement entre la région Seq 1 et la région Seq 2 semble cependant indiquer qu'il y a sur Seq 1, hybridation entre séquences complémentaires.

Afin de confirmer ces résultats, l'expérience a été poursuivie en essayant de mettre en évidence l'influence de cibles Cy3-Seq 2*, complémentaires des sondes déposées sur la partie droite du réseau et portant un fluorophore différent de celui utilisé lors de la première hybridation. A l'issue de la mesure Hyb 1, un second enregistrement Hyb 1', a été effectué 15 minutes plus tard, sans qu'aucun rinçage n'ait été réalisé. Les mesures Hyb 1 et Hyb 1' sont analogues aux mesures Sonde 1 et Sonde 2 de la première hybridation et permettent d'évaluer la stabilité du système. Une solution concentrée de Cy3-Seq 2* a ensuite été injectée dans l'électrolyte de $[KCl] = 20$ mM, afin d'obtenir une concentration finale en cibles de 100 nM. Après cinq minutes de réaction, le réseau a été rincé avec une solution de chlorure de potassium à 20 mM, puis une nouvelle acquisition (Hyb 2) lancée. La figure 7.4 présente les ΔU_{SE} associés respectivement aux différences entre Hyb 1' et Hyb 1 (cercles gris) et entre Hyb 2 et Hyb 1' (losanges verts).

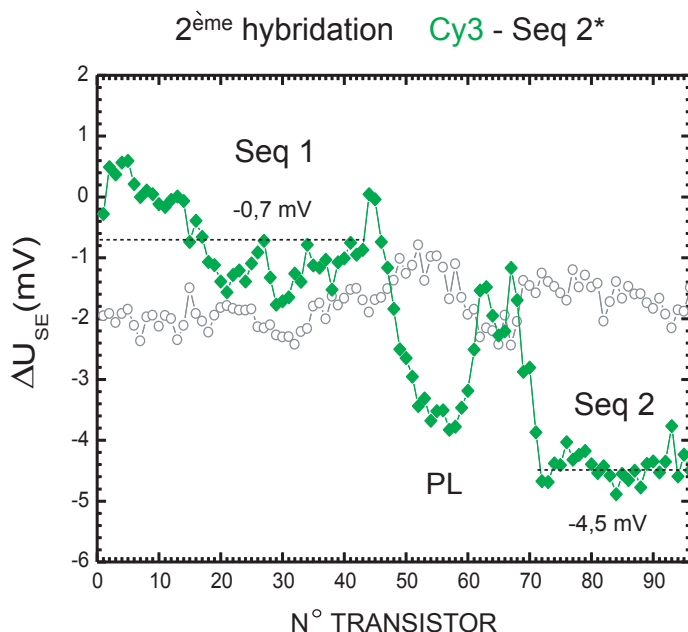


FIGURE 7.4: Cercles gris : différences de tension entre les mesures Hyb 1' et Hyb 1 acquises avant l'injection des cibles Cy3-Seq 2*. Losanges rouges : variations de tension entre la mesure effectuée après la seconde réaction d'hybridation (Hyb 2) et la mesure Hyb 1'. Les régions correspondant aux dépôts des sondes (Seq 1 et Seq 2) ainsi que la surface de polylysine nue (PL), sont indiquées sur la figure. Toutes les mesures sont réalisées dans un électrolyte de $[KCl] = 20$ mM.

Lors de cette deuxième phase, la zone complémentaire où devrait avoir lieu l'appariement entre sondes et cibles, devient la partie droite du réseau (zone Seq 2). Les évolutions de la

courbe en losanges de la figure 7.4 apparaissent sensiblement les mêmes que celles déjà décrites précédemment : la zone centrale polylysine présente un décalage négatif de l'ordre de -3 mV, plus faible que sur la figure 7.3, éventuellement à cause de l'adsorption non-spécifique ayant déjà eu lieu lors de la première hybridation. La région non-complémentaire Seq 1 semble relativement stable (-0,7 mV), tandis que la zone complémentaire Seq 2 se décale d'environ -4,5 mV. De manière analogue à ce qui avait été observé précédemment, il apparaît donc une variation de tension négative plus importante sur la région complémentaire que sur la partie non complémentaire.

Après la mesure électronique Hyb 2, le réseau de transistors a été séché et deux images de fluorescence ont été acquises à l'aide du montage "deux couleurs" décrit au chapitre 3. L'utilisation de la longueur d'onde 633 nm (respectivement 532 nm) permet d'exciter les fluorophores Cy5 (respectivement Cy3) et d'obtenir une image de la répartition des molécules cibles introduites lors de la première hybridation (respectivement seconde hybridation). L'ensemble des résultats optiques et électroniques sont regroupés sur la figure 7.5. Par souci de clarté, les évolutions des zones polylysine ont été supprimées.

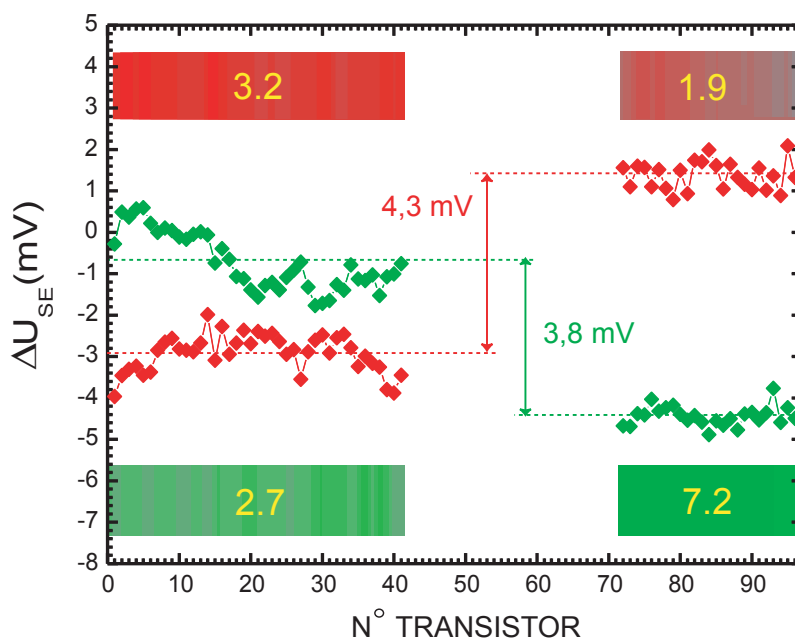


FIGURE 7.5: Evolutions des ΔU_{SE} des régions d'intérêt obtenues, en rouge, lors de la première hybridation (cibles Cy5-Seq 1*), et en vert, lors de la seconde hybridation (cibles Cy3-Seq 2*). Les répartitions des deux types de molécules cibles issues des acquisitions de fluorescence, sont représentées grâce à une échelle de couleurs, en rouge pour Cy5-Seq 1* et en vert pour Cy3-Seq 2*. Les chiffres indiqués en jaune correspondent aux valeurs moyennes des signaux de fluorescence sur chacune des zones Seq 1 et Seq 2.

Dans la suite, la caractérisation du comportement électronique des régions d'intérêt lors d'une expérience d'hybridation, sera effectuée en introduisant la grandeur $\Delta = \Delta_{Comp}^{NonComp}$ correspondant à la différence entre le décalage moyen de la zone non complémentaire et celui de la zone complémentaire⁶. Avec cette définition, Δ sera de signe positif lorsque la région complémentaire

⁶La zone complémentaire sera toujours définie comme la partie du réseau où ont été déposées les sondes complémentaires des cibles introduites dans le tampon d'hybridation. Il est à noter que lors de deux hybridations successives, la zone complémentaire de la première hybridation, devient non complémentaire lors de la deuxième.

présente un décalage négatif plus important que la région non complémentaire. Sur la courbe de la figure 7.5 correspondant à la première hybridation (courbe rouge), on peut voir que le delta est positif et vaut environ 4,3 mV ; le signal de fluorescence étant à peu près 1,7 fois plus grand sur la zone complémentaire que sur la zone non complémentaire. La courbe verte associée à la seconde hybridation présente un delta également positif de 3,8 mV, la fluorescence étant 2,6 fois plus grande sur la zone complémentaire. L'ensemble de ces résultats indique la possibilité d'une détection électronique de l'hybridation sur des réseaux de transistors à effet de champ.

Utilisation de microdépôts

L'expérience précédente a été effectuée en déposant les sondes sous forme de macrodépôts, la densité d'ADN déposée initialement pouvant alors être évaluée⁷ à 5×10^5 molécules. μm^{-2} , soit supérieure à la saturation. Dans la manipulation décrite dans cette section, nous avons utilisé le nanospotter GESIM afin de déposer deux microgouttelettes de solutions de Ars 5 (Seq 1) et de Ars 3 (Seq 2) (concentration des solutions : $1 \mu\text{M}$), respectivement sur la partie gauche et sur la partie droite d'un réseau de 96 transistors. Sur la partie centrale, un premier microdépôt de Ars 5 identique à celui effectué sur la partie gauche a d'abord été réalisé. Après séchage de cette gouttelette, un second dépôt de Ars 3, similaire à celui effectué à droite, a été redéposé exactement au-dessus du précédent. Le nombre d'impulsions sélectionné pour effectuer ces différents dépôts étant de $b = 100$, la densité moléculaire moyenne déposée peut être évaluée à $\sigma_M = 2500$ molécules. μm^{-2} , soit environ 200 fois moins que lors de l'expérience précédente. Le réseau ainsi préparé présente donc trois régions d'intérêt : à gauche, Seq 1, à droite Seq 2 et au centre Seq 1 + Seq 2.

À l'issue de la phase de dépôt, une première acquisition des caractéristiques des transistors a été effectuée en utilisant un électrolyte de KCl à 0,01 mM. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 7.6.

Cette mesure à 0,01 mM permet de localiser les différents transistors associés aux trois zones d'intérêt. La région centrale présente un décalage négatif plus important que les zones situées aux extrémités, ce qui est cohérent avec les quantités déposées. Le mode opératoire suivi par la suite est exactement le même que celui détaillé dans la section précédente. L'électrolyte de mesure à 0,01 mM est d'abord remplacé par une solution de KCl à 20 mM, puis deux acquisitions électroniques successives et espacées de quinze minutes sont effectuées, et enfin les cibles Cy3-Seq 1* sont introduites dans le bain de mesure afin d'obtenir une concentration finale de 100 nM. Après cinq minutes de réaction, le réseau est rincé et une mesure après hybridation est effectuée. Ce protocole est ensuite répété en utilisant cette fois des cibles Cy5-Seq 2*, et à l'issue de la dernière mesure électronique les images de fluorescence sont acquises. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 7.7.

Lors de la première hybridation, la courbe associée à la variation de tension induite par l'introduction des cibles Cy3-Seq 1* (Figure 7.7.a, losanges verts) présente à nouveau des comportements différents suivant les zones du réseau. On peut observer une diminution globale de la tension sur les régions "polylysine nue" (~ -30 mV), liée vraisemblablement à l'absence de blocage. Cependant, contrairement aux résultats de l'expérience précédente, la zone non com-

⁷Cette évaluation est obtenue en divisant la quantité de sondes déposées (Concentration de $10 \mu\text{M}$, volume de $0,5 \mu\text{L}$) par la surface moyenne d'un macrodépôt (rayon ~ 1 mm).

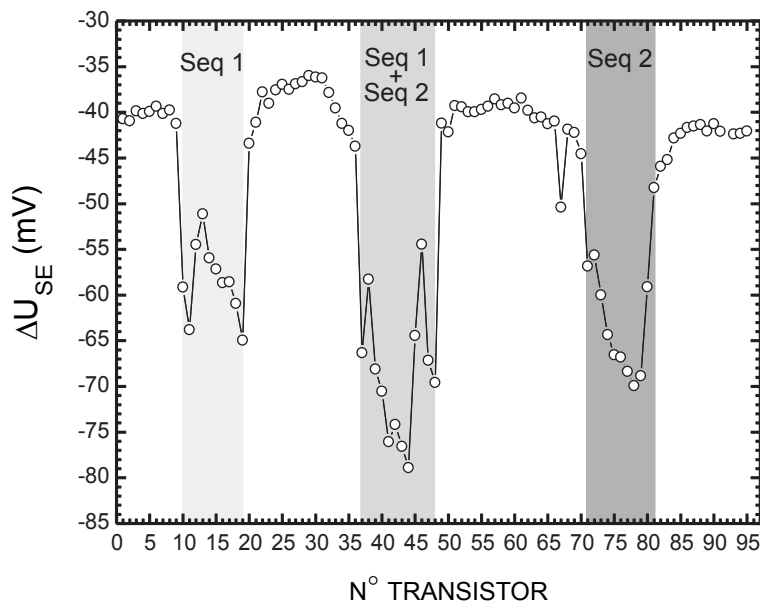


FIGURE 7.6: Variations de tension associées au signal de sondes. La mesure a été effectuée dans un électrolyte de KCl à 0,01 mM et la référence est un fichier acquis après incubation de la polylysine (mesure dans $[KCl] = 0,01$ mM). A gauche, la région Seq 1, au milieu, la région Seq 1 + Seq 2 et à droite, la région Seq 2.

plémentaire (Seq 2, extrémité droite) présente un décalage négatif important qui n'avait pas été observé sur la courbe rouge de la figure 7.5. Ceci peut s'expliquer par la diminution de la densité moléculaire de sondes qui dans la manipulation précédente, est proche de la saturation de la couche de polylysine. L'utilisation de microdépôts conduit à une diminution d'un facteur environ 200 de σ_M , laissant vraisemblablement de nombreux "sites polylysine" inoccupés au sein des différentes régions d'intérêt. L'introduction de Cy3-Seq 1* dans l'électrolyte couvrant le réseau conduit alors à une adsorption non spécifique importante de cibles sur les différentes zones, pouvant expliquer notamment le décalage négatif de l'extrémité droite, où aucun appariement spécifique n'est attendu. Il est très vraisemblable que ce phénomène intervienne également sur les zones Seq 1 et Seq 1 + Seq 2 (où la réaction d'hybridation devrait avoir lieu) et soit responsable de l'essentiel du décalage négatif observé sur ces régions. Il apparaît cependant que la zone complémentaire Seq 1 présente une variation de tension négative plus importante que la région non complémentaire Seq 2. Cette évolution conduit comme dans l'expérience effectuée en macrodépôts, à l'apparition d'un delta moyen positif de l'ordre de 4 mV entre les deux extrémités. Le décalage plus important de la partie centrale par rapport à la zone Seq 2, est également cohérent avec la présence de la séquence Seq 1 au milieu du réseau. De manière générale, les variations de tension associées aux différentes régions d'intérêt ne sont pas uniformes au sein d'un même microdépôt. Le pic de gauche (Seq 1) a par exemple sur la figure 7.6, une structure en V inversé indiquant que moins de molécules sondes ont été déposées au milieu que sur les bords de gouttes. On peut remarquer sur la courbe verte de la figure 7.7.a, que les décalages de la zone Seq 1 sont plus importants, en valeur absolue, au centre que sur les bords. Il semble donc que les variations de tension observées soient corrélées à la quantité de sondes initialement présente sur les différents transistors. Concernant la seconde hybridation, la figure 7.7.b montre

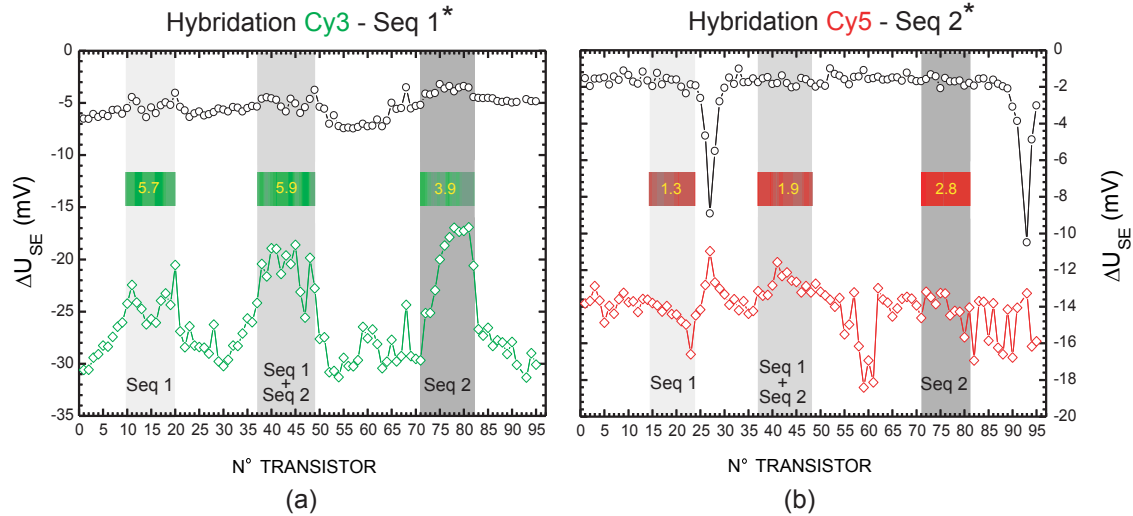


FIGURE 7.7: (a) Résultats de la première hybridation par Cy3-Seg 1*. Cercles gris : différence entre les deux mesures consécutives effectuées avant l'injection des cibles. Losanges verts : variations de tension entre une mesure après hybridation et une mesure avant hybridation. (b) Résultats de la deuxième hybridation par Cy5-Seg 2*. Cercles gris : différence entre les deux mesures consécutives effectuées avant l'injection des cibles. Losanges rouges : variations de tension entre une mesure après hybridation et une mesure avant hybridation. Sur chaque figure, les zones d'intérêt correspondent aux parties grisées et les résultats des mesures de fluorescence sont représentés par une échelle de couleurs. Toutes les mesures sont effectuées dans $[KCl] = 20$ mM.

que l'introduction des sondes Cy5-Seg 2* induit un décalage négatif global de l'ordre de 14 mV, sans que des différences de comportement significatives puissent être observées entre les trois régions d'intérêt. Les résultats des acquisitions de fluorescence indiquent cependant qu'à l'issue des deux réactions d'hybridation, l'intensité moyenne collectée à 633 nm et 532 nm, est environ deux fois plus grande sur les zones complémentaires que sur les zones non complémentaires.

Etant donné les résultats de la seconde phase de l'expérience, il n'est pas évident que le delta moyen de 4 mV obtenu lors de la première hybridation puisse être associé à la détection électronique de l'hybridation entre les sondes Seq 1 et leurs complémentaires. Une adsorption non spécifique en moyenne plus importante sur la zone Seq 1 que sur la zone Seq 2 pourrait conduire à un résultat similaire. Dans ce cas, ce phénomène devrait être corrélé à l'existence d'une densité surfacique moyenne de sondes moins importante sur l'extrémité gauche (Seq 1) que sur l'extrémité droite (Seq 2). Une telle différence devrait être reflétée par une amplitude du pic d'ADN sondes associé à Seq 1 plus faible que celle correspondant à Seq 2, lors de la dernière mesure précédant l'introduction de Cy3-Seg 1*. Les amplitudes semblent cependant du même ordre de grandeur (Seq 1 : $-4,5 \pm 1,6$ mV ; Seq 1 + Seq 2 : $-5,3 \pm 2,6$ mV ; Seq 2 : $-5,1 \pm 3,6$ mV ; valeurs évaluées à partir des résultats de la dernière mesure précédant l'ajout des sondes dans l'électrolyte de KCl à 20 mM (données non présentées)). Par ailleurs, l'hypothèse d'une adsorption non spécifique plus importante sur certaines régions ne semble pas être cohérente avec les résultats obtenus sur la zone centrale. En effet, la densité surfacique moyenne de molécules d'ADN présente au centre est a priori deux fois plus importante que sur les extrémités. Malgré cette différence, il apparaît toutefois que la partie Seq 1 + Seq 2 présente, sur la courbe en losanges de la figure 7.7.b, un décalage négatif plus grand (en valeur absolue) que la zone non complémentaire Seq 2.

Bilan des expériences effectuées dans $[KCl] = 20 \text{ mM}$

La figure 7.8 résume les résultats de treize expériences d'hybridation, effectuées en macro ou en microdépôts avec un électrolyte de KCl à 20 mM et en utilisant des densités surfaciques de sondes déposées différentes.

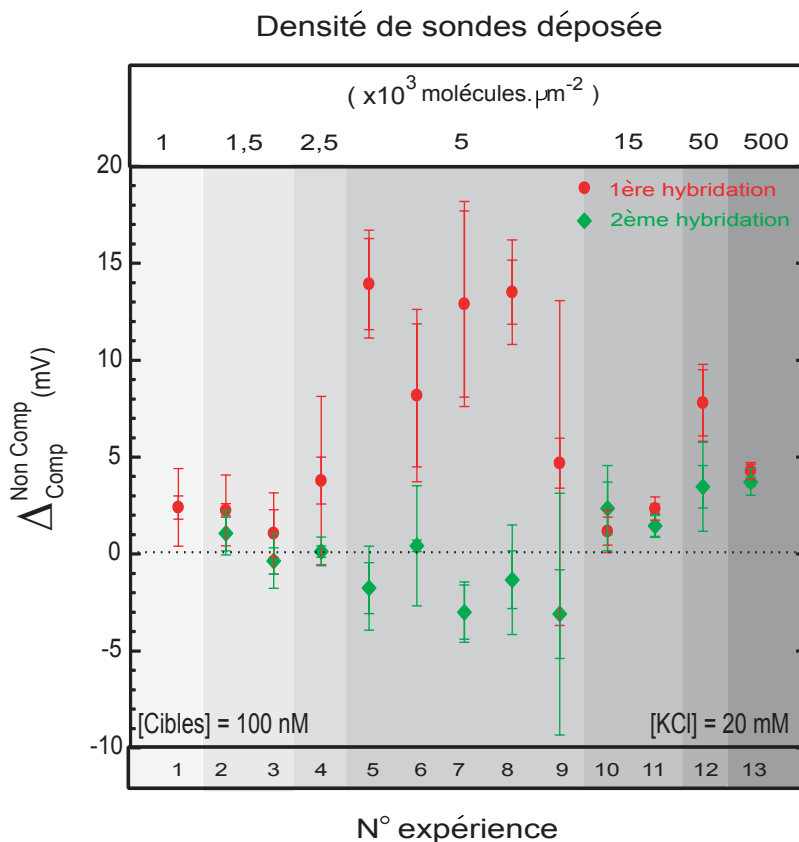


FIGURE 7.8: Bilan de treize expériences d'hybridation effectuées sur différents réseaux de transistors dans un électrolyte de KCl à 20 mM. Les sondes utilisées ont toujours été Ars 3 et Ars 5, la concentration en cibles étant de 100 nM et la durée de l'hybridation variant entre cinq et dix minutes. La nature des cibles introduites en premier dans le bain de mesure a été choisie aléatoirement : dans la moitié des expériences il s'agit de Ars 3*. $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ désigne la différence entre le décalage moyen de la zone non-complémentaire et celui de la zone complémentaire, évaluée à partir des variations de tension entre mesure après et mesure avant hybridation. La densité surfacique moyenne de sondes déposées initialement est précisée en haut. Toutes les expériences suivent le protocole détaillé dans les deux sections précédentes.

L'ensemble de ces expériences a été effectué dans des conditions similaires sur différents réseaux de transistors. Les densités surfaciques moyennes de sondes indiquées sur le graphique correspondent aux quantités déposées initialement et sont évaluées à partir des résultats de l'appendice B lors de l'utilisation du nanospotter GESIM (expériences 1 à 11), ou en assimilant les macrogouttelettes à des disques de 1 mm de rayon (expériences 12 et 13 effectuées en macrodépôts). Les manipulations 1 à 4, 7 à 9 et 13 ont été réalisées en effectuant une première mesure du signal induit par les sondes dans $[KCl] = 0,01 \text{ mM}$, avant de poursuivre le protocole à 20 mM.

Un tel mode opératoire nécessite un rinçage de la puce pouvant occasionner des modifications de la densité surfacique de sondes plus ou moins importantes. En revanche les expériences 5, 6 et 10 à 12 ont été menées dès le début dans un électrolyte de $[KCl] = 20$ mM. Dans ce cas, aucun rinçage préalable à la première réaction d'hybridation n'a lieu. Par ailleurs, les résultats des acquisitions de fluorescence ont été caractérisés en introduisant le rapport $r = \frac{I_{Comp}}{I_{NonComp}}$ entre la fluorescence moyenne collectée sur la zone complémentaire et celle obtenue sur la zone non complémentaire ; une valeur de r supérieure à 1 reflète la présence de davantage de cibles sur la région complémentaire. Sur l'ensemble des hybridations⁸ (premières comme secondes) de la figure 7.8, le rapport r a été trouvé compris entre 1,1 et 6,5 avec une moyenne et un écart-type de $2,4 \pm 1,4$. Lors de la manipulation n°1, la deuxième hybridation n'a pas été réalisée.

On retrouve sur la figure 7.8 les tendances observées lors des deux expériences détaillées précédemment. En effet, pour des densités surfaciques de sondes supérieures à environ 10^4 molécules. μm^{-2} , il apparaît systématiquement un delta de signe positif lors des deux hybridations successives. Lorsque l'on diminue la densité surfacique de sondes, la première hybridation conduit toujours à un delta positif plus ou moins important. Les résultats associés à la seconde hybridation sont cependant soit peu significatifs, soit négatifs. Pour les expériences correspondant à environ 3500 molécules. μm^{-2} (expériences 5 à 9), les deltas mesurés à l'issue de la première phase sont de l'ordre de 10 à 15 mV.

Dans le cas des manipulations 5, 6 et 7, l'amplitude du pic associé à la zone complémentaire, obtenue à partir d'une mesure faite immédiatement avant la première introduction de cibles, est inférieure (en valeur absolue) à celle du pic correspondant à la zone non complémentaire. Ceci indique une densité de sondes plus faible sur la zone complémentaire que sur la zone non complémentaire. Dans ces conditions, les deltas très grands caractérisant les premières hybridations dans ces expériences sont éventuellement attribuables à une adsorption non spécifique plus importante sur la région où devrait avoir lieu l'hybridation. Cependant, dans les expériences 8 et 9, la situation est inversée et l'amplitude du pic de sondes correspondant à la zone complémentaire est plus grande que celle associée à la zone non complémentaire. De manière générale, la nature des sondes introduites lors de la première hybridation a été choisie aléatoirement afin de ne pas introduire de biais. Parmi les expériences présentant un delta positif uniquement lors de la première phase, les n° 3, 4, 8 et 9 correspondent à une situation où la densité de sondes est plus grande sur la région complémentaire.

7.2.2 Augmentation des $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ lors d'hybridations dans $[KCl] = 50$ mM et de mesures à $0,01$ mM

Lors d'une réaction d'hybridation, l'augmentation de la concentration en contre-ions du tampon dans lequel est effectué la réaction favorise l'appariement entre brins complémentaires (cf paragraphe 7.1). L'utilisation d'un électrolyte de concentration élevée pourrait alors conduire à l'augmentation des taux d'hybridation. Cependant, les résultats du chapitre 5 montrent une diminution importante de la sensibilité de la détection électronique dans des solutions de fortes concentrations. La prise en compte de ces deux facteurs nous a conduit à essayer de mettre en place un protocole permettant d'effectuer la réaction d'hybridation à haut sel et la phase de

⁸Les expériences 1 et 10 n'ont pas été validées par des mesures de fluorescence, les fichiers n'étant pas utilisables.

détection à bas sel⁹. Ce paragraphe présente les études qui ont été effectuées en utilisant un tampon d'hybridation à 50 mM et un électrolyte de mesure de faible concentration (0,01 mM). La première section détaille le protocole suivi et le bilan des résultats obtenus sera présenté dans la partie suivante.

Expérience d'hybridation à haut sel et de détection à bas sel

La figure 7.9 représente schématiquement le déroulement de la première phase de la manipulation décrite dans ce paragraphe. Dans cette expérience, deux macrodépôts contenant les ADN sondes ont été déposés sur chaque extrémité d'un réseau de 31 transistors préalablement recouvert de polylysine. Le volume des gouttes est de 0,2 μL et la concentration en oligonucléotides de 1 μM . La séquence Ars 3, appelée par la suite Seq 1, est déposée sur la partie gauche du réseau et la solution de Ars 5, ou Seq 2, sur l'autre extrémité. Après quinze minutes d'incubation en chambre humide, le réseau est rincé, séché sous un jet d'air comprimé, puis recouvert par une solution de chlorure de potassium de concentration 0,01 mM. Une première mesure électronique du signal associé aux sondes (mesure $S_{0,01}^1$) est alors effectuée afin de déterminer les transistors appartenant aux différentes régions d'intérêt. L'électrolyte à 0,01 mM est ensuite remplacé par une solution de KCl à 50 mM. Deux mesures consécutives espacées de dix minutes sont effectuées pour évaluer la stabilité du réseau. La différence entre ces deux enregistrements, par la suite appelés respectivement S_{50}^2 et $S_{50}^{2'}$, vaut en moyenne $4,2 \pm 1,7$ mV. A l'issue de la dernière mesure, des cibles Cy5-Seq 2* sont introduites dans l'électrolyte afin d'obtenir une concentration finale de 100 nM. Le tampon d'hybridation est maintenu en contact avec la puce électronique pendant cinq minutes, avant d'être remplacé par une solution de KCl à 50 mM. Une mesure appelée H_{50}^1 est ensuite lancée et, une fois cet enregistrement terminé, l'électrolyte est remplacé par une solution de $[\text{KCl}] = 0,01$ mM. Une nouvelle acquisition ($H_{0,01}^1$) est alors effectuée. A l'issue de ces différentes étapes, la première réaction d'hybridation a été réalisée à 50 mM et la comparaison entre les fichiers H_{50}^1 et $S_{50}^{2'}$ d'une part et entre $H_{0,01}^1$ et $S_{0,01}^1$ d'autre part, permet d'évaluer les variations de tension relatives des différentes zones d'intérêt à 50 mM et à 0,01 mM. Par la suite, le mode opératoire précédent est réitéré afin d'effectuer la deuxième hybridation en utilisant les sondes Cy3-Seq 1*. La mesure $H_{0,01}^1$ joue le même rôle lors de la deuxième hybridation que $S_{0,01}^1$ dans la première.

La figure 7.10 présente les variations de tension des zones d'intérêt lors des deux hybridations successives. Sur le graphique 7.10.a, il apparaît que dans $[\text{KCl}] = 50$ mM, l'introduction des cibles Cy5-Seq 2* dans l'électrolyte a entraîné une variation positive moyenne de l'ordre de quelques millivolts du signal associé aux régions Seq 1 et Seq 2. Compte tenu de la différence moyenne de 4 mV entre les deux mesures consécutives effectuées avant hybridation (S_{50}^2 et $S_{50}^{2'}$), cette variation ne semble pas très significative. Il est à noter que lors des différentes expériences que nous avons réalisées à 50 mM, la première introduction de cibles a systématiquement induit une "montée" d'environ 5 à 10 mV du signal. Sur la figure 7.10.a, cette évolution n'est cependant pas identique sur les deux régions d'intérêt. En effet, il apparaît sur la zone complémentaire (Seq 2, à droite), un décalage positif moins important que sur la région non complémentaire de gauche (Seq 1), ce qui conduit à une différence $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ positive. Dans les études effectuées à 20 mM, l'apparition d'un delta positif a toujours été due à des variations de tension négatives plus grandes, en valeur

⁹Un tel mode opératoire pouvait se heurter au fait que les cibles ne restent pas hybrider lors de leur immersion dans un électrolyte de faible concentration en sel.

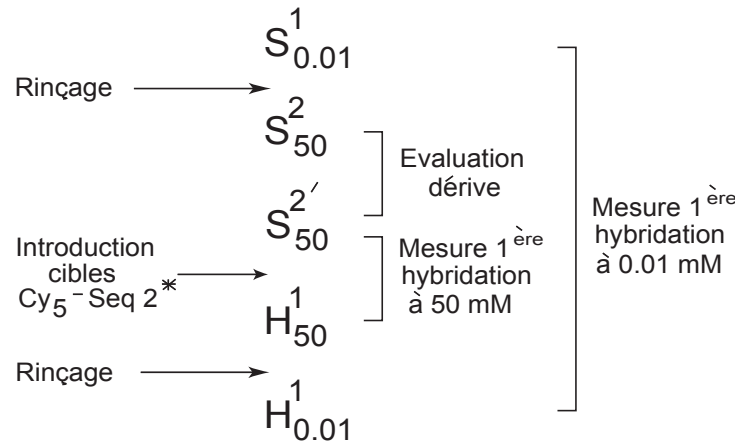


FIGURE 7.9: Déroulement de la phase correspondant à la première hybridation, lors d'une expérience d'hybridation à haut sel et de détection à bas sel.

absolue, sur la zone complémentaire que sur la zone non complémentaire. A 50 mM, la situation semble complètement différente, l'existence de deltas positifs étant systématiquement liée à une montée du signal moins importante sur la région où devrait avoir lieu l'hybridation que sur la partie non complémentaire.

A l'issue de la mesure effectuée à 50 mM, le remplacement de l'électrolyte par une solution de $[KCl] = 0,01$ mM permet d'avoir accès à l'évolution des variations de tension des différents transistors, à bas sel, par comparaison¹⁰ entre les fichiers $H_{0,01}^1$ et $S_{0,01}^1$ (cf figure 7.10.a'). Il apparaît que le signal mesuré à l'issue de la première hybridation reste environ 40 mV au-dessus de celui acquis avant l'introduction des sondes. La détection électronique étant très sensible à la concentration en sel de l'électrolyte de mesure, cette variation est sans doute attribuable à un rinçage "imparfait" de la solution à 50 mM, conduisant à une concentration réelle en KCl dans le bain de mesure supérieure à 0,01 mM. Il apparaît cependant sur le graphique 7.10.a' une nette différence de comportement entre la zone complémentaire et la zone non complémentaire. En effet, la différence de tension positive, évaluée par rapport à $S_{0,01}^1$, est plus importante sur la région non complémentaire que sur la partie complémentaire, ce qui conduit à l'apparition d'un $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ positif de l'ordre de 10 mV à bas sel.

Les résultats associés à l'étude de la seconde hybridation, dans un électrolyte de $[KCl] = 50$ mM, sont présentés sur la figure 7.10.b. Le signal obtenu reste globalement assez stable (variation positive de l'ordre du millivolt) et le delta observé peu significatif (-0,4 mV). En rediminuant la concentration de l'électrolyte de mesure à 0,01 mM (cf figure 7.10.b'), il apparaît par rapport à la mesure ($H_{0,01}^1$), que la zone complémentaire présente un décalage négatif d'environ 20 mV, tandis que la zone non complémentaire reste centrée autour de 0 mV. Ceci conduit, à nouveau, à l'apparition d'un delta positif, mais qui, contrairement à la première hybridation (cf figure 7.10.a'), est dû à un décalage négatif plus important de la région complémentaire.

Les intensités de fluorescence mesurées après la seconde hybridation, conduisent à des rap-

¹⁰Il est à noter que les enregistrements $H_{0,01}^1$ et $S_{0,01}^1$ sont espacés par deux rinçages : remplacement de $[KCl] = 0,01$ mM par $[KCl] = 50$ mM puis étape inverse.

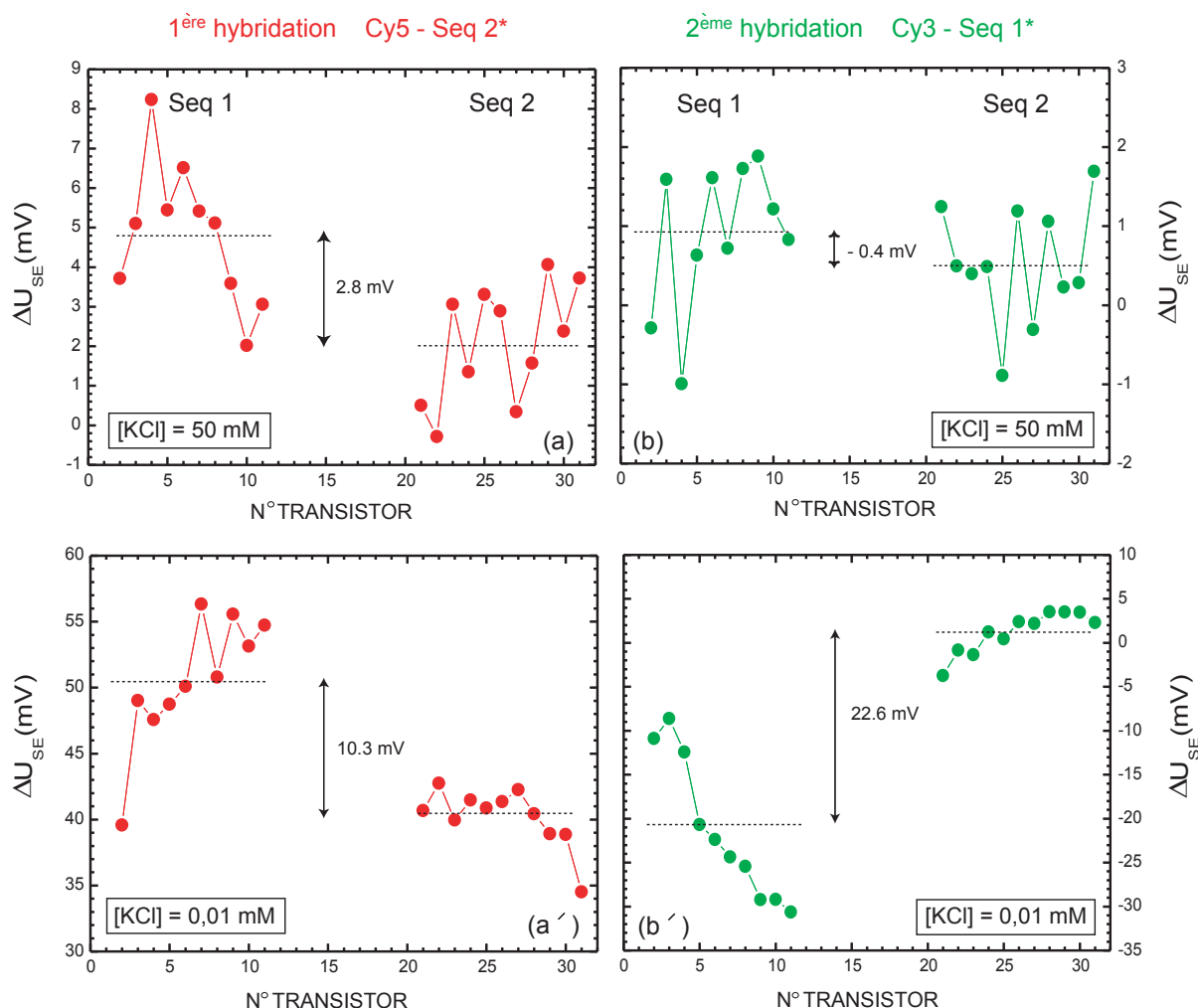


FIGURE 7.10: Réactions d'hybridation effectuées dans un tampon de KCl à 50 mM, les acquisitions des caractéristiques étant réalisées successivement dans [KCl] = 50 mM et [KCl] = 0,01 mM.

Première hybridation par les cibles Cy5-Seq 2*

(a) : différence de tension après - avant hybridation des zones d'intérêt mesurée à 50 mM. (a') : différence après - avant hybridation mesurée à 0,01 mM.

Deuxième hybridation par les cibles Cy3-Seq 1*

(b) : différence de tension après - avant hybridation des zones d'intérêt mesurée à 50 mM. (b') : différence après - avant hybridation mesurée à 0,01 mM.

ports $r = \frac{I_{Comp}}{I_{NonComp}} = 1,5$ pour les cibles Cy5-Seq 2* et $r = 2,2$ pour Cy3-Seq 1* confirmant que la réaction d'hybridation a bien eu lieu sur la surface. Ces deux enregistrements ne sont cependant pas effectués dans des conditions identiques, puisque trois rinçages ont espacé la première hybridation de l'acquisition de fluorescence, tandis que l'électrolyte n'a été remplacé qu'une fois entre la seconde hybridation et la mesure de fluorescence.

Il ressort de cette expérience que le protocole consistant à effectuer la réaction d'hybridation à

haut sel et la phase de détection à bas sel, permet l'obtention de signaux différentiels, $\Delta_{Comp}^{NonComp}$, environ deux à trois fois plus grands que lorsque les différentes étapes sont réalisées dans une solution de concentration élevée (20 mM, cf paragraphe 7.2.1). Ce résultat semble indiquer que les doubles-brins formés lors de la réaction d'appariement ne se dénaturent que partiellement lorsque la concentration en sel de l'électrolyte de mesure est diminuée. Par ailleurs, l'existence de décalages globaux des variations de tension lors des retours à bas sel, vraisemblablement dus à un rinçage imparfait de la solution dans laquelle a été effectuée la réaction d'hybridation, montre l'intérêt de pouvoir réaliser des mesures différentielles permettant de comparer les évolutions respectives des zones complémentaires et non complémentaires d'un même réseau de transistors.

Bilan des expériences d'hybridation à haut sel et de détection bas sel

Le graphique de la figure 7.11 présente les résultats de sept expériences d'hybridation à haut sel, réalisées dans un tampon de KCl de concentration 20 mM ou 50 mM suivant les cas, suivies systématiquement d'une détection à bas sel dans KCl = 0,01 mM ou 10 mM. Toutes les manipulations ont été effectuées en macrodépôt, en utilisant une concentration en cibles de 100 nM et en suivant le même protocole que celui décrit précédemment.

Dans [KCl] = 50 mM, les $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ associés aux premières hybridations sont tous positifs et de l'ordre de quelques millivolts. Ces résultats sont relativement proches de ce qui avait été obtenu lors des expériences effectuées à 20 mM. Les $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ obtenus à haut sel lors des secondes hybridations apparaissent beaucoup moins significatifs, puisqu'ils sont proches de zéro, voire même légèrement négatifs. Il est par contre intéressant de constater qu'à bas sel, toutes les mesures des différences de tension entre zone complémentaire et zone non complémentaire conduisent à des valeurs positives comprises entre quelques millivolts et 20 mV pour les premières hybridations. Les trois premières expériences indiquent des résultats similaires en ce qui concerne les secondes hybridations. Les variations de tension entre mesures à bas sel après hybridation et mesures bas sel avant hybridation sont cependant trouvées soit positives, soit négatives suivant les expériences. Cet effet avait déjà été observé lors de la description faite dans la section précédente et est éventuellement attribuable à un rinçage imparfait¹¹ du réseau de transistors lors du retour à bas sel. Compte tenu des résultats présentés dans les chapitres précédents, une modification à haut sel de la structure de la couche de biopolymères entraînant une réorganisation du système ne semble pas impossible.

7.3 Hybridation avec bloqueur

Dans les protocoles de puces à ADN sur fixation polylysine, une étape postérieure au dépôt des ADN sondes est requise [45, 46]. Cette étape a pour but de modifier les groupements positifs (NH_3^+) de la polylysine n'ayant pas réagi, afin de diminuer leur capacité à adsorber des molécules cibles d'ADN lors de l'hybridation. Schématiquement, l'utilisation d'une solution d'anhydride succinique permet de transformer les groupements amine de la polylysine en groupements amide en laissant libre un groupe carboxylate à l'autre extrémité de la chaîne. Cela conduit globalement à substituer la charge positive initiale de la couche de polylysine par une

¹¹Les rinçages sont effectués à l'aide d'une pipette de 1 mL. Compte tenu de la taille du cône plastique, il est impossible de pomper l'intégralité de la solution haut sel.

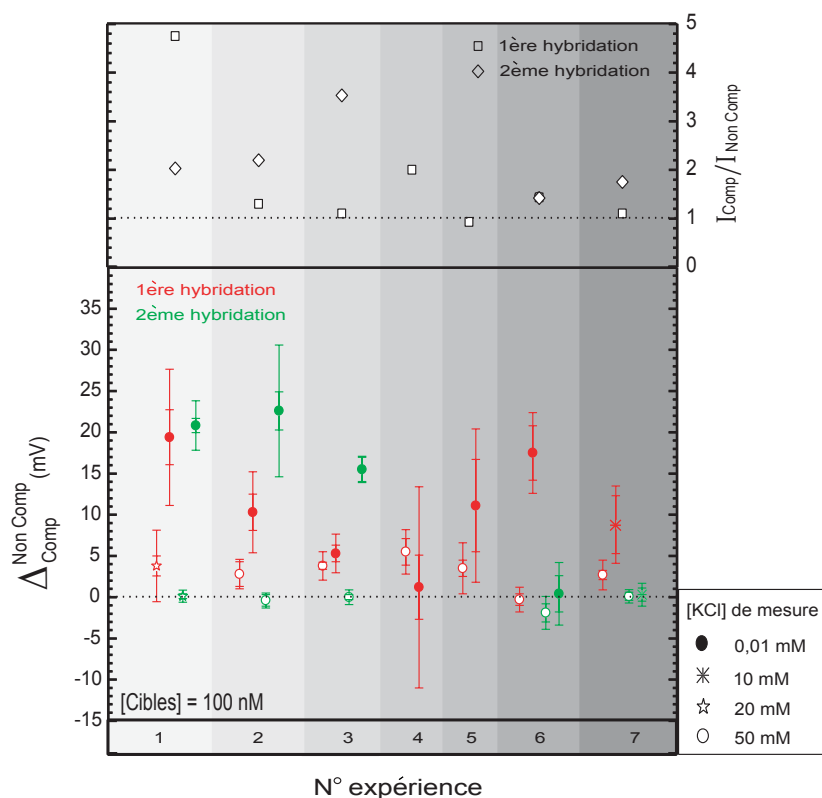


FIGURE 7.11: Expériences d'hybridation à haut sel et de détection à bas sel. Pour chaque manipulation, le premier point rouge correspond au $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ obtenu à haut sel et le deuxième point rouge à la mesure effectuée à bas sel. Les résultats de la deuxième hybridation sont représentés en vert. La concentration du tampon d'hybridation utilisé est systématiquement la même que celle du tampon de mesure haut sel. Ces valeurs sont indiquées dans l'encart en bas à droite. Les rapports de fluorescence $\frac{I_{Comp}}{I_{NonComp}}$ associés à chaque hybridation sont reportés sur le graphique du haut.

charge négative. On crée de ce fait un comportement répulsif entre la surface de la puce et les molécules d'ADN cibles, ce qui limite l'adsorption non spécifique lors de la réaction d'association des brins complémentaires et conduit à un meilleur rapport signal sur bruit lors de la détection optique de l'hybridation (cf. [45]). Afin de mettre en évidence l'influence d'une étape de blocage sur le système de détection électronique, pouvant éventuellement conduire à une augmentation de la différence de tension détectée entre les zones complémentaires et non complémentaires des réseaux de transistors lors des réactions d'hybridation, nous avons effectué une série d'expériences en introduisant une étape de blocage par l'anhydride succinique. Les premières sections de ce paragraphe présentent l'influence du bloqueur sur la détection électronique de la polylysine et de l'ADN. La dernière partie sera consacrée aux résultats obtenus concernant la détection de l'hybridation avec bloqueur.

7.3.1 Conditions de blocage

La réaction de blocage induisant une modification de la charge de surface, elle engendre également une variation de tension qui est à priori détectable électriquement. Les expériences concernant l'étude de l'influence du bloqueur ont été menées en préparant des réseaux de transistors, d'abord globalement incubés dans la polylysine puis partiellement recouverts d'ADN. Afin de vérifier le bon déroulement de ces différentes phases, trois acquisitions des caractéristiques sont effectuées respectivement avant dépôt de polylysine, avant dépôt d'ADN et après dépôt des sondes. Toutes les mesures sont réalisées dans $[KCl] = 10^{-5}$ M. A l'issue de la dernière mesure, la structure est rincée, séchée puis la solution de bloqueur est déposée sur la surface et laissée en incubation plus ou moins longtemps suivant l'expérience effectuée. Une fois la réaction terminée, le réseau est à nouveau rincé et une nouvelle acquisition lancée, en utilisant le même électrolyte que lors des mesures précédentes. Par la suite, la concentration en anhydride succinique de la solution de blocage sera exprimée par rapport à une concentration référence notée¹² c_B , correspondant à la dilution préconisée dans la plupart des protocoles de puces [45, 46].

Les figures 7.12.a et 7.12.b présentent deux expériences effectuées sur des réseaux partiellement recouverts d'ADN, en utilisant des concentrations et des temps de réaction de respectivement : c_B et 20 minutes pour l'expérience 7.12.a et $\frac{c_B}{100}$ et 5 minutes pour l'expérience 7.12.b.

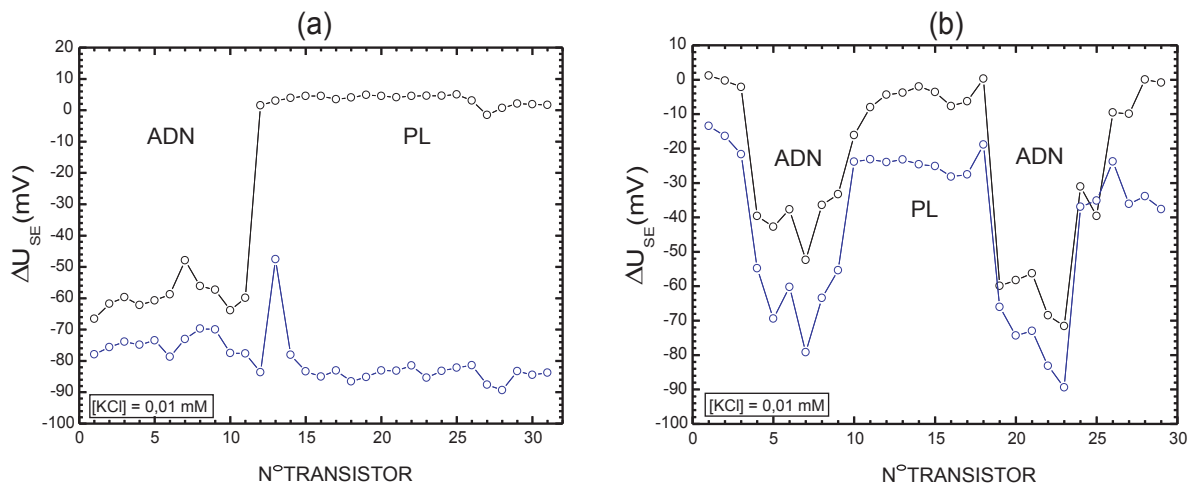


FIGURE 7.12: Etude de l'influence du bloqueur sur deux réseaux partiellement recouverts d'ADN. Pour les deux graphiques, en noir : variations de tension enregistrées entre une mesure effectuée après dépôt d'ADN et une mesure référence acquise après incubation de polylysine. En bleu : différences de tension enregistrées entre une mesure effectuée après réaction de blocage et la mesure référence. L'électrolyte utilisé est une solution de KCl à 10^{-5} M. (a) Conditions de blocage fortes : solution d'anhydride succinique de concentration c_B incubée pendant 20 minutes. Expérience réalisée en macrodépôt. (b) Conditions de blocage faibles : solution d'anhydride succinique de concentration $\frac{c_B}{100}$ incubée pendant 5 minutes. Expérience réalisée avec des microdépôts.

Le graphique de la figure 7.12.a montre que la réaction de blocage a eu pour effet d'entraîner un décalage négatif global des zones polylysine et ADN du capteur. Cette diminution de la tension U_{SE} apparaît cohérente avec la substitution de charges positives portées par la polylysine, par

¹² c_B correspond à la dilution : 6,3 mg d'anhydride succinique dans 24,6 μL de borate de sodium et 342 μL de méthyl-pyrrolidone.

des groupements négativement chargés. Même si ces résultats présentent globalement la même tendance que ceux obtenus lors du dépôt de molécules d'ADN, il est cependant à noter que, dans le cas de la réaction de blocage, la modification de la surface est ici attribuée à une réaction chimique ayant lieu dans la couche de polylysine et non à un apport de charges extérieures. Par ailleurs, la courbe bleue de la figure 7.12.a montre l'existence d'un décalage de tension négatif même sur les zones ADN. Cela peut s'expliquer par la présence sur ces parties du capteur de groupes amine n'ayant pas interagi avec les oligonucléotides lors de la phase de dépôt des sondes, et qui sont donc encore susceptibles de réagir avec la solution d'anhydride succinique. Cependant, la région ADN étant initialement plus négative que la surface de polylysine nue, le décalage induit par la solution bloquante est plus faible au niveau de cette zone. Il est également possible de déterminer les variations de tension entre la mesure après blocage et la mesure effectuée avant incubation de la polylysine, sur les surfaces d'oxyde de silicium nues. Il apparaît que la polylysine entraîne un décalage positif qui se réduit successivement lors du dépôt d'ADN et de la réaction de blocage, mais sans revenir pour autant à l'état initial des surfaces de SiO_2 .

La figure 7.12.b présente les résultats d'une expérience effectuée en utilisant des conditions de blocage plus douces. L'incubation d'une solution d'anhydride succinique de concentration $\frac{c_B}{100}$ pendant cinq minutes a eu également pour effet de provoquer un décalage négatif de l'ensemble du réseau d'environ 20 mV. Cependant, contrairement à la manipulation précédente, il est encore possible de distinguer les différentes régions ADN et polylysine à l'issue de la réaction de blocage. Cela peut être expliqué par une efficacité plus faible de la solution d'anhydride succinique, conduisant à la substitution de moins de groupements amine que lors de l'expérience de la figure 7.12.a. Dans de tels conditions, la surface de polylysine n'est que partiellement bloquée et, lors d'une expérience d'hybridation, l'adsorption non spécifique d'oligonucléotides reste importante. Par ailleurs, le fait que le décalage négatif soit du même ordre de grandeur sur les régions ADN et polylysine semble indiquer que le mécanisme de la réaction de blocage n'est que peu sensible à la présence préalable d'oligonucléotides sur la surface¹³.

Dans toute la suite, on distinguera entre conditions de blocage fortes, conduisant à des résultats proches de ceux de la figure 7.12.a et conditions de blocage faibles, correspondant à la figure 7.12.b. L'étude des états de charge obtenus en utilisant différentes conditions de blocage apparaît très intéressante. En effet, lors d'une détection optique de l'hybridation, l'augmentation du rapport signal sur bruit nécessite d'utiliser les conditions de blocage les plus fortes possibles afin de diminuer au maximum l'adsorption non-spécifique. Dans le cadre d'une détection électronique, la réaction de blocage peut éventuellement permettre de contrôler l'état de charge initial des différents capteurs, juste avant la réaction d'hybridation, et d'essayer de déterminer les conditions de sensibilité optimales pour la détection de l'hybridation. Les deux sections suivantes détaillent les différentes études menées sur le comportement des zones ADN et polylysine, lors de l'utilisation de conditions de blocage plus ou moins fortes.

Effet des variations des conditions de blocage sur les zones polylysine

La figure 7.13 présente les résultats de dix expériences de blocage des zones polylysine nues, effectuées en utilisant des concentrations de la solution d'anhydride succinique comprises dans la

¹³Dans l'expérience présentée sur la figure 7.12.b, les microdépôts correspondent à une densité surfacique d'oligonucléotides initialement déposée de l'ordre de 10^4 molécules par μm^2 , soit proche de la saturation (cf chapitre 4).

gamme c_B et $\frac{c_B}{1000}$. Toutes les manipulations ont été réalisées en utilisant des temps de réaction égaux à cinq minutes et les mesures ont été faites dans un électrolyte de $[KCl] = 0,01$ mM. Chaque point du graphique de la figure 7.13 correspond à la différence de tension enregistrée entre des mesures effectuées respectivement après et avant la réaction de blocage.

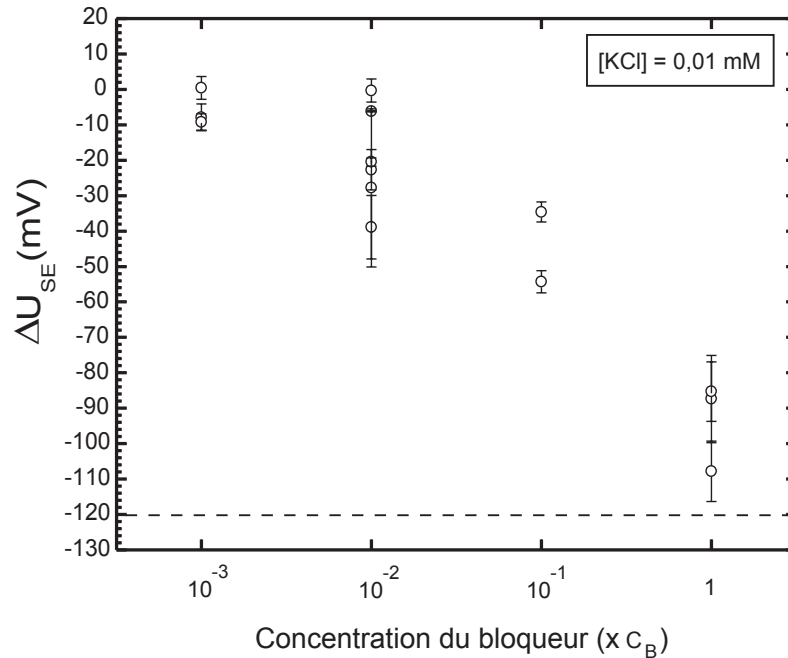


FIGURE 7.13: Effet des variations des conditions de blocage sur les zones polylysine nues : évolution des différences de tension entre mesures effectuées après et avant la réaction de blocage, en fonction de la concentration en anhydride succinique de la solution de bloqueur utilisé. La ligne horizontale en pointillés symbolise l'opposé de la moyenne des ΔU_{SE} enregistrés, lors des différentes expériences, entre la mesure effectuée après dépôt de polylysine et celle réalisée avant dépôt de polylysine (SiO_2 nu).

Le graphique 7.13 montre que le blocage des zones polylysine nues peut être relativement bien contrôlé dans la gamme de concentrations du bloqueur $[\frac{c_B}{1000}, c_B]$. Pour des concentrations de l'ordre de $\frac{c_B}{1000}$, la solution d'anhydride succinique n'induit quasiment pas d'effet, les décalages étant de l'ordre de quelques millivolts. L'augmentation de la concentration entraîne des décalages négatifs croissants des zones polylysine, qui atteignent des valeurs d'environ -100 mV dans des conditions de blocage fort. Cette étude a permis de déterminer l'amplitude de la gamme de concentration du bloqueur dans laquelle il est possible d'obtenir des états de charge différents des réseaux de transistors, à l'issue de la réaction de blocage.

Effet des variations des conditions de blocage sur les zones ADN

L'effet des variations des conditions de blocage sur les zones ADN a été étudié dans la gamme de concentration du bloqueur $[10^{-3}c_B, c_B]$, sur des réseaux partiellement recouverts d'oligonucléotides. Trois paramètres interviennent à priori dans cette analyse : la concentration

et le temps d'incubation de la solution d'anhydride succinique, ainsi que la quantité d'ADN initialement déposée sur la surface, avant l'étape de blocage. Afin de simplifier l'étude, toutes les réactions ont été effectuées pour une durée d'incubation constante prise égale à cinq minutes. Pour chaque expérience, on peut déterminer l'amplitude des pics d'ADN, évaluée par rapport à la ligne de base polylysine, grâce à la différence de tension entre deux mesures effectuées respectivement après et avant la phase de dépôt des sondes, dans le même électrolyte de mesure. L'opposé de l'amplitude des pics sera notée dans ce paragraphe Δ_{PL}^{Son} et reflète la densité surfacique d'ADN déposée. Par ailleurs, pour chaque zone ADN, il est également possible de mesurer les variations de tension entre une mesure réalisée après l'étape de blocage et une mesure effectuée avant. Les décalages en tension induits par le bloqueur étant la plupart du temps négatifs, Δ_{Son}^{Bloq} désignera l'opposé de cette grandeur. La figure 7.14 présente l'évolution des Δ_{Son}^{Bloq} en fonction de Δ_{PL}^{Son} . Ces données ont été collectées à partir de douze expériences effectuées sur six structures différentes.

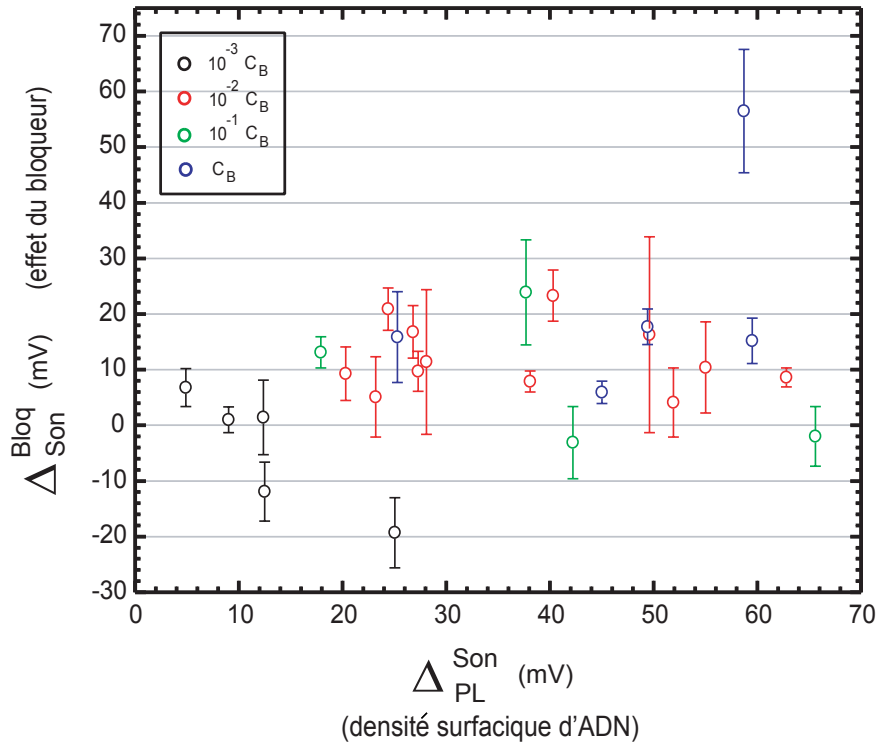


FIGURE 7.14: Evolution des valeurs absolues des décalages de tension Δ_{Son}^{Bloq} , induites par différentes conditions de blocage sur les régions ADN, en fonction des valeurs absolues, Δ_{PL}^{Son} , des amplitudes des pics d'ADN mesurées avant l'incubation dans la solution d'anhydride succinique. Toutes les mesures ont été effectuées dans un électrolyte de $[KCl] = 10^{-5}$ M et les temps d'incubation sont de cinq minutes.

Toutes les expériences de la figure 7.14 ont été effectuées en utilisant un électrolyte de $[KCl] = 10^{-5}$ M et les dépôts d'ADN ont été réalisés soit en macrodépôt (gamme $\Delta_{PL}^{Son} > 50$ mV), soit en microdépôt avec le spotter GESIM (gamme $\Delta_{PL}^{Son} < 50$ mV). Il apparaît que la solution de blocage induit essentiellement des décalages négatifs. L'existence de valeurs positives de Δ_{Son}^{Bloq} , correspondant à une diminution de l'amplitude des pics d'ADN à l'issue de l'étape de blocage, est obtenue lors de l'utilisation de très faibles concentrations du bloqueur ($10^{-3}C_B$). Dans ces conditions, il est probable que la concentration en anhydride succinique soit trop faible pour réagir

significativement avec la polylysine de la zone ADN. Ces diminutions d'amplitude sont donc plutôt attribuables à une perte d'ADN lors du rinçage de la solution de blocage. Contrairement aux résultats obtenus lors de l'étude effectuée sur la polylysine nue (cf figure 7.13), il ne se dégage pas d'évolutions systématiques en fonction de la concentration de la solution d'anhydride succinique employée. Il apparaît notamment que, pour les pics ayant une amplitude de l'ordre de 50 mV, l'utilisation d'une concentration c_B ou d'une solution cent fois moins concentrée entraîne globalement le même effet : un décalage négatif de 10 mV environ. Des manipulations ont également été effectuées en fixant le paramètre concentration et en jouant sur la durée d'incubation. Similairement aux résultats obtenus en variant la concentration du bloqueur à temps d'incubation fixé, aucune évolution systématique n'a pu être observée.

La comparaison entre l'effet de la solution de blocage sur les zones polylysine nues (décalage négatif croissant en fonction de la concentration en bloqueur) et sur les régions ADN (décalage de l'ordre de 10 mV indépendamment de la concentration du bloqueur), semble indiquer que la réaction chimique de surface doit dépendre de la présence ou non d'oligonucléotides dans la couche de polylysine. Par ailleurs, il apparaît difficile de préparer une puce électronique dont les régions ADN possèdent un état de charge donné après la réaction de blocage. En effet, l'anhydride succinique induisant systématiquement un décalage de l'ordre de 10 mV, le positionnement dans la gamme de détection repose essentiellement sur le contrôle des quantités d'ADN réellement adsorbées dans la couche de polylysine. Les analyses du chapitre 4 ont montré que l'obtention d'un pic d'ADN ayant une amplitude précise paraît très difficile.

7.3.2 Expériences d'hybridation avec bloqueur

Les graphiques 7.15 présentent une expérience d'hybridation réalisée avec bloqueur. Le réseau a d'abord été préparé par incubation globale dans la polylysine, puis le nanospotter Gesim a été utilisé pour déposer deux microdépôts d'oligonucléotides. La séquence Ars 5 (Seq 1) a été déposée sur la partie gauche du réseau et la séquence Ars 3 (Seq 2) sur la partie droite. Le nombre d'impulsions sélectionné correspond à $b = 10$ et la concentration en ADN des solutions est de 10 μM . A l'issue de la phase de dépôt des sondes, une solution d'anhydride succinique de concentration $10^{-1}c_B$ a été laissée en incubation durant cinq minutes sur la surface. La figure 7.15.a présente les variations de tension enregistrées lors de la phase de préparation du capteur. L'électrolyte utilisé est du chlorure de potassium à 10^{-5} M.

Bien que les deux microdépôts correspondent à des paramètres identiques (même concentration des solutions d'ADN et mêmes paramètres du spotter), les pics observés sur les zones ADN (courbe en cercles noirs de la figure 7.15.a) ont des amplitudes de -40 mV pour la séquence 1 et de -20 mV pour la séquence 2. Cela souligne à nouveau la difficulté du contrôle de la quantité d'ADN réellement adsorbée sur la couche de polylysine. L'incubation de la solution de bloqueur entraîne des décalages négatifs de l'ordre de -40 mV sur la zone polylysine nue et de 0 à -10 mV sur les zones ADN. Ces résultats sont conformes aux observations expérimentales effectuées dans les paragraphes précédents. Une fois le réseau de transistors préparé, deux hybridations successives ont été réalisées en suivant un protocole identique à celui décrit au paragraphe 7.2. La première hybridation a été effectuée avec une solution d'oligonucléotides Cy5-Seq 2*, complémentaires des brins d'ADN présents sur la partie droite, dilués à 100 nM dans un électrolyte de $[\text{KCl}] = 20$ mM. La seconde hybridation a été effectuée dans des conditions similaires avec des oligonucléotides

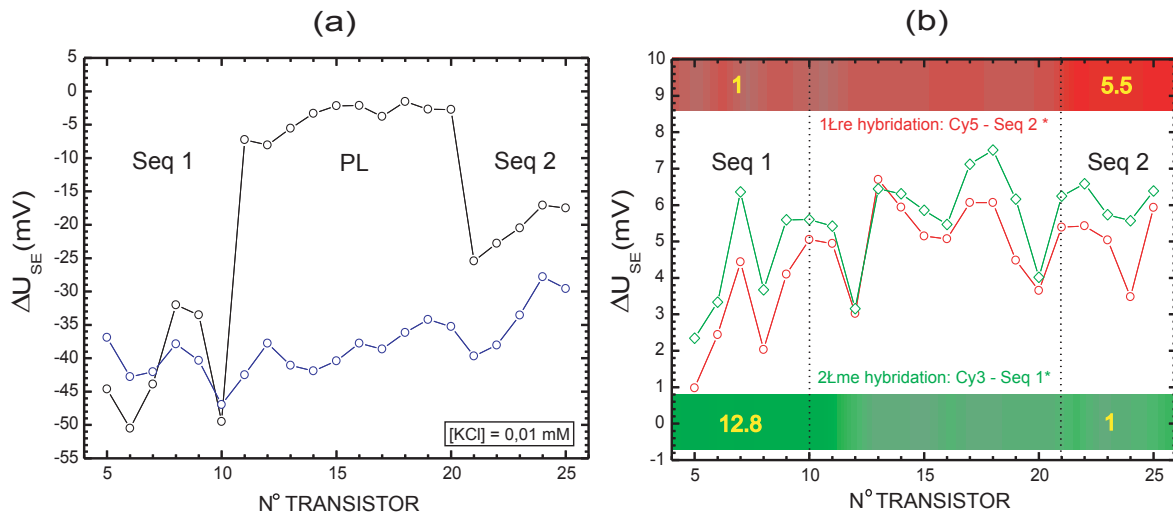


FIGURE 7.15: Expérience d'hybridation avec bloqueur. (a) Cercles noirs : différences de tension entre mesures après et mesure avant dépôt des sondes. Cercles bleus : différences de tension entre mesures après et mesure avant incubation dans la solution bloquante (durée d'incubation : 5 minutes, concentration $10^{-1}c_B$). Toutes les courbes sont associées à un électrolyte de mesure de $[KCl] = 10^{-5}$ M. (b) Différences de tension après hybridation / avant hybridation associées, en rouge, à la première hybridation et en vert, à la seconde hybridation. La concentration en cibles utilisée est de 100 nM dans les deux cas. Les réactions d'hybridation comme les mesures électroniques, ont été réalisées dans $[KCl] = 20$ mM.

Cy3-Seq 1*, complémentaires de la séquence déposée à gauche. Toutes les mesures des caractéristiques (avant première hybridation, après première hybridation et après seconde hybridation) correspondent à un électrolyte de $[KCl] = 20$ mM et, pour chaque hybridation, le temps d'incubation est de dix minutes sur la surface. La figure 7.15.b présente les différences de tension après hybridation / avant hybridation associées, en rouge, à la première hybridation et en vert, à la seconde hybridation. Dans les deux cas, il apparaît une montée globale du signal de l'ordre de 4 mV et aucune différence de comportement n'est observable entre les régions complémentaires et non-complémentaires. Ces résultats indiquent qu'aucune réaction d'hybridation n'a été détectée électroniquement. Les mesures de fluorescence (cf figure 7.15.b, en haut et en bas) collectées à l'issue du dernier enregistrement des caractéristiques révèlent cependant des intensités de fluorescence respectivement cinq fois et treize fois plus grandes sur la région complémentaire que sur la région non-complémentaire, lors de la première et de la deuxième hybridation. Ces valeurs du rapport $\frac{I_{Comp}}{I_{Noncomp}}$, nettement plus importantes que celles obtenues dans des conditions similaires lors des expériences sans étape de blocage, traduisent essentiellement l'effet du bloqueur permettant d'augmenter le rapport signal sur bruit en optique.

La figure 7.16 présente une statistique effectuée sur les expériences d'hybridation avec bloqueur. Toutes les puces ont été préparées en utilisant une solution d'anhydride succinique de concentration $10^{-2}c_B$, laissée en incubation pendant cinq minutes sur la surface. Les réactions d'hybridation ont systématiquement été réalisées en utilisant des solutions d'oligonucléotides dilués dans $[KCl] = 20$ mM ou 50 mM suivant les cas. Pour les manipulations 5 et 6, les variations de tension entre mesure après hybridation et mesure avant hybridation ont toutes été faites dans le même électrolyte de mesure ($[KCl] = 50$ mM) correspondant à la concentration en KCl de la solution d'hybridation. Le protocole de ces expériences est celui décrit au paragraphe 7.2. Pour

toutes les autres manipulations, les enregistrements des caractéristiques, à l'issue de chacune des deux réactions d'hybridation, ont été successivement effectuées en utilisant un électrolyte de mesure haut sel ($[KCl] = 20 \text{ mM}$ ou 50 mM suivant les cas) puis un électrolyte bas sel ($[KCl] = 10^{-5} \text{ M}$).

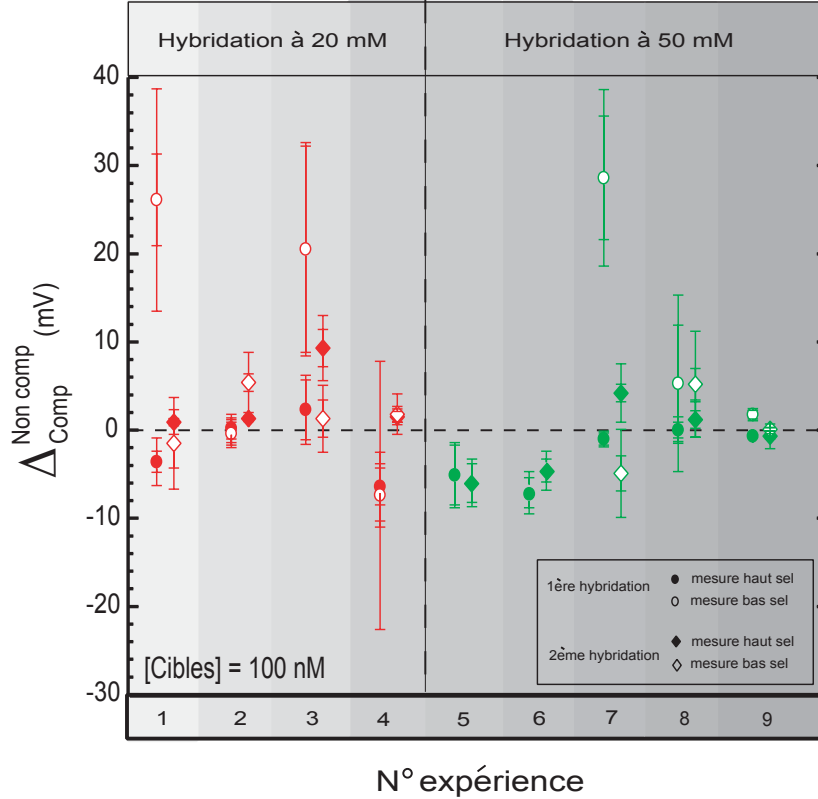


FIGURE 7.16: Bilan des expériences d'hybridation effectuées avec une phase de blocage à l'anhydride succinique (concentration de $10^{-2}c_B$, temps d'incubation de cinq minutes). Pour les manipulations 5 et 6, les variations de tension entre mesure après hybridation et mesure avant hybridation ont toutes été faites dans le même électrolyte de mesure ($[KCl] = 50 \text{ mM}$) correspondant à la concentration en KCl de la solution d'hybridation. Toutes les autres expériences ont été effectuées en suivant un protocole d'hybridation à haut sel ($[KCl] = 20 \text{ mM}$, expériences représentées en rouge ou $[KCl] = 50 \text{ mM}$, expériences représentées en vert) et de détection à haut sel (même concentration de l'électrolyte de mesure que celle utilisée lors de la phase d'hybridation) puis à bas sel ($[KCl] = 0,01 \text{ mM}$ pour toutes les expériences). La concentration en cibles a toujours été de 100 nM .

Dans toutes les expériences présentées sur la figure 7.16, les $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ obtenus sont soit négatifs, soit peu significatifs. Lors des contrôles de fluorescence effectués à l'issue de la dernière mesure électronique, les rapports $r = \frac{I_{Comp}}{I_{NonComp}}$ ont été trouvés en moyenne de 2.6 ± 1.2 pour la première hybridation et de 3.1 ± 1.7 pour la seconde hybridation¹⁴, montrant qu'il y a bien eu appariement spécifique sur les régions complémentaires des réseaux de transistors. Ces valeurs de r sont en moyenne plus grandes que celles obtenues lors des expériences effectuées sans blocage et

¹⁴Cette statistique a été réalisée sur les sept expériences de la figure 7.16.

dans des conditions similaires (cf figure 7.11 : en moyenne, $r = 1.8 \pm 1.3$ pour les premières hybridations, et $r = 2.1 \pm 0.8$ pour les secondes hybridations), ce qui reflète l'influence du bloqueur permettant l'augmentation du rapport signal sur bruit optique. Il apparaît, d'après l'ensemble de ces résultats, que l'utilisation d'un protocole faisant intervenir une étape de blocage n'a pas permis la détection électronique de l'hybridation, et ce bien que les rapports de fluorescence soient supérieurs à ceux obtenus sans bloqueur. Une analyse complémentaire de ces résultats est proposée dans le paragraphe suivant.

7.4 Interprétations et comparaisons à la littérature

La première section de ce paragraphe regroupe les conclusions générales que nous avons tirées des différentes expériences d'hybridation détaillées précédemment ; en particulier la sensibilité de la détection électronique de l'hybridation sur réseaux de transistors à effet de champ y sera évaluée. Dans la seconde partie, cette estimation sera comparée aux performances des dispositifs classiques utilisant la fluorescence ainsi qu'à celles d'autres systèmes de détection décrits dans la littérature.

7.4.1 Origine des signaux différentiels d'hybridation

Dans cette section, conformément aux interprétations présentées aux chapitres 5 et 6, la différence de potentiel existant entre la surface d'oxyde de silicium recouverte de polylysine et d'ADN et le volume de l'électrolyte sera considérée comme résultant de deux contributions : celle d'une couche compacte de biomolécules suivie d'une couche diffuse. Une mesure de ΔU_{SE} correspond à la somme de ces deux termes. Cependant, pour des concentrations de l'électrolyte de mesure de l'ordre de 20 mM, les différences de potentiel de couche diffuse, $\Delta\phi_{CD}$ associés aux zones du réseau où des sondes ont été déposées sont de l'ordre du millivolt (cf chapitre 5).

Cet ordre de grandeur peut être utilisé pour essayer d'interpréter les résultats des expériences présentées au paragraphe 7.2.1 où l'hybridation et la détection électronique sont effectuées dans $[KCl] = 20$ mM, en utilisant un protocole sans étape de blocage. Lors des manipulations 10 à 13 de la figure 7.8, réalisées avec des densités surfaciques de sondes déposées initialement supérieures à 10^4 molécules par μm^2 (macrodépôts), les $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ mesurés sont compris entre 1 et 8 mV, avec une moyenne de 4,3 mV. En comparant ces valeurs à l'ordre de grandeur de $\Delta\phi_{CD}$, pour des σ_{eff} de valeur raisonnable (~ 1 mV à 20 mM pour 10^{-4} C.m⁻²), il est vraisemblable que les $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ reflètent essentiellement des variations de potentiel de couche compacte entre les zones complémentaires et non complémentaires du réseau, induites par l'introduction de molécules cibles.

D'autre part, similairement à ce qui est observé dans la manipulation en macrodépôt détaillée sur la figure 7.5, il apparaît lors des expériences 10 à 13 de la figure 7.8 que les $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ mesurés résultent d'un décalage négatif des zones complémentaires, les variations de tension enregistrées sur les régions non complémentaires après introduction de cibles restant quasiment nulles. Les relevés de fluorescence montrant la présence d'adsorption non spécifique sur les zones non complémentaires, il semble que les molécules cibles restent "en surface" des zones non complémentaires, éventuellement attachées aux queues libres de polylysine en solution, et ne pénètrent quasiment pas dans la couche compacte dont les modifications seraient visibles électroniquement. Les expé-

riences 10 à 13 ayant été effectuées en utilisant des densités surfaciques de sondes importantes¹⁵, il est possible que dans ces manipulations, la couche compacte soit proche de la saturation en oligonucléotides à l'issue de la phase de dépôt des sondes, limitant la possibilité de diffusion de cibles dans la couche compacte. Concernant les évolutions des régions complémentaires lors des réactions d'hybridation 10 à 13 de la figure 7.8, la situation est à priori essentiellement la même du point de vue de l'adsorption non spécifique. Cependant, l'apparition d'un décalage négatif sur ces zones (cf figure 7.5) montre que le potentiel de couche compacte a été modifié et que des molécules cibles ont pénétré. Dans ces conditions, les $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ de l'ordre de 5 mV obtenus lors de ces expériences reflètent à priori essentiellement la détection de la réaction d'appariement entre simples-brins complémentaires dans la couche compacte.

Concernant le protocole expérimental consistant à effectuer la réaction d'hybridation à haut sel et la phase de détection à faible concentration de l'électrolyte de mesure (cf paragraphe 7.2.2), il apparaît sur la figure 7.11 qu'il conduit systématiquement à la mise en évidence à bas sel, d'une différence de comportement entre région complémentaire et zone non complémentaire. Cet effet se traduit à 0,01 mM par des $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ positifs s'étalant entre 1 mV et 25 mV avec une moyenne de 13 mV. Les expériences 10 à 13 de la figure 7.8 (hybridation et mesure à 20 mM) et celles de la figure 7.11 (hybridation à 20 mM, mesure à 0,01 mM) ayant été réalisées dans des conditions similaires (densités surfaciques de sondes déposées de l'ordre de 10^4 à 10^5 molécules par μm^2 , concentrations en cibles de 100 nM), on peut estimer que la diminution de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure de 20 mM à 0,01 mM, entraîne une augmentation d'un facteur 2 à 3 du signal différentiel $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ attribuable à la détection de l'hybridation. Dans des conditions expérimentales analogues, des manipulations réalisées sur des lamelles de silicium¹⁶ ont permis d'estimer un taux d'hybridation de l'ordre¹⁷ de 5 à 10% lors de la première comme lors de la seconde hybridation. L'immersion (ou le rinçage) dans un électrolyte de mesure entraînant des déperditions de molécules pouvant atteindre 90% (cf chapitre 4), la densité surfacique de sondes réellement présente sur la surface de polylysine lors des expériences d'hybridation 10 à 13 de la figure 7.8 et de la figure 7.11, peut être estimée de l'ordre de 10^3 à 10^4 molécules par μm^2 . Un taux d'hybridation de 10% conduirait alors à la formation d'environ 100 à 1000 doubles-brins par μm^2 . Cet ordre de grandeur apparaît cohérent avec les valeurs de $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ d'environ 13 mV obtenues lors des mesures électroniques effectuées à 0,01 mM puisqu'au chapitre 4, l'estimation

¹⁵Les résultats du chapitre 4 ont montré que des densités surfaciques déposées supérieures à environ 10^4 oligonucléotides par μm^2 entraînaient une saturation du signal électronique.

¹⁶Ces expériences ont été effectuées en déposant plusieurs macrodépôts de sondes Ars 3 et Ars 5 (concentration des solutions de 1 μM , volume déposé de 0,5 μL) sur des lamelles de silicium préalablement recouvertes de polylysine. Les deux hybridations ont ensuite été réalisées successivement avec des cibles fluorescentes, diluées à 100 nM dans un tampon d'hybridation de $[\text{KCl}] = 20$ mM. Le protocole a été le même que celui utilisé lors des manipulations "électroniques" d'hybridation et de détection dans le même électrolyte de mesure (temps d'incubation des cibles de 5 minutes, rinçage de la lamelle avec une solution de $[\text{KCl}] = 20$ mM après la première et après la seconde hybridation, cf paragraphe 7.2.1). A l'issue des réactions d'hybridation, deux images de fluorescence (l'une avec le laser rouge, l'autre avec le vert) ont été acquises. La comparaison entre les signaux collectés sur les dépôts complémentaires et non complémentaires permet d'évaluer, pour chaque hybridation, le taux d'hybridation moyen défini comme le pourcentage de molécules doubles-brins formées. Les densités surfaciques de sondes ont été supposées égales aux quantités initialement déposées.

¹⁷Dans [7], Fritz et collaborateurs ont estimé en utilisant des marqueurs radioactifs, un taux de 5% pour des hybridations entre simples-brins de 12 bases, avec des densités surfaciques de sondes d'environ 5×10^5 molécules par μm^2 et dans un tampon à 23 mM en sel.

de la sensibilité de la détection électronique d'ADN simples-brins à 0,01 mM a montré qu'un apport¹⁸ de 100 à 1000 molécules simples-brins par μm^2 entraînait des variations de tension de l'ordre de 10 mV. Les $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ d'environ 13 mV à 0,01 mM et de 5 mV à 20 mM semblent donc être attribuables à la formation de 100 à 1000 molécules doubles-brins par μm^2 , correspondant à la sensibilité de la détection électronique de l'hybridation sur réseaux de transistors. En prenant en compte une surface active des capteurs de l'ordre de 40 μm^2 , ces valeurs correspondraient à la détection de 0,05 à 0,5 attomoles par FET.

En ce qui concerne le protocole d'hybridation faisant intervenir une étape de blocage, les $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ associés aux expériences de la figure 7.16 apparaissent peu significatifs à haut sel (20 mM, expériences 1 à 4 et 50 mM, expériences 5 à 9 de la figure 7.16). Les mesures de fluorescence mettent cependant en évidence l'hybridation sur les régions complémentaires. Ces résultats semblent indiquer que la réaction d'hybridation s'est effectuée "en surface" de la couche de polylysine, les molécules cibles s'appariant vraisemblablement avec les oligonucléotides portés par les queues d'ADN libres en solution. En effet, conformément à l'analyse détaillée précédemment, les $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ mesurés pour des concentrations de l'ordre de 20 mM en KCl reflètent à priori essentiellement des modifications intervenant dans la couche compacte. L'appariement des oligonucléotides cibles avec les brins d'ADN portés par les queues libres de la polylysine n'entraînerait à haut sel que des variations de tension de l'ordre de grandeur de la différence de potentiel de couche diffuse, soit d'environ 1 mV. Il est possible que l'étape de blocage empêche, sur les zones complémentaires comme sur les régions non complémentaires, la diffusion des cibles jusque dans la couche compacte et donc rende la détection électronique de l'hybridation impossible. Lors de mesures effectuées à bas sel et contrairement à ce qui se passe sans bloqueur, aucun signal différentiel attribuable à l'hybridation ne semble pouvoir être détecté (cf figure 7.16). Il semble donc que les modifications induites par l'hybridation aient lieu, après l'étape de blocage, dans une zone de la couche de biopolymères non visible électriquement, soit globalement au-delà de la longueur de Debye valant 100 nm à 0,01 mM.

7.4.2 Comparaison à la littérature

Bien que la technique de fluorescence soit très efficace car très sensible, la recherche de modes de détection alternatifs de l'hybridation sur puces représente un défi intéressant [100, 101]. Ceux-ci permettraient éventuellement de se passer des étapes de marquage, un suivi en temps réel de l'hybridation, une diminution des quantités de biomatériau utilisé tout en assurant une miniaturisation accrue et une augmentation de la fiabilité. Plusieurs possibilités fondées sur des principes différents ont été proposées. Cependant, aucun de ces dispositifs ne semble à l'heure actuelle regrouper toutes les caractéristiques précédentes. De plus, aucun capteur intégré utilisant ces nouveaux principes de détection n'a pu encore être développé à grande échelle. Cette partie regroupe la présentation de quelques unes de ces techniques alternatives, leurs performances, leurs limitations ainsi que la comparaison entre le système que nous avons étudié, la détection par fluorescence, et les dispositifs décrits dans la littérature, utilisant ou non des structures

¹⁸Le chapitre 4 a montré qu'une variation de ΔU_{SE} de 10 mV à 0,01 mM, correspond à un ajout de 1000 molécules initialement déposées sur la surface. La prise en compte d'une perte de 90% des molécules lors de l'immersion dans un électrolyte de mesure à 0,01 mM, conduit à une réduction d'un facteur 10 de la valeur précédente. La sensibilité de la détection d'ADN simples-brins à 0,01 mM peut donc être globalement estimée de l'ordre de 10 mV pour 100 à 1000 molécules simples-brins par μm^2 .

semi-conductrices .

Sensibilité de la détection électronique de l'hybridation sur réseaux de transistors

Concernant la détection sur réseaux de transistors, les analyses présentées au paragraphe précédent ont montré que la formation de 100 à 1000 doubles-brins par μm^2 peut être associée au signal différentiel d'hybridation d'environ 5 mV à 20 mM et 15 mV à 0,01 mM. Ces expériences ont été réalisées avec des densités de sondes déposées (fixation polylysine) proches de la saturation (10^4 à 10^5 molécules par μm^2), avec des concentrations en cibles de 100 nM et pour des réactions d'hybridation effectuées à 20 mM entre oligonucléotides de 20 bases. Le taux d'hybridation a été évalué entre 5 et 10% et la surface active des capteurs étant de 40 μm^2 , les $\Delta_{Comp}^{NonComp}$ mesurés correspondent à la formation de 0,05 à 0,5 attomoles de doubles-brins par capteur.

Comparaison à la détection par fluorescence

Dans [50], D. Bowtell a comparé les performances de différents scanners de fluorescence commerciaux couramment utilisés dans la technique des puces à ADN. Les valeurs des seuils de sensibilité de ces différents appareils sont comprises entre 0,5 et 35 fluorophores par μm^2 (densités surfaciques correspondant à une détection dans des dépôts de l'ordre de 100 μm de diamètre). Par ailleurs, Cheung et collaborateurs [34] donnent un seuil limite d'environ 80 fluorophores par μm^2 dans des dépôts de 100 μm de diamètre, pour un système de fluorescence développé dans leur équipe. La technique de RT-PCR (cf appendice A) permettant d'incorporer environ un fluorophore toutes les 20 bases, le seuil de sensibilité de la détection par fluorescence lors d'expériences d'hybridation entre oligonucléotides courts est de l'ordre de 0,5 à 80 doubles-brins par μm^2 . Cet ordre de grandeur est donc environ 10 fois plus faible que celui associé à la détection électronique à 0,01 mM (100 à 1000 doubles-brins par μm^2 , lors d'hybridations réalisées à haut sel avec des concentrations en cibles de 100 nM).

Comparaison aux techniques alternatives de détection à l'aide de structures semi-conductrices

En 1997, Souteyrand et collaborateurs [2] ont pour la première fois mis en évidence la possibilité d'utiliser un unique capteur semi-conducteur pour réaliser la détection d'une hybridation entre oligonucléotides. Les structures en silicium doppé sont similaires à une structure MOS et ont une surface active de 0,07 cm^2 , l'épaisseur de la couche isolante d'oxyde de silicium étant de 10 nm. La variation de charges induite par l'appariement entre simples-brins complémentaires à l'interface conduit à un réarrangement des porteurs dans le silicium (déplétion ou accumulation). Ce changement peut alors être caractérisé en mesurant la variation d'impédance des capteurs en mode AC. Les sondes sont fixées de manière covalente sur la surface via un intermédiaire silane (cf chapitre 2). Ce dispositif a permis de mettre en évidence un signal d'hybridation entre oligonucléotides de 18 bases de quelques dizaines de millivolts, en introduisant dans l'électrolyte de mesure des concentrations en cibles de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\simeq 100$ nM). Aucun moyen de vérification externe n'ayant été utilisé, la densité surfacique de sondes et le taux d'hybridation n'ont pas été quantifiés.

Fin 2002, Fritz et collaborateurs [7] ont rapporté la détection électronique différentielle d'une hybridation entre oligonucléotides de 12 bases dans un tampon à 23 mM en sel. Les capteurs utilisés sont des structures semi-conductrices de type EIS (Electrolyte-Insulator-Semiconductor) placées à l'extrémité de microleviers de silicium. Chaque capteur à une surface active d'environ $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m} = 2500 \mu\text{m}^2$, et l'épaisseur de la couche isolante d'oxyde de silicium est d'approximativement 2 nm. Afin de réaliser la mesure différentielle, deux microleviers sont positionnés dans une cellule microfluidique dans laquelle peuvent être introduites successivement les solutions contenant les cibles puis l'électrolyte de rinçage. Tous les enregistrements sont effectués en mode AC, par mesure d'impédance. La fonctionnalisation des surfaces actives est réalisée de manière similaire à celle décrite dans ce manuscrit, en utilisant une fixation polylysine. L'utilisation de marqueurs radioactifs a permis d'évaluer les densités surfaciques de sondes à environ 5×10^5 oligonucléotides par μm^2 , soit de l'ordre de grandeur des concentrations surfaciques estimées lors des expériences d'hybridation que nous avons réalisées en macrodépôts. Il apparaît que l'injection dans la chambre microfluidique d'une solution de cibles complémentaires des sondes fixées sur l'un des deux capteurs (concentration en cibles de 80 nM) entraîne une variation du signal différentiel de l'ordre de 3 mV, dans un tampon d'hybridation et de mesure à 23 mM en sel. Dans ces expériences, le marquage radioactif permet d'estimer le taux d'hybridation à 5%, ce qui correspond à la formation de 3×10^4 doubles-brins par μm^2 . Ces résultats sont globalement comparables à ceux que nous avons obtenus lors des expériences d'hybridation et de détection à haut sel. Le dispositif que nous avons utilisé présente cependant l'avantage d'être plan, donc compatible avec les techniques de microdépôt couramment employées lors des expériences sur puces à ADN. Par ailleurs, la miniaturisation (surface active des transistors de $\sim 40 \mu\text{m}^2$ dans notre cas et d'environ $2500 \mu\text{m}^2$ dans le dispositif développé par Fritz et collaborateurs) permet d'augmenter le nombre de séquences analysables en parallèle sur une même puce, ainsi que de diminuer la quantité de cibles nécessaire à la détection d'un signal d'hybridation. Dans [7], Fritz et collaborateurs ont également montré la possibilité d'appliquer la méthode de détection électronique à l'étude des mutations en biologie, en mettant en évidence un signal différentiel associé à la détection d'une mutation ponctuelle.

En 2004, Uslu et collaborateurs [8] ont utilisé une matrice de 4x4 transistors espacés de 200 μm afin de mettre en évidence une hybridation entre oligonucléotides de 19 paires de bases. Les capteurs ont une surface active de 8 ou 24 μm^2 et sont recouverts d'une couche d'oxyde de silicium d'environ 10 nm d'épaisseur. La fixation des sondes est de type covalent (fixation utilisant un intermédiaire silane) et les réactions d'hybridation sont réalisées dans un électrolyte à 6 mM en sel. Il est cependant à noter qu'il ne s'agit pas de mesures différentielles effectuées entre différents transistors d'une même puce. L'influence de l'introduction de cibles complémentaires et de cibles non complémentaires sur le signal électronique est évaluée lors de deux expériences distinctes effectuées avec des sondes de même nature. Les auteurs concluent à la détection de l'appariement spécifique entre brins complémentaires. La comparaison avec les résultats que nous avons obtenus est cependant difficile à effectuer puisque, dans les deux cas, ni le taux d'hybridation, ni les concentrations de cibles introduites ne sont précisées.

Enfin en 2004, Hahm et collaborateurs [9] ont montré la faisabilité d'une détection spécifique et très sensible de l'hybridation de l'ADN en utilisant des nanofils semi-conducteurs. La fonctionnalisation de ces nanostructures avec des acides nucléiques peptidiques (PNA)¹⁹, leur permet de

¹⁹Les PNA (Peptide Nucleic Acid) sont des analogues structuraux des oligonucléotides qui sont constitués d'un

détecter en temps réel l'hybridation entre des séquences de 30 bases jusqu'à une concentration de 10 fM. Ces méthodes fondées sur l'utilisation de nanostructures semblent extrêmement sensibles et montrent la miniaturisation potentielle des dispositifs de détection électronique. Cependant, les tests actuels sont réalisés sur des structures uniques et la faisabilité d'un réseau dense et ordonné de nanofils ou de nanotubes ayant des propriétés électroniques similaires reste encore à démontrer.

Comparaison aux techniques alternatives fondées sur d'autres principes de détection

Deux approches utilisant des capteurs micromécaniques ont été envisagées pour détecter l'hybridation de l'ADN sur des surfaces. La première consiste à mesurer le changement de masse induit par l'hybridation des molécules cibles à la surface d'un capteur mécanique sur lequel ont été préalablement greffées les sondes. La détection se fait en mesurant le décalage de la fréquence de résonance du capteur micromécanique oscillant dans le milieu liquide. Cette méthode utilise le plus souvent un cristal piézoélectrique²⁰ pour une lecture "électro-mécanique" directe de l'hybridation [12, 13]. Okahata et collaborateurs [13] rapportent une sensibilité de l'ordre du ng/cm² sur un capteur d'environ 5 mm². L'hybridation est réalisée entre oligonucléotides de dix bases, ce qui correspond à détecter de l'ordre de 10³ à 10⁴ molécules par μm^2 soit environ 10 à 100 femtomoles de doubles-brins par capteur. Ce type de détection est sensible et permet en outre une mesure en temps réel de l'hybridation. Par contre, la surface relativement importante des microbalances de quartz ($\sim \text{mm}^2$) constitue une limitation importante pour une application sur puces à ADN. C'est pour cette raison qu'une détection similaire a été développée sur des microleviers de plus faibles dimensions (de l'ordre du centième de mm²). McKendry et collaborateurs [14] ont ainsi utilisé un réseau de 8 microleviers (chacun ayant une surface de 0.05 mm²) pour détecter des mutations sur des oligonucléotides de 12 bases. La mesure est effectuée en évaluant directement la déflexion du levier sans le faire osciller (mode DC). La sensibilité par capteur est d'environ 10⁴ doubles-brins par μm^2 (80 femtomoles par capteur) pour une densité surfacique en sondes de l'ordre de 10⁵ sondes par μm^2 . L'ensemble de ces méthodes micromécaniques permet une détection sensible de l'hybridation mais aussi d'autres interactions biologiques (protéines/ADN, antigènes/anticorps). Des difficultés persistent néanmoins pour une intégration à grande échelle. D'une part, la surface de ce type de capteur est relativement importante comparée aux dimensions des dépôts sur puces. D'autre part, les techniques de microdéposition utilisées dans la technologie des puces à ADN ne sont pas directement applicables à ce type de dispositifs.

Un suivi en temps réel de l'hybridation, sans marquage préalable des cibles, peut être réalisé par une détection "opto-électronique" fondée sur la résonance plasmon de surface (SPR) [10, 11]. Ce principe optique²¹ repose sur la modification de l'indice de réfraction d'une solution au voisinage d'une fine couche métallique, due à l'appariement de molécules cibles lors de l'hybridation.

squelette polyamide non chargé sur lequel sont greffées des bases. Les PNA sont susceptibles de s'hybrider avec des séquences d'ADN et d'ARN avec une plus grande affinité et stabilité que les complexes ADN/ADN ou ADN/ARN. Par ailleurs, les PNA étant non-chargés, ils n'induisent aucune modification des propriétés électroniques des nanostructures lors de la fonctionnalisation (les seules modifications induites sont dues à la réaction de couplage PNA/surface).

²⁰Cette technique est dénommée QCM en anglais pour Quartz Crystal Microbalance.

²¹Cette technique fut initialement développée par la société Biacore pour caractériser des interactions entre protéines (voir le site internet de publication : <http://www.biacore.com/lifescience/publications.lasso>).

Pour amplifier les quantités de matériel biologique disponible et permettre une détection sur plusieurs surfaces, Jin-Lee et collaborateurs [11] ont utilisé un système microfluidique et sont parvenus à détecter la formation de 10^3 à 10^4 doubles brins par μm^2 (20 femtomoles par capteur). Cette méthode est, comme la fluorescence, relativement complexe. Elle ne devrait donc pas conduire à la conception de puces à haute densité, d'autant plus que les surfaces des capteurs (de l'ordre 0.1 à 1 mm^2) sont grandes devant les tailles des dépôts sur puces (500 à $10^4 \mu\text{m}^2$). Une méthode optique de détection de l'hybridation sur puces à ADN particulièrement sensible, fait intervenir un marquage préalable des cibles à l'aide de nanoparticules d'or. L'appariement entre simples-brins modifiant les propriétés optiques de la surface, l'hybridation peut être caractérisée par une détection par contraste optique en transmission ou en réflexion [102]. Dans [103], Taton et collaborateurs ont montré que cette technique s'avérait trois à cent fois plus sensibles que la fluorescence en étudiant un même système biologique par les deux méthodes. Ce principe de détection présente plusieurs avantages dans l'optique d'une application à des puces forte densité. D'une part il permet la détection sur des surfaces de faible dimension ($\sim 20 \mu\text{m}^2$). D'autre part, les marqueurs utilisés ont une bonne stabilité contrairement aux fluorophores qui peuvent être détériorés par la lumière ; le désavantage majeur de cette approche étant évidemment la nécessité de marquer les molécules cibles, ainsi que le coût des nanoparticules d'or.

Des méthodes électrochimiques de détection de l'hybridation ont également été envisagées. Ces techniques présentent un avantage majeur puisque les réactions électrochimiques conduisent à un signal électronique directement mesurable, sans avoir recours à un système de lecture complexe. Les stratégies envisagées reposent sur les propriétés oxydo-réductrices des bases d'ADN, de molécules fixées sur les cibles ou s'intercalant spécifiquement dans la double-hélice, ou encore sur le transport de charges à travers l'ADN. Une description de ces différentes méthodes, ainsi que la comparaison de leurs performances est donnée dans [18]. Il ressort de ces études que la sensibilité des dispositifs électrochimiques de détection de l'hybridation est globalement comprise entre 1 femtomole d'ADN double brin par capteur et 10^{-6} femtomoles. La comparaison directe avec la détection sur transistor à effet de champ s'avère cependant difficile à établir, les densités de sondes utilisées, les taux d'hybridation voire même les surfaces des capteurs n'étant que rarement précisés.

Chapitre 8

Conclusion

La mise en place de systèmes permettant de détecter la réaction d'hybridation entre molécules d'ADN non marquées apparaît potentiellement très intéressante dans le cadre de la technologie des puces à ADN (chapitre 2), et a fait l'objet ces dernières années d'efforts importants. Le projet développé dans notre laboratoire a permis de montrer la possibilité d'utiliser des réseaux de transistors à effet de champ afin de détecter électroniquement et de manière différentielle, l'appariement spécifique entre oligonucléotides de 20 bases n'ayant subi aucune modification préalable.

La première étape de notre démarche (chapitre 3 et 4) a consisté à valider la faisabilité d'une détection électronique de biomolécules chargées sur un réseau de FETs. L'influence de la présence de polylysine adsorbée directement sur la surface des transistors, puis de celle de courts fragments d'ADN immobilisés sur les zones actives des capteurs préalablement recouverts de polylysine, ont été étudiées de manière systématique. Les variations des caractéristiques courant-tension obtenues ont montré des effets contraires qui peuvent être corrélés à un apport de charges positives dans le cas de la polylysine et négatives en ce qui concerne l'ADN. L'utilisation d'un dispositif de nanodéposition (appendice B) permettant de réduire les volumes des microdépôts jusqu'à quelques dizaines de picolitres environ, a rendu possible l'estimation de la sensibilité du dispositif de détection électronique en fonction de la concentration surfacique d'oligonucléotides. Il apparaît (chapitre 4) que le signal électronique détecté peut être considéré comme proportionnel au nombre moyen de molécules d'ADN par unité de surface, tant que celui-ci reste inférieure à $10^3 - 10^4$ molécules par μm^2 , avec une variation de 10 mV pour 100 à 1000 molécules déposées par μm^2 . Au-delà de $10^3 - 10^4$ molécules par μm^2 , une saturation du signal est observable, les variations de tension restant alors de l'ordre de 100 mV. La détection de microdépôts de faibles concentrations en biopolymères est limitée par l'existence de signaux électroniques parasites observés avec des solutions servant aux dilutions. Tous ces ordres de grandeur sont donnés à un facteur 10 près puisque différentes expériences ont montré une désorption d'oligonucléotides pouvant atteindre 90% lors d'une première immersion dans un électrolyte de mesure puis un rinçage du réseau.

En un deuxième temps, des études ont été menées afin de mettre en évidence la variation

des signaux électronique en fonction de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure. A bas sel ($[KCl] \lesssim 10$ mM), une diminution de l'amplitude des pics électroniques associés aux régions polylysine seule et ADN + polylysine est observable expérimentalement lorsqu'on augmente la concentration d'un électrolyte de KCl (chapitre 5). Cet effet a été analysé dans le cadre d'une description simple du système fondée sur le modèle de Gouy Chapman, et peut être relié à l'écrantage par les contre-ions de la solution, d'une charge effective constante, σ_{eff} , décrivant l'interface électrolyte/biopolymères/FET. Dans ce régime, l'ajustement des variations de tension mesurées lors d'augmentations progressives de la concentration en KCl a mis en évidence que l'adsorption de polylysine tendait à surcompenser la charge effective initiale de la surface de SiO₂ nue des capteurs, la fixation ultérieure d'ADN sur la polylysine tendant à neutraliser la charge de surface. A haut sel ($[KCl] \gtrsim 10$ mM), il apparaît un phénomène d'inversion des pics électroniques associés aux régions polylysine et ADN sortant complètement du cadre du modèle σ_{eff} constant (chapitre 5). Ceci semble dû à l'existence d'un seuil de concentration au-delà duquel les contre-ions de l'électrolyte de mesure pénètrent dans la couche de biopolymères, entraînant une réorganisation de cette dernière qui ne peut plus alors être décrite par un unique paramètre σ_{eff} constant. L'origine physique de ce phénomène n'a pu être clairement identifiée. Dans le cas des pics de polylysine nue, il semble que l'effet d'effondrement d'une brosse de polymères relaté dans la littérature et prévu d'un point de vue théorique, intervienne dans notre système. Les expériences du chapitre 6 ont notamment montré l'existence d'une dépendance du phénomène en fonction de la nature des contre-ions utilisés : les pics associés aux zones polylysine nue restent visibles électroniquement pour des concentrations en KNO₃ de l'ordre de 100 mM, alors que pour des concentrations équivalentes en KCl, le phénomène d'inversion de pics s'est déjà manifesté. En ce qui concerne le phénomène d'inversion de pics observé sur les régions ADN, il semble que la présence d'oligonucléotides dans la couche de polylysine tende à augmenter le seuil de concentration au-delà duquel les contre-ions pénètrent dans la couche de biopolymères. L'entrée d'ions conduit vraisemblablement à une réorganisation de la structure ADN - polylysine, les oligonucléotides tendant à diffuser vers la surface d'oxyde de silicium constituant la zone active des capteurs lors de séries d'augmentations successives de la concentration en sel.

Ces différentes études ont constitué des étapes préliminaires à la détection électronique de l'hybridation entre oligonucléotides de 20 bases, réalisée avec une fixation des sondes de type polylysine (chapitre 7). Un aspect important est l'utilisation d'un réseau de capteurs permettant une mesure différentielle entre une région d'intérêt sur laquelle ont été déposées des sondes complémentaires des cibles et une région de contrôle où sondes et cibles sont non complémentaires. La mesure étant effectuée dans le même électrolyte, l'influence des variations de température, de pH ou encore de concentration en sel sur la différence de signal enregistrée entre les deux zones est alors limitée. Les premières expériences ont été menées en supprimant l'étape de blocage visant à diminuer l'adsorption non spécifique des cibles, et en utilisant un tampon d'hybridation de faible concentration (~ 20 mM). Ce protocole a conduit à la mise en évidence d'un signal différentiel de l'ordre de 5 mV lors d'hybridations et de mesures dans un électrolyte de $[KCl] = 20$ mM. Afin d'augmenter ces valeurs, des manipulations ont été effectuées en réalisant la réaction d'hybridation à haut sel (20 ou 50 mM) et la phase de détection à bas sel (0,01 mM). Dans ces conditions, les différences obtenues sont d'environ 15 mV. D'après l'estimation de la sensibilité du système, ces résultats correspondraient à la détection de la formation de 100 à 1000 doubles-brins par μm^2 . Cette valeur apparaît cohérente avec un taux d'hybridation de l'ordre de 10% déterminé à partir de mesures de fluorescence.

En un deuxième temps, afin de se rapprocher des protocoles couramment utilisés dans les puces à ADN sur fixation polylysine [44, 46], des expériences ont également été menées en effectuant une étape de blocage à l'issue de la phase de dépôt des sondes. Dans ces conditions, aucun signal électronique significatif caractérisant l'appariement spécifique n'a été observé, et ce malgré la mise en évidence de l'hybridation lors des contrôles de fluorescence. Ces résultats semblent donc indiquer que les modifications induites par l'hybridation ont lieu, après l'étape de blocage, dans une zone de la couche de biopolymères non visible électroniquement.

La sensibilité du système de détection électronique de l'hybridation développé au laboratoire (100 à 1000 doubles-brins par μm^2), est proche de celle associée à la technique classique de fluorescence (0,5 à 80 doubles-brins par μm^2) et globalement du même ordre de grandeur que celle des autres dispositifs alternatifs décrits dans la littérature ([2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18]). Par ailleurs, les capteurs utilisés étant directement dérivés de la technologie CMOS, la fabrication rapide et à grande échelle de réseaux denses de ce type de transistors, est tout à fait envisageable, comme en témoigne la réalisation récente par la société Infineon [63] de puces de 1 mm^2 intégrant une matrice à deux dimensions de 16384 FETs et l'électronique de lecture associée.

Dans l'immédiat, même si le manque de contrôle de la fixation polylysine constitue une limite à une application directe de cette méthode électronique à la technologie des puces à ADN, l'utilisation de réseaux de transistors à effet de champ de faibles dimensions apparaît comme une technique sensible permettant une détection directe et sans marquage de l'hybridation. La parallélisation potentielle du système de détection électronique de l'hybridation mis en place dans notre groupe ainsi que les résultats présentés dans ce travail, laissent donc entrevoir, à moyen terme, la possibilité d'applications de ce dispositif à des tests biologiques.

— **Appendice A** —

Clonage, électrophorèse sur gel et PCR

Le clonage, l'électrophorèse sur gel et la PCR sont aujourd'hui des techniques clé de l'analyse des gènes, permettant d'une part de modifier le génotype d'un organisme afin d'étudier la fonction d'un gène et, d'autre part, de séparer ou d'amplifier des fragments d'ADN. La première partie de cet appendice présente brièvement ces trois méthodes. La seconde section est consacrée à un bref aperçu des évolutions qu'elles ont entraînées dans le domaine de l'analyse des gènes.

A.1 Quelques techniques expérimentales de base

A.1.1 Le clonage de gènes ou technique de l'ADN recombinant

Afin d'étudier la fonction d'un gène, l'idée la plus simple est d'isoler la partie de l'ADN chromosomal d'intérêt et de la répliquer en l'absence d'autres gènes. Dans les années soixante-dix, des techniques qui permettent de modifier de façon précise et dirigée le génotype d'un organisme, ont été développées. L'ensemble de ces méthodes est appelé génie génétique, clonage ou technique de l'ADN recombinant. La première expérience de clonage fut réalisée en 1972 par Jackson, Symons et Berg [30]. Le clonage d'une molécule d'ADN se déroule en plusieurs étapes (cf figure A.1) :

- Le fragment d'ADN d'intérêt est d'abord isolé grâce à l'utilisation d'enzymes spécifiques appelées enzymes de restriction. Ces enzymes coupent l'ADN chaque fois qu'il présente une courte séquence nucléotidique donnée (les sites de restriction), constituée de quatre à six bases. La première enzyme de restriction a été isolée en 1968 par Meselson et Radding [104].
- Les fragments ainsi isolés, appelés fragments de restriction, sont ensuite insérés dans un vecteur. Un vecteur est une molécule d'ADN relativement petite qui est capable de se répliquer à l'intérieur d'une cellule dans un organisme hôte. L'insertion des fragments de restriction dans le vecteur nécessite d'être capable de lier ensemble deux molécules d'ADN. Cela est rendu possible grâce à l'utilisation d'enzymes ADN-ligase, découvertes pour la première fois en 1967 par Weiss et Richardson [105] d'une part et Zimmerman et collaborateurs

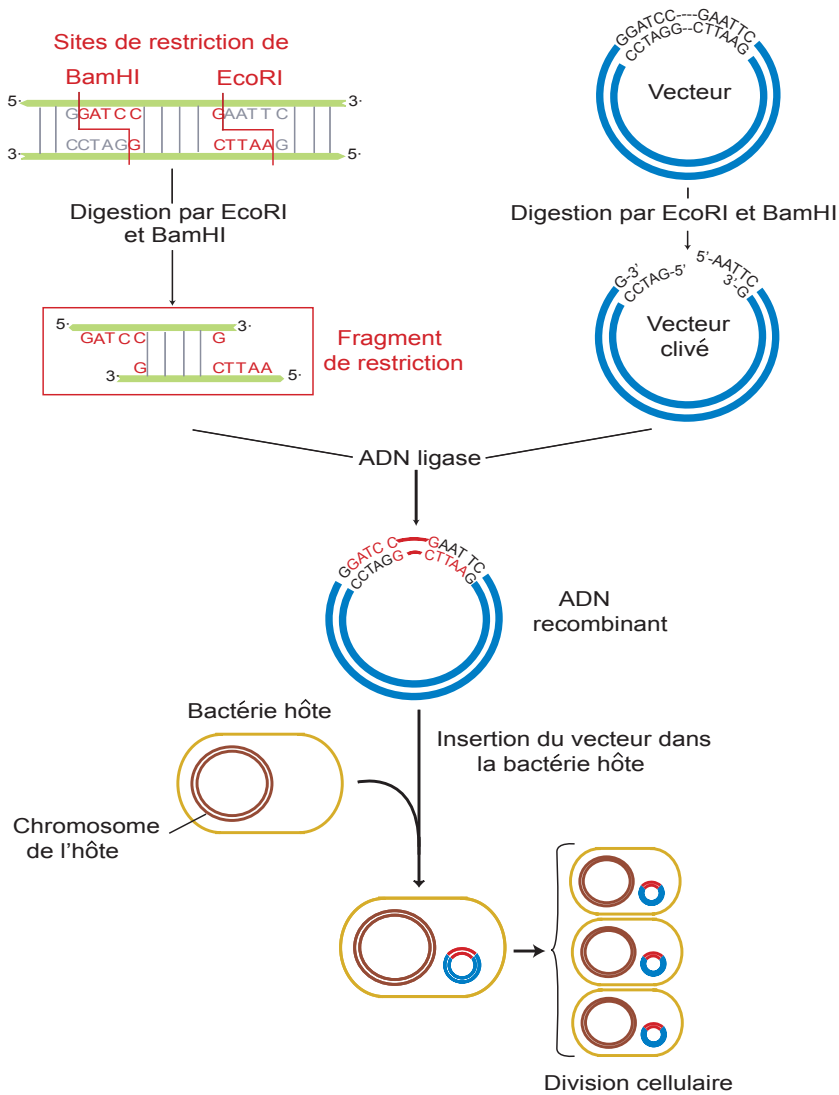


FIGURE A.1: Principe du clonage d'une molécule d'ADN dans un vecteur contenant un site de reconnaissance de l'enzyme de restriction EcoRI et un site de reconnaissance de l'enzyme BamHI.

d'autre part [106].

- Au cours d'une dernière étape, l'ADN recombinant obtenu est introduit dans la cellule hôte¹, généralement la bactérie E.Coli. Placée sur un milieu de culture, la cellule va se diviser et le vecteur se répliquer en même temps que l'ADN génomique. La molécule recombinante transmise aux cellules filles est dite clonée.

¹Différentes techniques sont possibles, comme par exemple l'électroporation utilisant des impulsions électriques pour ouvrir des pores microscopiques dans la membrane biologique, ou la méthode "gene gun" projetant littéralement le vecteur dans la cellule. La méthode chimique (utilisation de CaCl₂) reste cependant la plus courante.

A.1.2 L'électrophorèse sur gel

Cette technique est utilisée afin de séparer, au sein d'un mélange, des molécules d'ADN de tailles différentes. Elle sert très souvent à isoler un morceau d'ADN chromosomal de longueur donnée à la suite de l'utilisation d'enzymes de restriction, ou encore à vérifier le bon déroulement d'une PCR (cf paragraphe 1.2.3). Le principe de l'électrophorèse est fondé sur la charge négative que porte le squelette phosphate des molécules d'ADN. L'application d'un champ électrique au sein d'un mélange provoquera un déplacement des molécules d'ADN vers l'anode. Dans un milieu homogène, les forces de friction entre l'ADN et le milieu environnant sont, comme la charge, proportionnelles à la longueur de la chaîne. Si maintenant l'électrophorèse est réalisée dans un gel, les molécules plus petites que les mailles du gel ne verront aucun changement, tandis que celles qui sont plus grandes que la taille des pores se feront piéger et devront se libérer par reptation. En utilisant un support permettant de diminuer sensiblement les vitesses de migration des brins longs par rapport aux brins courts, il devient possible de séparer des fragments de tailles différentes. Les figures A.2 et A.3 présentent le schéma général de réalisation d'un gel ainsi que la méthode utilisée pour visualiser les positions relatives des fragments une fois la migration arrêtée. La substance choisie pour réaliser le gel est évidemment très importante. Les gels polyacrylamide permettent de séparer des molécules d'ADN avec une résolution d'une base, mais sont limités à des tailles inférieures à un kilobase. Pour les molécules plus longues, on utilise l'agarose, un dérivé d'une substance naturelle extraite des algues, qui offre cependant une moins bonne résolution.

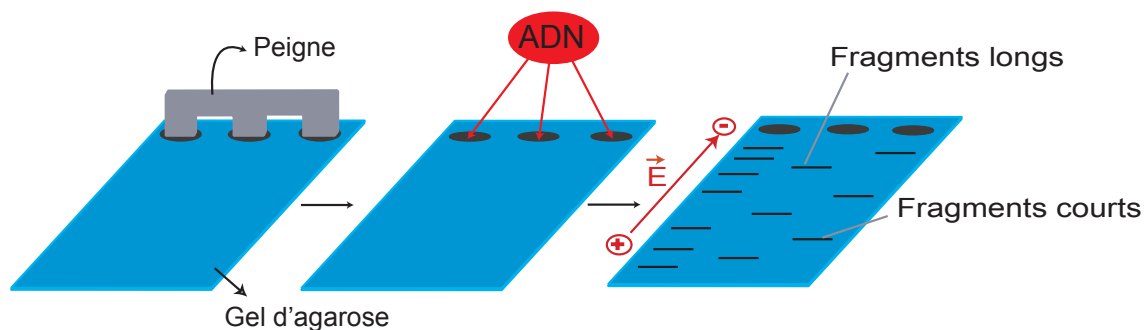


FIGURE A.2: Electrophorèse sur gel d'agarose. Le gel fondu est coulé dans un moule contenant un peigne. Une fois le gel durci, le peigne est enlevé pour former des puits dans lesquels les échantillons d'ADN à analyser sont déposés. Un champ électrique est appliqué et provoque la migration des différents fragments à travers le gel. Les fragments les plus courts migrent plus rapidement que les fragments plus longs.

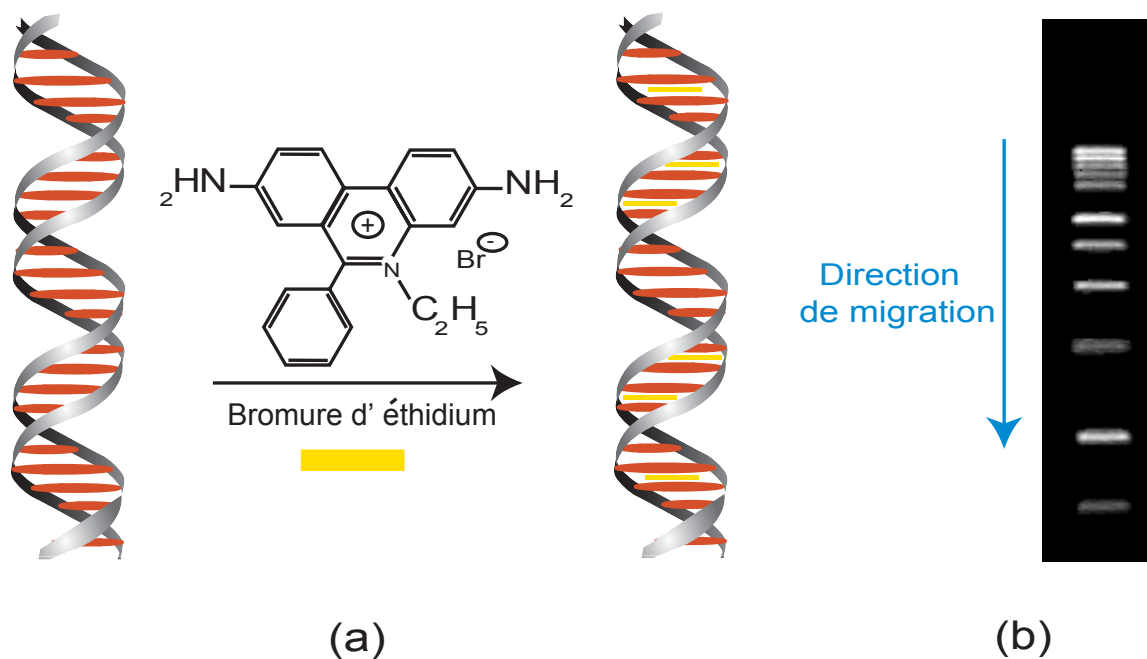


FIGURE A.3: (a) La révélation d'un gel s'effectue en utilisant le bromide d'éthidium qui est susceptible de s'intercaler entre les bases de la molécule d'ADN. Les brins d'ADN ainsi traités deviennent fluorescents sous une lampe UV. (b) Photo d'un gel prise sous lampe UV. Les fragments les plus longs (en haut) ont migré moins rapidement que les fragments les plus courts (en bas).

A.1.3 La PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une amplification enzymatique permettant de fabriquer des copies multiples d'un segment spécifique d'ADN [25, 26, 27]. Cette nouvelle méthode, mise au point en 1984-1985 par le Cetus Corp et les scientifiques Kary Mullis² et collaborateurs [28, 29] a eu un impact très important dans le domaine de l'analyse des gènes et est devenue une des techniques les plus employées dans les laboratoires de biologie moléculaire. Les applications de la PCR sont très variées. C'est, par exemple, une alternative au clonage car elle permet l'obtention, in-vitro, d'une quantité significative d'un fragment d'ADN donné de manière plus simple et plus rapide (quelques heures). La PCR permet aussi de déterminer si une séquence recherchée est présente dans un échantillon d'ADN.

Le principe de la PCR est schématisé sur la figure A.4. Pour amplifier de manière spécifique un fragment d'ADN, il faut tout d'abord choisir deux courtes séquences d'ADN simple brin (des oligonucléotides de 15 à 40 bases) appelées amorces. Les amorces ont la propriété de reconnaître spécifiquement une séquence cible de l'ADN double-brin. Les séquences cible sont au nombre de deux, chacune étant localisée sur un brin, et encadrent le segment que l'on désire amplifier. En plus des amorces et du substrat, le mélange réactionnel initial comprend une enzyme appelée ADN polymérase et des nucléotides. Cette réaction s'effectue en trois étapes successives constituant un cycle de PCR qui sera ensuite répété entre 25 et 35 fois :

[1 : La dénaturation] La première étape consiste à dénaturer l'ADN double brin en chauffant le mélange ($\sim 94^{\circ}\text{C}$).

[2 : L'appariement des amorces] Le milieu réactionnel est ensuite refroidi, ce qui permet aux amorces de s'hybrider spécifiquement au niveau des cibles. La température utilisée dépend de la séquence et de la longueur des amorces ainsi que du contenu en sel du milieu réactionnel. Elle se situe entre 50°C et 65°C .

[3 : L'élongation] Durant cette phase, une enzyme particulière, l'ADN polymérase, synthétise deux nouveaux brins à partir des deux amorces en utilisant l'ADN simple brin comme matrice et les nucléotides comme briques élémentaires. Cette étape s'effectuant vers 70°C , elle nécessite l'utilisation d'une enzyme stable à haute température. Une polymérase très couramment utilisée, est appelée Taq polymérase en raison de sa source, une bactérie thermo-résistante dénommée *Thermus aquaticus* que l'on trouve dans la mer près des sources chaudes. La réaction s'effectue dans un appareil thermo-contrôlé dont les cycles de température sont gérés par ordinateur.

[4 : Répétition des cycles] A la fin du premier cycle, on dispose d'une copie de chaque brin de l'ADN d'intérêt. La répétition du processus permet d'amplifier de manière exponentielle l'ADN souhaité car chaque brin nouvellement synthétisé peut servir de matrice pour la réaction. Le nombre théorique de copies double brin est de 2^n après n cycles. Cependant, après un certain nombre de cycles, l'appauvrissement du milieu en nucléotides, amorces ou enzymes ne permet plus une augmentation exponentielle. Une trentaine de cycles engendre environ 1 million de copies. Durant la réaction, des brins plus longs que le brin souhaité sont également créés. Cependant, leur croissance est linéaire en fonction du nombre de cycles et leur nombre reste négligeable vis à vis de l'ADN d'intérêt.

A l'issue de la PCR, tous les réactifs ne sont pas consommés. Une étape de purification permet

²Kary Mullis a obtenu le Prix Nobel de Chimie pour l'invention de la PCR en 1993.

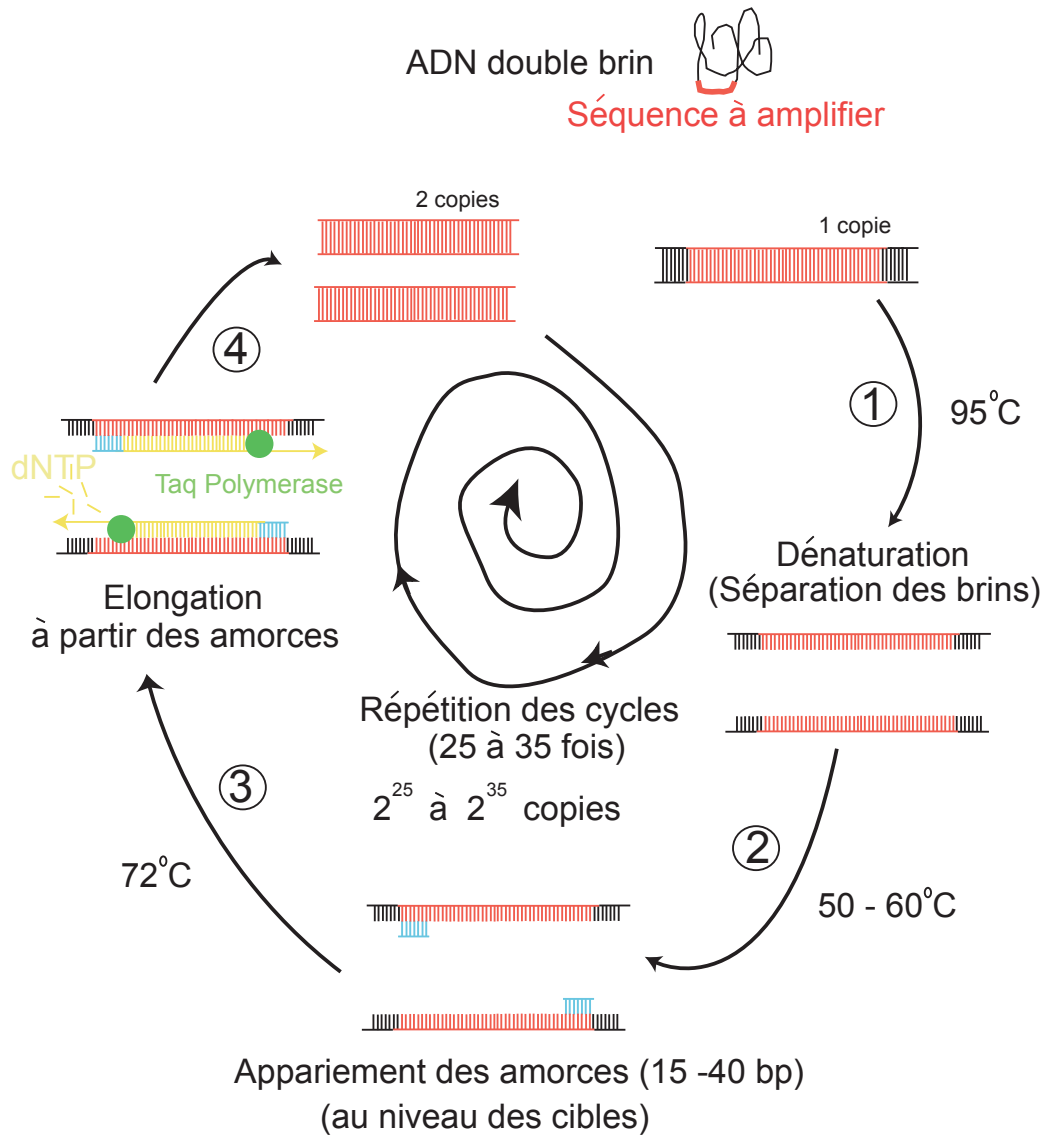


FIGURE A.4: Principe de la PCR

d'éliminer du milieu réactionnel sels, nucléotides non-incorporés, amorces et enzymes, pour ne conserver que les ADN synthétisés.

A.2 Les développements de l'analyse des gènes

La mise en place des techniques décrites précédemment a servi de base au développement de stratégies poursuivant différents objectifs. Par exemple, la technique de l'ADN recombinant a constitué une véritable révolution de la recherche fondamentale en biologie et en médecine, en permettant des études plus rapides et plus systématiques. Ce paragraphe vise à fournir un aperçu des orientations prises ces dernières années en génétique, ainsi que de leur impact dans

le monde scientifique et économique.

A.2.1 La génétique inverse

L'étude des mutations³ occupe une place importante en génétique. La stratégie classique consiste à isoler une lignée de cellules mutantes afin de mettre en évidence un gène mutant. Cette méthode peut être très efficace comme complètement vouée à l'échec dans le cas où la fonction est redondante avec celle d'un second gène. La technique de l'ADN recombinant a fourni une nouvelle approche de l'analyse des mutations, appelée génétique inverse. La première étape consiste à cloner des gènes sauvages⁴ d'un organisme puis à leur faire subir des mutations spécifiques, en utilisant par exemple la PCR ou des agents mutagènes (rayons X, lumière UV, agents chimiques). Les gènes modifiés sont alors réintroduits dans l'organisme afin d'étudier les effets des mutations sur les phénotypes⁵. Comme la nature moléculaire et la position de chaque mutation sont connues, il est possible de déterminer précisément la fonction d'une région particulière de la séquence nucléotidique. Cette méthode est actuellement appliquée à de nombreux organismes de laboratoire comme la mouche du vinaigre ou la souris ; les organismes possédant de nouveaux gènes insérés sont appelés transgéniques. La génétique inverse a notamment permis d'identifier des séquences particulières jouant un rôle important dans la transcription, ou les acides aminés essentiels à certaines fonctions protéiques.

A.2.2 La prévention des maladies

Le génie génétique a ouvert de nombreuses voies dans la prévention des maladies. Une des percées majeures est liée au développement des vaccins de synthèse qui sont produits à l'aide d'ADN recombinants. En effet, l'éradication de certaines maladies, comme par exemple la malaria, est rendue très difficile à l'aide des médicaments classiques compte-tenu de la variété des mutations. Des vaccinations, fondées sur l'utilisation de virus recombinants, ont déjà été réussies sur des souris. Ces résultats laissent espérer le développement future d'un virus dirigé contre l'agent humain responsable de la maladie.

Une autre voie très prometteuse concerne l'utilisation de rétrovirus en thérapie génique. La thérapie génique vise à corriger directement des défauts génétiques dans les cellules malades en utilisant des techniques de génie génétique. La faible efficacité de l'intégration d'ADN étranger dans les cellules animales a conduit à l'utilisation de virus comme vecteurs permettant le transfert des gènes. Les rétrovirus ont la particularité d'utiliser une enzyme appelée transcriptase inverse pour copier leur génome ARN en une molécule d'ADN double-brin (cf paragraphe 1.3.2) et permettent ainsi l'insertion d'ADN recombinant dans le génome de cellules hôtes de façon permanente et stable. Cette technique a obtenu des succès remarquables mais pose encore des problèmes de fiabilité (insertion des gènes uniquement dans les cellules malades, régulation des gènes insérés).

³Mutation : altération de la séquence d'un gène pouvant conduire à la modification de la séquence d'acides aminés de la protéine synthétisée

⁴Gène sauvage : forme particulière d'un gène, pris comme référence dans une étude de mutation. La notion de gène sauvage est tout à fait relative : le gène sauvage d'une expérience peut être le gène mutant d'une expérience antérieure.

⁵Phénotype : caractères observables d'une cellule ou d'un organisme, le phénotype est le produit du génotype et de l'environnement.

A.2.3 Aspects commerciaux

En marge de la recherche scientifique fondamentale, le génie génétique a rapidement pris une dimension commerciale extrêmement importante. L'une des premières applications a été la production en grandes quantités de protéines particulières, difficiles à synthétiser par d'autres méthodes. C'est le cas notamment de l'insuline ou de l'hormone de croissance humaine qui sont actuellement produites par des cellules bactériennes. Par ailleurs, l'ADN recombinant a engendré l'apparition de nouvelles disciplines comme l'ingénierie animale ou végétale. Ces activités, développées initialement dans un but scientifique, ont notamment permis la mise au point d'espèces animales et végétales transgéniques, qui atteignent leur maturité plus rapidement et avec une taille plus importante que les espèces sauvages. De manière générale, on assiste à l'heure actuelle à l'emballement de l'utilisation des techniques de génie génétique à des fins liant parfois étroitement aspects scientifiques et commerciaux. La multiplication des licences permettant l'utilisation clinique de gènes humains génétiquement modifiés, ne va pas sans soulever de nombreuses questions, notamment éthiques.

— Appendice B —

Analyse quantitative des densités surfaciques moyennes d'ADN déposées par le nanospotter GESIM

La description du nanospotter GESIM a été effectuée au chapitre 3 et permet de réaliser des microdépôts, en projetant sur une surface, grâce à une pointe piézoélectrique, un nombre présélectionné de gouttelettes de volume contrôlé. Lors de son utilisation, une première étape consiste à régler l'amplitude, la durée et la fréquence des impulsions électriques imposées aux éléments commandant la pointe. Ces paramètres contrôlent le volume et la forme des gouttelettes qu'il est possible de visualiser sur un écran vidéo via un système stroboscopique (cf figure B.1).

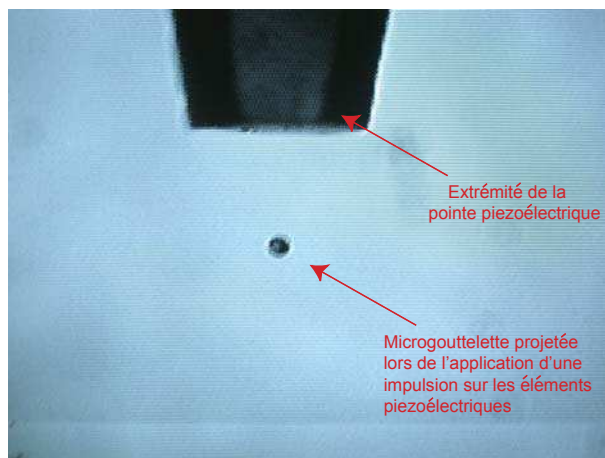


FIGURE B.1: Image vidéo d'une microgouttelette projetée par la pointe piézoélectrique. Un système de visualisation stroboscopique permet de figer l'image des gouttelettes, et ainsi de régler les paramètres électriques contrôlant la pointe.

Les valeurs à utiliser dépendent, à priori, de la viscosité de la solution. Il s'avère que pour une

pointe donnée et des dilutions d'ADN de concentrations inférieures à $20 \mu M$, il est possible d'utiliser des jeux de paramètres très proches¹. Un deuxième réglage permet ensuite de sélectionner le nombre d'impulsions souhaité, donc le nombre de microgouttelettes projetées, et d'effectuer ainsi des microdépôts de volume variable. La connaissance des densités surfaciques moyennes de molécules déposées en fonction de la concentration de la solution utilisée et du nombre d'impulsions sélectionné, constitue un paramètre important des expériences réalisées en microdépôt. Cet appendice présente une analyse quantitative, par fluorescence, de la surface couverte par les microdépôts en fonction du volume projeté. Ceci permettra, ensuite, d'évaluer les densités surfaciques moyennes de molécules déposées par le nanospotter.

B.1 Dispositif expérimental

Cette étude a été réalisée en déposant sur une lamelle de verre, préalablement recouverte de polylysine, différents microdépôts de solutions d'ADN fluorescents. La quantification de la fluorescence a été effectuée en utilisant un scanner commercial, servant aux études sur puces à ADN.

B.1.1 Dispositif de mesure-Scanner-Genepix 4000B

Les mesures de fluorescence ont été faites à l'aide d'un scanner commercial GenePix 4000B, dont on peut trouver les caractéristiques techniques dans [107]. Deux sources laser sont utilisables : l'une, rouge (633 nm), de puissance maximale 10 mW et l'autre verte (532 nm), de puissance maximale 17 mW. Cet appareil permet d'effectuer des enregistrements d'images de fluorescence de préparations effectuées sur des lamelles de verre standard. La résolution des acquisitions peut être réglée entre $5 \mu m$ et $100 \mu m$ suivant la précision souhaitée, et permet d'obtenir l'image complète de la lame en quelques dizaines de minutes tout au plus. La puissance des deux sources laser est également ajustable, ainsi que le gain du tube photomultiplicateur (Gain maximum=1000).

B.1.2 Dépôts d'ADN et mesures de fluorescence

La première étape a consisté à préparer une lamelle de verre recouverte d'une couche de polylysine. Ceci a été effectué en suivant les étapes du protocole que nous avons régulièrement employé² : incubation 4 minutes dans une solution d'hydroxyde de sodium, 16 M, diluée dans l'éthanol, puis rinçage à l'eau déionisée et séchage à l'air comprimé. La lamelle a ensuite été incubée pendant une heure dans une solution de polylysine de concentration c_0 , avant d'être rincée et séchée.

Deux lignes de microdépôts d'une solution de molécules d'ADN marquées Cy5³, de concentration $10 \mu M$, ont été déposées sur la lamelle, en utilisant le nanospotter GESIM. Chacune est

¹Un ajustement fin de la durée des impulsions s'avère parfois nécessaire. Ce réglage ne semble cependant pas influencer sur le diamètre des gouttelettes visualisées à l'écran, le volume d'une microgouttelette étant, à priori, essentiellement contrôlé par l'amplitude des impulsions.

²L'étape de traitement à l'acide sulfochromique, servant uniquement au nettoyage des structures afin de permettre leur réutilisation, n'a pas été effectuée.

³Cy5-5'-AAC GTC AGC CCT GCC GCC TG-3' synthétisés par Thermo Hybaid.

constituée de six microdépôts correspondant respectivement⁴ à $b = 10, 50, 100, 200, 500$ et 1000 impulsions. Les microdépôts sèchent quasi instantanément, ce qui garantit que l'intégralité des molécules déposées reste sur la surface. Une image de fluorescence de la lamelle a ensuite été enregistrée en utilisant les paramètres : puissance laser : 100%, gain du tube : 450 et résolution de $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$. Aucune étape de rinçage n'a été effectuée entre la phase de dépôt et l'acquisition de l'image. La figure B.2 présente les résultats obtenus.

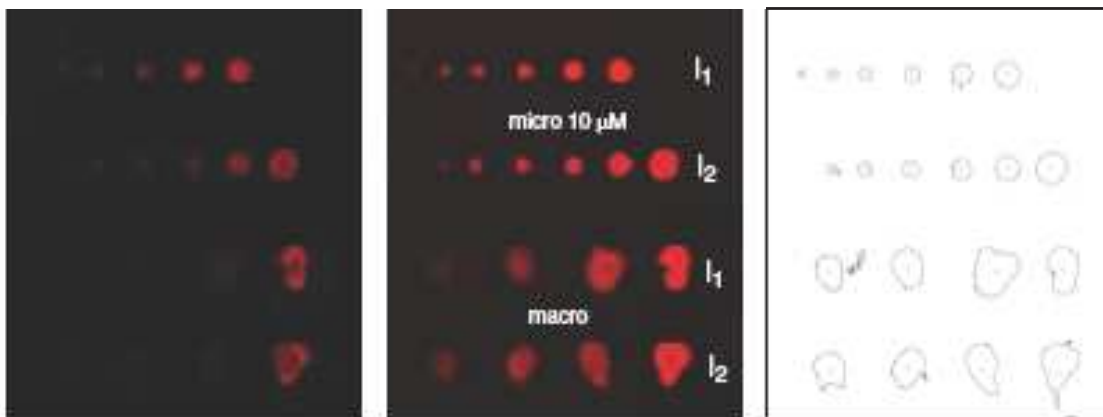


FIGURE B.2: Images de fluorescence de la lamelle. A gauche : image non modifiée. Au milieu : image obtenue en échelle logarithmique. A droite : définition des contours des différents dépôts obtenus par le logiciel Image J.

B.1.3 Traitement de l'image de fluorescence

Le traitement des données de fluorescence a été réalisé en utilisant le logiciel Image J [108], couramment utilisé dans les analyses sur puces. Les images obtenues en sortie du scanner sont codées sur 16 bits, l'intensité étant comprise entre 0 et 65535. L'analyse est entièrement automatisée et s'effectue en sélectionnant un seuil minimal, qui dans ce cas précis a été pris égal au bruit de fond de la lamelle (45), et un seuil maximal permettant d'enlever d'éventuels signaux parasites. Aucun des différents dépôts n'étant saturant, la limite haute a été fixée à 65535. Le programme analyse ensuite l'image et repère automatiquement les différentes taches lumineuses, en définit le contour et fournit la surface couverte par chaque dépôt, ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence et l'écart-type associé. Les différents contours obtenus par Image J sont représentés sur la figure B.2.c.

B.2 Résultats

B.2.1 Surfaces des microdépôts

L'analyse précédente permet d'obtenir directement l'évolution de la surface des microdépôts en fonction du nombre d'impulsions sélectionné, noté b . Dans toute la suite, on distinguera le volume V_0 d'une microgouttelette projetée par la pointe lors de l'application d'une unique

⁴Le nombre d'impulsions associé à un microdépôt sera, dans toute la suite, noté b .

impulsion de tension et V , le volume total d'un microdépôt (cf figure B.3). V et V_0 sont, à priori, reliés par une relation de la forme⁵ $V = b \times V_0$.

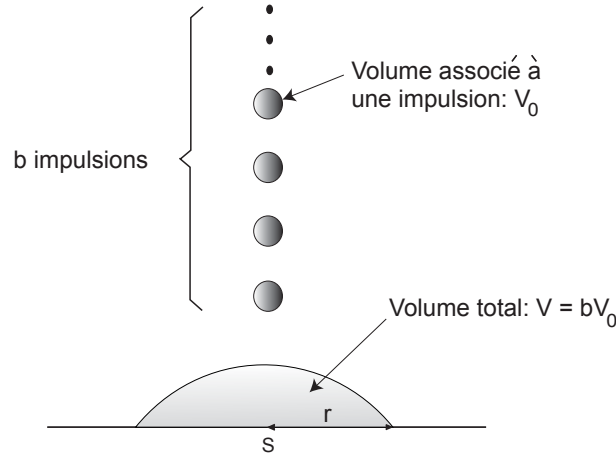


FIGURE B.3: Les microdépôts sont obtenus en projetant b microgouttelettes de volume V_0 sur la surface. Leur volume total, V , est alors $V = b \times V_0$.

Par ailleurs, en assimilant les microdépôts à des disques de rayon r , leur surface S varie comme r^2 , tandis que le volume V total peut être supposé proportionnel à r^3 . Sous ces hypothèses, S est proportionnel à $b^{\frac{2}{3}}$. La figure B.4 donne l'allure des variations de S , obtenues à partir d'Image J pour les deux lignes de microdépôts, en fonction du nombre d'impulsions sélectionné, b (graphique B.4.a), et de $b^{\frac{2}{3}}$ (graphique B.4.b).

La relation $S \propto b^{\frac{2}{3}}$ semble être bien vérifiée. Un ajustement linéaire fournit les coefficients de proportionnalité $0,027 \text{ mm}^2$ pour la ligne 1 et $0,019 \text{ mm}^2$ pour la ligne 2, avec des coefficients de corrélation, R , de l'ordre de 0,99. Il apparaît cependant difficile de justifier l'écart observé entre la ligne 1 et la ligne 2, puisque les deux séries de dépôts ont été effectuées en une seule fois, l'une après l'autre, avec les mêmes paramètres d'amplitude et de fréquence des impulsions. Le passage de $b = 1000$ (fin de la ligne 1) à $b = 10$ (début de la ligne 2), ainsi que la diminution du volume de la solution d'ADN présent dans la pointe, pourraient éventuellement influencer sur les quantités projetées.

B.2.2 Volumes des microdépôts et densités surfaciques moyennes de molécules déposées

La densité surfacique moyenne de molécules d'ADN déposées, notée par la suite σ_M , associée à un microdépôt de volume $V = bV_0$, s'exprime facilement en fonction du paramètre b . En effet, le nombre de molécules projetées dans un microdépôt de volume $V = bV_0$ vaut cbV_0N_A , c désignant la concentration en ADN de la solution utilisée et N_A , le nombre d'Avogadro. La densité surfacique associée s'écrit donc : $\sigma_M = \frac{cbV_0N_A}{S}$ avec $S = kb^{\frac{2}{3}}$, d'après les résultats obtenus

⁵Compte tenu de la fréquence de projection des microgouttelettes sur la surface ($\sim 100 \text{ Hz}$), il est possible de supposer l'additivité des volumes des microgouttelettes projetées. Cependant, pour des valeurs de b grandes ($b \sim 1000$), le dépôt prend environ une dizaine de secondes ; un effet dû à un éventuel séchage au cours du dépôt est alors éventuellement possible.

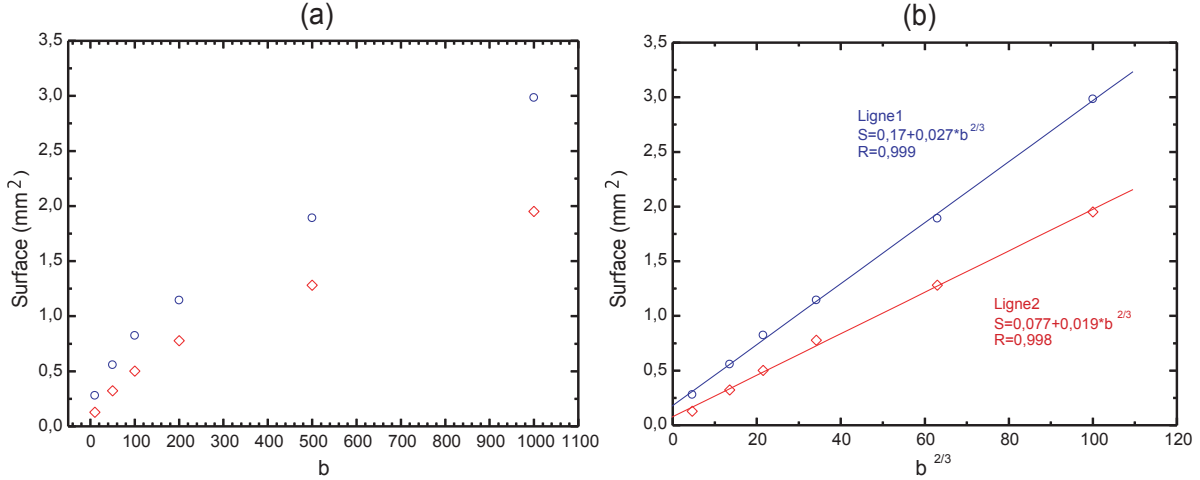


FIGURE B.4: (a) Evolutions de la surface des microdépôts de la ligne 1 (cercles bleus) et de la ligne 2 (losanges rouges) en fonction du nombre d'impulsions, b , sélectionné. (b) Evolutions de la surface des microdépôts en fonction de $b^{2/3}$. Les régressions linéaires effectuées à partir des données collectées sur chacune des deux lignes sont représentées en traits pleins.

dans la partie B.2.1 (k vaut $0,027 \text{ mm}^2$ pour la ligne 1 et $0,019 \text{ mm}^2$ pour la ligne 2). Ceci conduit à une relation de la forme :

$$\sigma_M = \left(\frac{cV_0NA}{k} \right) b^{1/3} \quad (\text{B.1})$$

Le volume V_0 , associé à une unique impulsion, peut être déterminé à partir du grossissement du système stroboscopique de visualisation (cf figure B.1). La mesure directe, sur l'écran vidéo, du diamètre caractéristique, D_G , des gouttelettes projetées⁶ a conduit à $D_G = 35 \pm 9 \mu\text{m}$, soit un volume $V_0 \sim 22 \pm 17 \text{ pL}$.

La figure B.5.a présente les variations des intensités moyennes de fluorescence, collectées sur les deux lignes de microdépôts, en fonction de b .

Sur la courbe B.5.a, il apparaît une saturation du signal de fluorescence pour des valeurs de b supérieures à 500. Ce phénomène est difficile à expliquer, mais semble essentiellement lié à l'efficacité de fluorescence puisque les résultats du paragraphe B.2.1 ont montré que la surface des microdépôts suivait une loi de la forme $S \propto b^{2/3}$ jusqu'à $b = 1000$. Par ailleurs, les barres d'erreur relativement importantes associées aux relevés expérimentaux indiquent, globalement, une

⁶Les évaluations de D_G ont été effectuées lors de plusieurs expériences, espacées dans le temps, mais toutes réalisées avec la même pointe. Avant chaque dépôt, l'obtention d'une forme de gouttelette correcte nécessite systématiquement un ajustement fin des paramètres électriques contrôlant les éléments piezo. Cependant, l'utilisation de réglages légèrement différents ne semble pas induire de variations de la taille des gouttes projetées qui puissent être détectées à partir d'une mesure directe sur l'écran. La barre d'erreur associée à la valeur de D_G reflète donc essentiellement l'incertitude due au contour mal défini de l'image des gouttelettes.

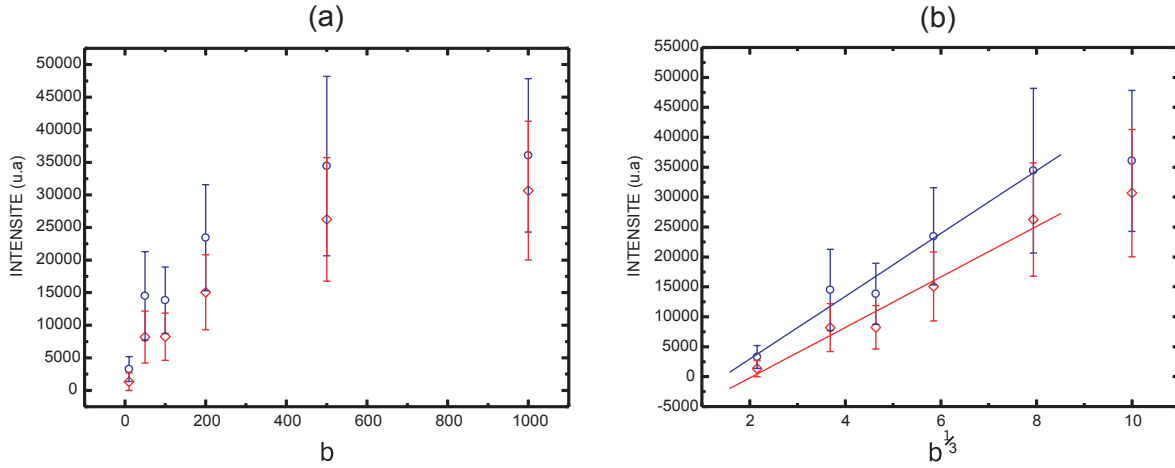


FIGURE B.5: (a) : intensité de fluorescence collectée sur les deux lignes de microdépôts en fonction du nombre d'impulsions. Ligne 1, en bleu et ligne 2, en rouge. (b) : intensité de fluorescence collectée sur les deux lignes de microdépôts en fonction du nombre d'impulsions à la puissance un tiers. Ligne 1, en bleu et ligne 2, en rouge. Les droites représentent les régression linéaires effectuées dans la gamme $10 < b < 500$.

grande inhomogénéité de la distribution des molécules au sein des différents dépôts. Les expériences de détection électronique présentées au chapitre 4 révéleront une tendance similaire. Par ailleurs, en supposant que l'intensité de fluorescence, I , collectée sur les différents microdépôts, est proportionnelle à la densité surfacique moyenne de molécules, σ_M , la relation B.1 devrait conduire à $I \propto b^{1/3}$. La figure B.5.b présente l'allure de l'évolution des intensités de fluorescence collectées sur les deux séries de microdépôts, en fonction de $b^{1/3}$. Des régressions linéaires ont été effectuées dans la gamme non saturante : $10 < b < 500$. Ces résultats indiquent que l'hypothèse de proportionnalité entre I et σ_M semble raisonnable pour des volumes déposés correspondant à $b < 500$.

B.3 Conclusions

Cette étude a montré que la surface des dépôts suit une loi de la forme $S = kb^{2/3}$ avec $k \sim 0,022 \text{ mm}^2$. Le volume V_0 associé à une impulsion et fourni par le constructeur est de : $V_0 \simeq 20 \text{ pL}$. Lors des analyses effectuées dans cette thèse, nous avons retenu ces ordres de grandeur pour évaluer, à partir de la relation $\sigma_M = \left(\frac{CV_0N_A}{k}\right)b^{1/3}$, les densités surfaciques moyennes de molécules déposées, σ_M , en fonction du nombre d'impulsions sélectionné, b . Par ailleurs, il apparaît que le signal de fluorescence présente une saturation pour des volumes déposés correspondant à $b > 500$, soit des densités surfaciques moyennes $\sigma_M > 5 \times 10^4 \text{ molécules} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. L'intensité de fluorescence sera, par ailleurs, supposée variée linéairement en fonction de la densité surfacique moyenne d'ADN déposée, σ_M , dans la gamme $10 < b < 500$ que nous avons régulièrement utilisée au cours de ce travail.

— Appendice C —

Modélisations du système FET/SiO₂/électrolyte

La modélisation du système FET/SiO₂/électrolyte nécessite, à priori, de décrire le couplage existant entre les charges présentes à l'interface oxyde/électrolyte, écrantées par l'électrolyte de mesure et la partie "semi-conducteur" constituée par le transistor à effet de champ. D'un point de vue théorique, ces deux sous-systèmes présentent de nombreuses similitudes et posent le problème de l'écrantage d'une distribution statique de charges par des porteurs mobiles¹. Dans le cadre de cette thèse, les expériences ont été menées à courant et tension source/drain constants et ont permis de mesurer les variations de la tension source/électrode associées à l'apport de molécules chargées ou aux changements de concentration en sel de l'électrolyte de mesure. La complexité de l'interface biomolécules/électrolyte nous a amenés à développer des modèles simples, unidimensionnels, ne prenant en compte que les caractéristiques les plus importantes des phénomènes impliqués. Concernant la partie "semi-conducteur", des modèles dérivés des équations classiques décrivant le comportement des MOSFETs [69] ont été proposés, notamment afin de rendre compte de la sensibilité de structures EOSFETs au pH [55, 58, 54]. Nous sommes partis de l'idée que, dans une étude à courant constant, le potentiel de surface de la couche d'oxyde est entièrement défini par les valeurs du courant et de la tension source/drain choisies. La différence de potentiel existant entre la source d'un EOSFET et le volume de l'électrolyte, loin de l'interface, est alors déterminée par la modélisation des phénomènes d'écrantage à l'interface oxyde/électrolyte. Partant de cette hypothèse, un modèle unidimensionnel a été développé, afin d'expliquer les effets de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure sur les variations de tension observées expérimentalement. Il suppose l'existence d'une densité surfacique de charge constante à l'interface oxyde/électrolyte. L'équation de Gouy-Chapmann [75, 76] permet alors de rendre compte de l'évolution du potentiel dans l'électrolyte de mesure en fonction de la concentration en sel de ce dernier.

Dans cet appendice, deux modélisations de l'interface FET/SiO₂ nu/électrolyte 1:1 sont in-

¹La formation de la couche d'inversion, dans le semi-conducteur de type n, peut être vue comme l'écrantage des impuretés donneuses ionisées, par un gaz d'électrons. De manière analogue, les molécules chargées déposées à l'interface oxyde/électrolyte constituent une distribution statique de charges, susceptible d'être écrantée par les ions mobiles de l'électrolyte.

troduites. Une première description, appelée modèle charge effective constante, est présentée dans la première section. Il s'agit cependant d'une première approximation qui sera généralisée dans le chapitre 5, au cas de biomolécules (polylysine ou ADN + polylysine) déposées sur les surfaces d'oxyde. La seconde section de cet appendice décrit une autre modélisation de l'interface SiO₂/électrolyte, prenant en compte les variations de la charge de surface du SiO₂ nu lors de modifications de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure.

Seuls les aspects théoriques des modèles sont présentés ici, la comparaison avec les données expérimentales est effectuée au chapitre 5.

C.1 Le système FET/SiO₂ nu/électrolyte 1:1 : modèle à charge effective constante

Les principales caractéristiques du modèle charge effective constante vont être introduites dans le cas d'une surface d'oxyde de silicium nue, sur laquelle aucun dépôt de biopolymères n'a été effectué. La figure C.1 présente le schéma d'une description unidimensionnelle du système, négligeant d'éventuelles variations latérales des paramètres dans la direction source/drain. La présence de groupements chargés à l'interface oxyde/électrolyte, est modélisée par une densité surfacique de charge σ_{int} . Dans une modélisation de type double couche électrochimique [75, 76], σ_{int} peut, par exemple, être vu comme la somme de deux contributions : une charge négative σ_1 au niveau du plan SiO_2 , due principalement aux groupes siloxane SiO^- , et une charge positive, σ_2 , localisée sur un plan dit de Helmholtz et décrivant la première couche de solvation, essentiellement constituée de cations. La charge d'interface peut donc s'écrire $\sigma_{int} = \sigma_1 + \sigma_2$ et reste globalement négative selon [77].

C.1.1 Le couplage FET/électrolyte

Dans le cas d'une structure MOSFET, le champ électrique, E_{SiO_2} , existant dans la couche isolante d'oxyde de silicium, permet d'exprimer la différence de potentiel source/grille métallique, U_{SG} . En négligeant la présence de charges dans l'oxyde, E_{SiO_2} est relié à la densité de charge σ_S de la couche d'inversion par la relation :

$$E_{SiO_2} = \frac{\sigma_S}{\epsilon_0 \epsilon_r^{SiO_2}} \quad (C.1)$$

Par ailleurs, la forme des caractéristiques $I_{SD} = f(U_{SG})_{U_{SD}=cste}$ d'un MOSFET, présentées au chapitre 3, montre que des valeurs du courant et de la tension source/drain fixées, imposent, de manière univoque, la tension U_{SG} et donc le potentiel de grille ainsi que le champ électrique E_{SiO_2} .

Une structure EOSFET est similaire à celle d'un MOSFET, la grille métallique étant remplacée par l'électrolyte de mesure. Dans le chapitre 3, il a été montré que les formes des caractéristiques d'un EOSFET étaient très similaires à celles d'un MOSFET. Le raisonnement tenu précédemment reste donc applicable pour décrire la partie semi-conducteur des capteurs que nous utilisons. Lors d'expériences effectuées à I_{SD} et U_{SD} fixés, le champ électrique E_{SiO_2}

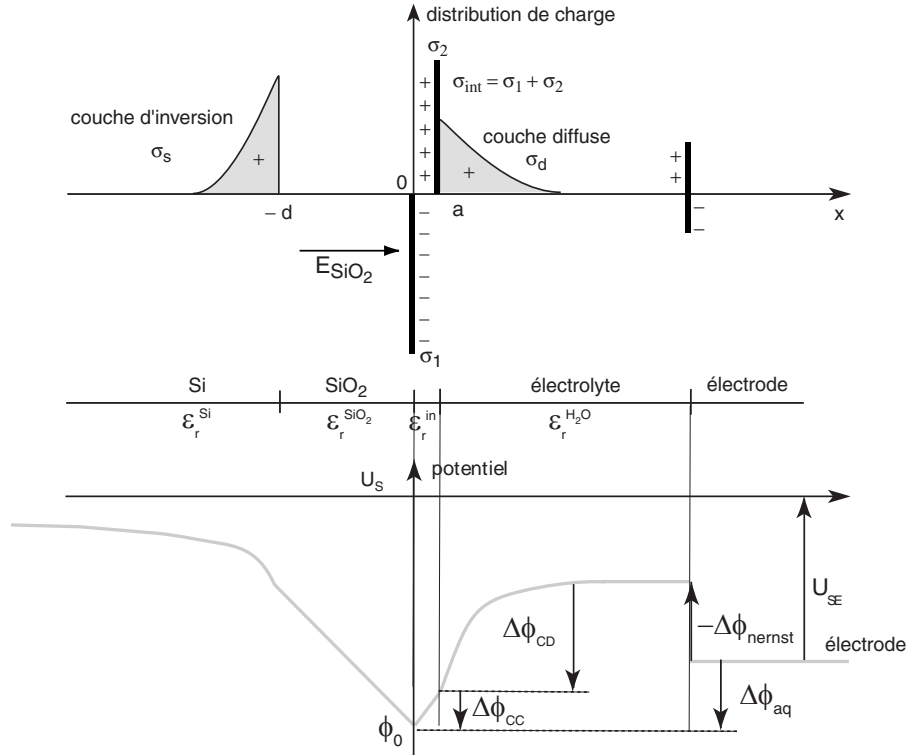


FIGURE C.1: Distributions de charge et évolution du potentiel dans une modélisation unidimensionnelle du système FET/SiO₂ nu/électrolyte. L'axe x est orienté suivant la direction source/électrolyte/électrode.

reste constant, indépendamment des modifications pouvant avoir lieu dans l'électrolyte et impose une valeur constante pour le potentiel ϕ_0 de l'interface oxyde/électrolyte. En référant ϕ_0 par rapport à la source, la tension U_{SE} peut alors s'écrire :

$$U_{SE} = -\phi_0 + \Delta\phi_{aq} \quad (\text{C.2})$$

où $\Delta\phi_{aq}$ correspond au saut de potentiel entre la surface d'oxyde de silicium et le corps métallique de l'électrode Ag/AgCl. A I_{SD} et U_{SD} constants, la forme des variations de la tension source/électrode, U_{SE} , est donc imposée par la partie "électrolyte" du système.

C.1.2 Expression de la tension source/électrode en fonction de la concentration en sel de l'électrolyte

L'expression de $\Delta\phi_{aq}$ fait intervenir trois contributions :

- la chute de potentiel $\Delta\phi_{CC}$ entre la surface d'oxyde et le plan de Helmholtz,
- la variation de potentiel, $\Delta\phi_{CD}$, liée à l'existence d'une couche diffuse entre le plan de Helmholtz et le volume de l'électrolyte, loin de la surface,
- le terme associé à la différence de potentiel entre l'électrolyte et le corps métallique de l'électrode.

Le saut de potentiel $\Delta\phi_{CC}$ à la traversée de la couche d'ions condensés est donné par la relation de continuité de \vec{D} à la traversée de l'interface SiO₂/électrolyte ($x=0$) :

$$\Delta\phi_{CC} = \frac{\sigma_1 + \epsilon_0\epsilon_r^{SiO_2}E_{SiO_2}}{\epsilon_0\epsilon_r^{in}} a = \frac{\sigma_1 + \sigma_S}{\epsilon_0\epsilon_r^{in}} a \quad (C.3)$$

avec a : distance surface d'oxyde, plan de Helmholtz ($a \simeq 4 \text{ \AA}$), $\epsilon_r^{SiO_2}$ la constante diélectrique relative de l'oxyde de silicium ($\epsilon_r^{SiO_2} \simeq 4$), et ϵ_r^{in} celle de la couche condensée (plus faible que celle de l'eau "en volume" $\epsilon_r^{H_2O} \simeq 80$).

Dans la couche diffuse, composée d'ions monovalents K^+ et Cl^- , l'évolution du potentiel $\phi(x)$ est décrite par le modèle de Gouy-Chapman [75, 76] :

$$\phi(x) - \phi(\infty) = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\sqrt{\frac{\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}}{[Cl^-] 8kT}} \left(-\frac{d\phi}{dx} \right) \right) \quad (C.4)$$

où $\phi(x)$ et $-\frac{d\phi}{dx}$ sont respectivement le potentiel et le champ électrique dans la couche diffuse à une distance x de la surface d'oxyde et $\phi(\infty)$ le potentiel dans l'électrolyte, loin de la surface ($x \gg 0$).

La variation de potentiel $\Delta\phi_{CD}$ entre la surface de charge σ_2 ($x=a$) et le volume de l'électrolyte, est déterminée par la valeur du champ électrique en $x=a$:

$$-\frac{d\phi}{dx}(a^+) = \frac{\sigma_{int} + \epsilon_0\epsilon_r^{SiO_2}E_{SiO_2}}{\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}} = \frac{\sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_S}{\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}} \quad (C.5)$$

On peut alors définir une densité effective de charge, σ_{eff} , correspondant à la somme des densités de charge "vues" par le début de la couche diffuse ($x = a^+$) :

$$\sigma_{eff} = \sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_S \quad (C.6)$$

En couplant les équations C.4 et C.5, le saut de potentiel $\Delta\phi_{CD}$ s'écrit alors :

$$\Delta\phi_{CD} = \phi(a) - \phi(\infty) = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-] 8kT \epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}}} \right) \quad (C.7)$$

Par ailleurs, le saut de potentiel entre l'électrolyte et l'électrode d'argent est donné par l'opposé du potentiel de Nernst de l'électrode $Ag/AgCl$ [109] :

$$-\Delta\phi_{Nernst} = \frac{kT}{e} \ln \left(\frac{a(Cl^-)}{a(Cl^-)_{PZC}} \right) \quad (C.8)$$

où, dans cette relation, $a(Cl^-)$ et $a(Cl^-)_{PZC}$ désignent respectivement l'activité des ions chlorures dans l'électrolyte de mesure et celle associée au point de charge zéro [110].

Le saut de potentiel $\Delta\phi_{aq}$ entre la surface d'oxyde et le corps métallique de l'électrode étant la somme des trois termes $\Delta\phi_{CC}$, $\Delta\phi_{CD}$ et $-\Delta\phi_{Nernst}$, la tension U_{SE} s'écrit :

$$U_{SE} = -\phi_0 + \Delta\phi_{aq} = -\phi_0 + \Delta\phi_{CC} + \Delta\phi_{CD} - \Delta\phi_{Nernst} \quad (C.9)$$

Soit,

$$U_{SE} = -\phi_0 + \frac{\sigma_1 + \sigma_S}{\epsilon_0 \epsilon_r^{in}} a + \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-] 8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}}} \right) + \frac{kT}{e} \ln \left(\frac{a(Cl^-)}{a(Cl^-)_{PZC}} \right) \quad (C.10)$$

Dans cette description, les charges d'interface σ_1 et σ_2 de la double couche électrochimique sont considérées comme des constantes ne variant pas en fonction de la concentration de l'électrolyte de mesure. La charge de canal étant également constante, la charge effective, σ_{eff} , est indépendante de la concentration en sel. Les variations de la tension U_{SE} avec la concentration ne sont donc attribuables qu'à la chute de potentiel dans la couche diffuse et au terme d'électrode. Il est possible d'essayer d'améliorer cette description en prenant en compte les différents équilibres chimiques intervenant au niveau de la surface d'oxyde, ce qui introduit une dépendance de σ_{eff} en fonction de la quantité de KCL introduite. Cet aspect sera développé au chapitre 5.

C.1.3 Ajustement des données expérimentales

L'étude de l'influence de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure sur la détection électronique est présentée au chapitre 5. Dans le cas de la surface SiO_2 nue, la méthode retenue consiste à déterminer les variations, ΔU_{SE} , de la tension U_{SE} entre des mesures effectuées pour différentes concentrations de l'électrolyte (données U_{SE}^{sel}) et un unique fichier référence enregistré pour une faible concentration en sel (fichier U_{SE}^{ref}). Cela permet alors d'obtenir l'évolution expérimentale de $\Delta U_{SE} = U_{SE}^{sel} - U_{SE}^{ref}$ en fonction de la concentration de l'électrolyte. L'équation C.10 donne également une expression théorique de $\Delta U_{SE} = f([KCl])$. En effet, pour le fichier référence, on peut écrire :

$$U_{SE}^{ref} = -(\phi_0)_{ref} + \left(\frac{\sigma_1 + \sigma_S}{\epsilon_0 \epsilon_r^{in}} a \right)_{ref} + \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}^{ref}}{\sqrt{[Cl^-]_{ref} 8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}}} \right) + \frac{kT}{e} \ln \left(\frac{a(Cl^-)_{ref}}{a(Cl^-)_{PZC}} \right) \quad (C.11)$$

et pour une mesure quelconque à concentration en sel plus élevée :

$$U_{SE}^{sel} = -(\phi_0)_{sel} + \left(\frac{\sigma_1 + \sigma_S}{\epsilon_0 \epsilon_r^{in}} a \right)_{sel} + \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}^{sel}}{\sqrt{[Cl^-]_{sel} 8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}}} \right) + \frac{kT}{e} \ln \left(\frac{a(Cl^-)_{sel}}{a(Cl^-)_{PZC}} \right) \quad (C.12)$$

D'après les hypothèses du modèle, à I_{SD} et U_{SD} fixés, le potentiel de surface ϕ_0 , ainsi que la charge de canal σ_S sont constants, donc $(\phi_0)_{sel} = (\phi_0)_{ref}$. Par ailleurs, aucune dépendance des charges σ_1 , σ_2 et donc σ_{eff} en fonction de $[KCl]_{int}$ n'est supposée, donc $\left(\frac{\sigma_1 + \sigma_S}{\epsilon_0 \epsilon_r^{in}} a \right)_{sel} =$

$\left(\frac{\sigma_1 + \sigma_S}{\epsilon_0 \epsilon_r^{in}} a\right)_{ref}$ et $\sigma_{eff}^{sel} = \sigma_{eff}^{ref}$. La différence $\Delta U_{SE} = U_{SE}^{sel} - U_{SE}^{ref}$ peut donc se mettre sous la forme :

$$\Delta U_{SE} = U_{SE}^{sel} - U_{SE}^{ref} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]_{sel} 8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}}} \right) + \frac{kT}{e} \ln (a(Cl^-)_{sel}) + C \quad (C.13)$$

$$\text{avec } C = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]_{ref} 8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}}} \right) + \frac{kT}{e} \ln (a(Cl^-)_{ref})$$

Les évolutions expérimentales en fonction de la concentration en sel pour les surfaces d'oxyde nues sont donc décrites par l'expression C.13, faisant intervenir deux paramètres : la charge effective σ_{eff} , constante, vue par le début de la couche diffuse et la constante C ne dépendant que du choix de la référence. L'équation C.13 sera par la suite appelée équation du modèle charge effective constante.

C.1.4 Corrections d'activité et de concentration

L'équation précédente fait apparaître l'activité et la concentration en ions Cl^- . Il est possible de relier ces deux quantités à la concentration en KCl introduite, en tenant compte de la solubilité de l'électrode AgCl/Ag à bas sel et des corrections d'activité à haut sel.

Solubilité

En utilisant la définition du produit de solubilité, K_S , de $(AgCl_{(s)})^2$ et la relation d'électroneutralité³, il est possible de réécrire la concentration en ions Cl^- en fonction de la concentration en ions K^+ , égale à la quantité de KCl introduite ($[KCl]_{int}$) :

$$[Cl^-] = \frac{1}{2} \left([K^+] + \sqrt{[K^+]^2 + 4K_S} \right) = \frac{1}{2} \left([KCl]_{int} + \sqrt{[KCl]_{int}^2 + 4K_S} \right) \quad (C.14)$$

Cette correction intervient à bas sel quand la quantité $\sqrt{4K_S} \sim 2 \cdot 10^{-5}$ n'est plus négligeable devant $[KCl]_{int}$, c'est-à-dire pour des concentrations en sel de l'ordre de 10^{-5} M.

Activité

Le coefficient d'activité γ_{Cl^-} des ions Cl^- peut être relié à la concentration en $[Cl^-]$ en utilisant une loi de Debye-Hückel étendue [111] :

$$\log(\gamma_{Cl^-}) = \log \left(\frac{a(Cl^-)}{[Cl^-]} \right) = - \frac{A\sqrt{[Cl^-]}}{1 + B\sqrt{[Cl^-]}}$$

² $K_S = a(Ag^+)a(Cl^-) = 1,77 \cdot 10^{-10}$.

³ $[Cl^-] = [K^+] + [Ag^+]$.

où A et B sont deux constantes que l'on peut déterminer à l'aide de données tabulées dans [110] (A=0,509 et B=1,3).

L'activité est alors donnée en fonction de la concentration en ions chlorure par :

$$a(Cl^-) = [Cl^-].10^{-\frac{A\sqrt{[Cl^-]}}{1+B\sqrt{[Cl^-]}}}$$

Ces corrections interviennent plutôt à haut sel⁴. L'utilisation de la relation C.14 permet d'obtenir l'activité en fonction de la concentration en ions chlorure introduite ($[KCl]_{int}$) :

$$a(Cl^-) = \frac{1}{2} \left([KCl]_{int} + \sqrt{[KCl]_{int}^2 + 4K_S} \right) .10^{-\frac{A\sqrt{\frac{1}{2} \left([KCl]_{int} + \sqrt{[KCl]_{int}^2 + 4K_S} \right)}}{1+B\sqrt{\frac{1}{2} \left([KCl]_{int} + \sqrt{[KCl]_{int}^2 + 4K_S} \right)}}} \quad (C.15)$$

Pour de grandes concentrations en sel, la nécessité de prendre en compte les corrections d'activité apparaît claire dans le terme d'électrode. Par contre, en ce qui concerne le terme de couche diffuse, l'assimilation entre $[Cl^-]$ et $a(Cl^-)$ semble être beaucoup plus floue. Dans les ajustements des courbes expérimentales, nous avons systématiquement gardé l'expression de l'équation C.14 pour le terme de couche diffuse et pris en compte les corrections d'activité données par la formule C.15 dans le terme d'électrode.

C.1.5 Caractéristiques du modèle à charge effective constante

Au chapitre 5, le modèle charge effective constante, introduit précédemment, sera étendu au cas de surfaces d'oxyde recouvertes de polylysine ou d'ADN et de polylysine. Il apparaît donc intéressant de mettre en évidence le comportement des courbes $\Delta U_{SE} = f[KCl]_{int}$, en fonction de différentes valeurs du paramètre σ_{eff} .

A partir de l'équation C.13

$$\Delta U_{SE} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]8kT\epsilon_0\epsilon_r^{H_2O}}} \right) + \frac{kT}{e} \ln(a(Cl^-)) + C$$

et des relations C.14 et C.15, il est possible de simuler les caractéristiques des courbes $\Delta U_{SE} = f([KCl]_{int})$ pour différentes valeurs de σ_{eff} (cf. figure C.2).

La variation de ΔU_{SE} est due, à la fois, à l'effet du terme d'électrode ($-\Delta\phi_{Nernst}$) :

$$-\Delta\phi_{Nernst} = \frac{kT}{e} \ln(a(Cl^-)) + cte$$

et à celui du terme de couche diffuse, modélisant l'écrantage de la charge σ_{eff} par l'électrolyte de mesure :

⁴Pour des valeurs de $[Cl^-]$ de (1mM, 10mM, 100 mM et 1M), l'activité $a(Cl^-)$ est respectivement égale à (0.960, 0.902, 0.77, 0.607)* $[Cl^-]$

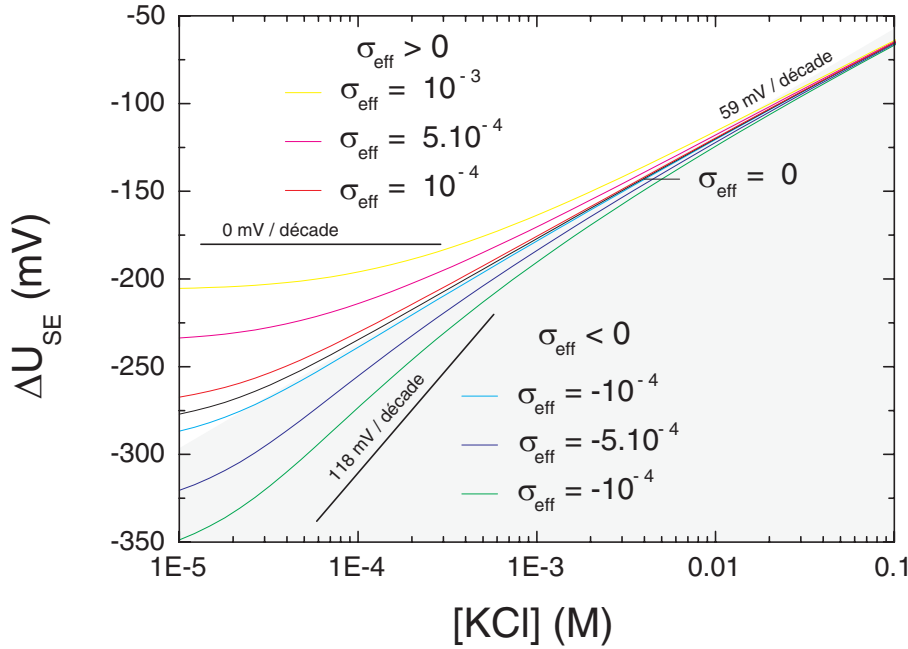


FIGURE C.2: Evolutions de ΔU_{SE} , en fonction de la concentration en sel de l'électrolyte de mesure, pour différentes valeurs de la charge effective. Dans cette simulation, la valeur de la constante C correspond à une concentration $[KCl]_{int}$ de référence égale à 1M.

$$\Delta\phi_{CD} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-] 8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}}} \right) = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\alpha \frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]}} \right)$$

avec $\alpha = \frac{1}{\sqrt{8kT \epsilon_0 \epsilon_r^{H_2O}}} \approx 8.4$ $\left\{ \begin{array}{l} \text{pour } [Cl^-] \text{ exprimée en } mol.l^{-1} \\ \text{et pour } \sigma_{eff} \text{ exprimée en } C/m^2 \end{array} \right.$

- Pour une charge effective nulle ($\sigma_{eff} = 0$) :

Le terme $\Delta\phi_{CD}$ n'intervient pas et, la dépendance en sel est dans ce cas uniquement due à un effet d'électrode. Nous observons classiquement, sur la courbe correspondante (courbe noire), une pente moyenne de 59 mV/décade. La courbure observable à bas sel ($< 10^{-4}M$) résulte de la correction liée à la solubilité et, celle à haut sel ($> 10^{-1}M$), de la correction d'activité.

- Pour des charges effectives négatives ($\sigma_{eff} < 0$) :

$\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]}} \nearrow$ quand $[Cl^-] \nearrow$ d'où une augmentation de ΔU_{SE} due au terme de couche diffuse se rajoutant à celle liée à l'électrode. La pente maximale correspondant à des charges effectives très⁵ négatives est de 59 mV/décade soit une pente totale de 118 mV/décade.

⁵Lorsque $\frac{\alpha|\sigma_{eff}^{\pm}|}{\sqrt{[Cl^-]}} \gg 1$, le terme de couche diffuse prend la forme :

$$\Delta\phi_{CD} = \frac{2kT}{e} \operatorname{arsinh} \left(\alpha \frac{\sigma_{eff}^{\pm}}{\sqrt{[Cl^-]}} \right) \approx \mp \frac{kT}{e} (\ln[Cl^-]) \pm \frac{2kT}{e} \ln(2\alpha |\sigma_{eff}^{\pm}|)$$

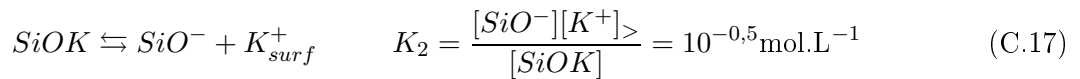
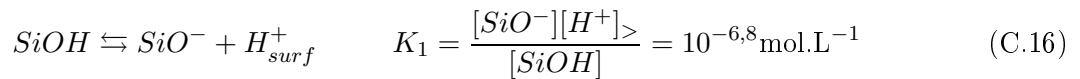
Pour $\sigma_{eff} < 0$, ce terme ajoute une variation analogue à celle de l'électrode (pente $\frac{kT}{e} \ln(10) \approx 60$ mV/décade)

• Pour des charges effectives positives ($\sigma_{eff} > 0$) :
 $\frac{\sigma_{eff}}{\sqrt{[Cl^-]}} \searrow$ quand $[Cl^-] \nearrow$ d'où une diminution de ΔU_{SE} qui contrebalance l'augmentation liée à l'électrode. La pente minimale, pour des charges effectives très positives, étant de -60 mV/décade, la pente totale devient nulle.

C.2 Modélisation de l'interface SiO₂/électrolyte avec un paramètre σ_{eff} variable

Le modèle σ_{eff} constant développé précédemment, a été dérivé à partir d'une description de la couche condensée, au voisinage de l'interface, faisant intervenir deux plans de charge : le plan SiO₂/électrolyte, associé à la densité surfacique de charge σ_1 et le plan de Helmholtz décrit par σ_2 . Les résultats expérimentaux présentés au chapitre 5 montreront que les modifications physiques de la couche condensée puissent, en première approximation, être globalement reproduites par une modification du paramètre σ_{eff} . Sous ces hypothèses, une description fine de type double couche de la zone d'interface, n'apparaît pas nécessaire. La modélisation présentée dans cette section a été simplifiée en assimilant la couche condensée à un unique plan de charges, caractérisé par une densité de charge σ_{int} , immédiatement suivi de la couche diffuse. La différence entre ce modèle et le modèle σ_{eff} constant porte sur la prise en compte des propriétés chimiques d'une surface de SiO₂ en contact avec un électrolyte 1:1, induisant des variations de σ_{int} en fonction de la concentration de l'électrolyte de KCl utilisé lors de la mesure.

La chimie de l'interface SiO₂/électrolyte a été très étudiée. Différentes techniques, notamment la spectroscopie Raman et la RMN [77, 112, 113], ont permis d'identifier les espèces présentes à la surface et ont montré que, pour des pH supérieurs à environ 4, les groupes silanol (SiOH) s'ionisent, conduisant à la formation d'ions siloxane, SiO⁻. Des analyses effectuées par cristallographie [77] ont évalué que la densité surfacique totale de sites susceptibles d'être ionisés, notée N_S par la suite, est de l'ordre de $5 \times 10^{18} \text{ m}^{-2}$. D'autre part, des expériences de titrage [77] situent la constante associée à la réaction de dissociation silanol/siloxane à environ $10^{6,8}$, indiquant que la surface n'est que faiblement acide. Une description généralement admise de la variation de la charge de l'interface SiO₂/électrolyte en fonction du pH ou des contre-ions présents en solution, est fondée sur la prise en compte de différents équilibres de complexation pouvant impliquer les groupements silanol ou siloxane. D'après [114], il est possible, en première approximation, de modéliser l'évolution de la charge de surface, σ_{int} , en introduisant les équilibres chimiques :



Les constantes précédentes sont intrinsèques et font intervenir soit les concentrations surfaciques des espèces SiO⁻, SiOH et SiOK, notées respectivement $[SiO^-]$, $[SiOH]$, $[SiOK]$, soit les

et, pour $\sigma_{eff} > 0$, une variation inverse inverse de $-\frac{kT}{e} \ln(10) \approx -60 \text{ mV/décade}$.

concentrations volumiques, au voisinage de la surface, des ions H^+ , Cl^- et K^+ , notées $[H^+]_>$, $[Cl^-]_>$ et $[K^+]_>$. De manière générale, la théorie de Boltzmann permet de relier les concentrations proches des surfaces, aux concentrations en volume⁶, loin de l'interface, par la relation :

$$\frac{[H^+]_>}{[H^+]_\infty} = \frac{[K^+]_>}{[K^+]_\infty} = \frac{[Cl^-]_>}{[Cl^-]_\infty} = e^{\frac{-e(\phi_0 - \phi_\infty)}{kT}} \quad (C.18)$$

où ϕ_0 et ϕ_∞ désignent respectivement le potentiel au niveau du plan de l'interface oxyde/électrolyte, caractérisé par σ_{int} et le potentiel à l'infini, dans le volume de la solution.

La différence de potentiel ($\phi_0 - \phi_\infty$) correspond au terme de couche diffuse donné dans l'appendice C et s'écrit donc :

$$\phi_0 - \phi_\infty = \frac{2kT}{e} \times Ash\left(\frac{\alpha \times \sigma_{eff}}{\sqrt{[K^+]_\infty}}\right) \quad (C.19)$$

$$\text{avec } \alpha = \frac{1}{\sqrt{8kT\epsilon_0\epsilon_r H_2O}} \approx 8.4 \begin{cases} \text{pour } [Cl^-] \text{ exprimée en } mol.l^{-1} \\ \text{et pour } \sigma_{eff} \text{ exprimée en } C/m^2 \end{cases}$$

σ_{eff} représente désormais la somme de la charge de canal σ_S , et de σ_{int} , mais dépend maintenant de la concentration de l'électrolyte via les deux équilibres C.16 et C.17 :

$$\sigma_{eff}([KCL]) = \sigma_{int}([KCL]) + \sigma_S \quad (C.20)$$

Par ailleurs, les équilibres C.16 et C.17 ne faisant intervenir que SiO^- comme espèce chargée, la charge de surface σ_{int} peut s'écrire :

$$\sigma_{int} = -e([SiO^-]_>) \quad (C.21)$$

Enfin, la densité surfacique totale de sites, N_S , pouvant participer aux différents équilibres chimiques étant fixée, on peut écrire la relation de fermeture :

$$N_S = [SiO^-] + [SiOH] + [SiOK] \quad (C.22)$$

Les expressions C.16 à C.22 constituent les équations retenues pour la modélisation.

⁶Les concentrations volumiques, loin de l'interface dans la solution, seront indicées par le symbole ∞ : $[H^+]_\infty$, $[Cl^-]_\infty$...

En couplant C.22 avec les expressions des constantes d'équilibre et la relation de Boltzmann, on obtient l'équation :

$$\ln\left[\frac{eN_S}{\sigma_S - \sigma_{eff}} - 1\right] = -2Ash\left(\frac{8,4 \times \sigma_{eff}}{\sqrt{[K^+]_\infty}}\right) + \ln\left[\frac{10^{-pH}}{K_1} + \frac{[K^+]_\infty}{K_2}\right] \quad (\text{C.23})$$

qui définit intrinsèquement la valeur de σ_{eff} en fonction de la concentration de l'électrolyte de KCl.

La résolution numérique de cette équation permet d'obtenir l'allure de la variation de $\sigma_{eff} = f([KCL])$ en fonction des paramètres K_1 , K_2 , N_S , de la charge du canal σ_S et du pH. L'influence des différents paramètres, ainsi que la comparaison des simulations avec les résultats expérimentaux sont détaillées au chapitre 5.

Bibliographie

- [1] Bergveld (2003) *Sensors and Actuators B* **88(1)**, 1–20.
- [2] Souteyrand, Cloarec, Martin, Wilson, Lawrence, Mikkelsen, and Lawrence (1997) *J. Phys. Chem. B* **101(15)**, 2980–5.
- [3] Pouthas, Gentil, Côte, and Bockelmann (2004) *Applied Physics Letters* **84**, 1594–1596.
- [4] Pouthas, Gentil, Côte, Zeck, Straub, and Bockelmann (2004) *Phys.Rev.E* **70**, 031906–1 – 031906–8.
- [5] Pouthas (2004) Détection de molécules d’ADN sur transistors à effet de champ, LPA, Département de physique de l’Ecole Normale Supérieure, Thèse de doctorat.
- [6] Cooper, Fritz, Wiegand, Wagner, and Manalis (2001) *Applied Physics Letters* **79(23)**, 3875–7.
- [7] Fritz, Cooper, Gaudet, Sorger, and Manalis (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99(22)**, 14142–6.
- [8] Uslu, Ingebrandt, Mayer, Bocker-Meffert, Odenthal, and Offenhausser (2004) *Biosensors and Bioelectronics* **19**, 1723–1731.
- [9] Hahm and Lieber (2004) *Nano Letters* **4(1)**, 51–4.
- [10] Peterlinz, Georgiadis, Herne, and Tarlov (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3401–2.
- [11] Jin-Lee, Goodrich, and Corn (2001) *Anal. Chem.* **73(22)**, 5525–31.
- [12] Wang, Nielsen, Jiang, Cai, Fernandes, Grant, Ozsoz, Beglieter, and Mowat (1997) *Anal. Chem.* **69(24)**, 5200–2.
- [13] Okahata, Niikura, Furusawa, and Matsuno (2000) *Analytical Sciences* **16**, 1113–9.
- [14] McKendry, Zhang, Arntz, Strunz, Hegner, Lang, Baller, Certa, Meyer, Guntherodt, and Gerber (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99(15)**, 9783–8.
- [15] Palecek and Fotja (2001) *Anal. Chem.* **73(3)**, 74A–83A.
- [16] Gooding (2002) *Electroanalysis* **14(17)**, 1149–56.
- [17] Wang (1999) *Chem. Eur. J* **5(6)**, 1681–5.
- [18] Drummond, Hill, and Barton (2003) *Nature Biotechnology* **21(10)**, 1192–9.
- [19] Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind, and Campbell (1997) *Nature* **385**, 810–813.
- [20] Miescher (1871) *Hoppe-Seyler’s Med. Chem. Untersuchungen* **4**, 441.
- [21] Avery, MacLeod, and McCarty (1944) *J.Exp.Med.* **79**, 137–158.
- [22] Hershey and Chase (1952) *J.Gen.Physiol.* **36**, 39–56.
- [23] Watson and Crick (1953) *Nature* **171**, 737–738.
- [24] Viovy (2000) *Review of Modern Physics* **72(6)**, 813–872.
- [25] Lehninger and Cox Principles of biochemistry, Worth Publishers, second edition.
- [26] Norman and Levenson (1990) *Polymerase Chain Reaction. Chemical and Engineering* pp. 36–47.

- [27] SADR Team (1995-1998) *The Polymerase Chain Reaction*. <http://bibserv.techfak.uni-bielefeld.de/sadr/index2.html>.
- [28] Mullis and Faloona (1987) *Methods Enzymol.* **155**, 335–50.
- [29] Saiki, Scharf, Faloona, Mullis, Horn, and Erlich (1985) *Science* **230**, 1350–4.
- [30] Jackson, Symons, and Berg (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2904–2909.
- [31] Sanger, Air, Barrell, Brown, Coulson, Fiddes, Hutchison, Slocombe, and Smith (1977) *Nature* **265**, 687–695.
- [32] Chalmers and Gaskell (2000) *Curr. Op. Biotechnol* **11**, 384–390.
- [33] Shalon, Smith, and Brown (1996) *Genom Res* **6**, 639–645.
- [34] Cheung, Morley, Aguilar, Massimi, Kucherlapati, and Childs (1999) *Nature Genetics* **21(1 Suppl)**, 15–9.
- [35] Southern (1975) *J. Mol. Biol* **98**, 503–517.
- [36] Thomas (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5201–5205.
- [37] Liang, Averboukh, Keyomarsi, Sager, and Pardee (1992) *Cancer Res* **52**, 6966–6968.
- [38] Liang and Pardee (1992) *Science* **257**, 967–971.
- [39] Saiki, Walsh, Levenson, and Erlich (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6230–4.
- [40] Maskos and Southern (1993) *Nucleic Acids Research* **21**, 4663–9.
- [41] Yershov et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4913–8.
- [42] *Nature genetics supplement, volume 21 no 1, (January 1999)*.
- [43] *Site Internet : <http://www.affymetrix.com>*.
- [44] Shalon, Smith, and Brown (1996) *Genome Res.* **6**, 639–45.
- [45] Michael, Eisen, Patrick, and Brown (1999) *Methods in Enzymology* **303**, 179–205.
- [46] *Site Internet : <http://cmgm.stanford.edu/pbrown>*.
- [47] Fodor, Leightonread, Pirrung, Stryer, LuTsai, and Solas (1991) *Science* **251**, 767–73.
- [48] Pease, Solas, and Cronin, S., Holmes, and Fodor (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91(11)**, 5022–6.
- [49] Schena, Heller, Theriault, Konrad, Lachenmeier, and Davis (1998) *Trends Biotechnol.* **16(7)**, 301–6.
- [50] Bowtell (1999) *Nature Genetics* **21(1 Suppl)**, 25–32.
- [51] Shockley (1952) *Proc. IRE* **40**, 1365.
- [52] Dacey and Ross (1953) *Proc. IRE* **41**, 970.
- [53] Bergveld (1972) *IEEE Trans Biomed Eng* **BME-19(5)**, 342–51.
- [54] Vlasov, Tarantov, and Bobrov (2003) *Anal. Bioanal. Chem.* **376(6)**, 788–96.
- [55] Antonisse, Snellink-Ruel, Lugtenberg, Engbersen, Van den Berg, and Reinhoudt (2000) *Anal. Chem.* **72(2)**, 343–8.
- [56] Kharitonov, Wasserman, Katz, and Willner (2001) *J. Phys. Chem. B* **105**, 4205–13.
- [57] Van Kerkhof, Bergveld, and Schasfoort (1995) *Biosens. Bioelectron* **10**, 269–82.
- [58] Lahav, Kharitonov, and Willner (2001) *Chem. Eur. J.* **7(18)**, 3992–7.

- [59] Zeck and Fromherz (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98(18)**, 10457–62.
- [60] Cui, Wei, Park, and Lieber (2001) *Science* **293(5533)**, 1289–92.
- [61] Star, Gabriel, Bradley, and Gruner (2003) *Nano Letters* **3(4)**, 459–63.
- [62] Manning (1978) *Q. Rev. Biophys.* **2**, 179–246.
- [63] Eversmann and al (2003) *IEEE Journal of Solid-State Circuits* **38**, 2306–2317.
- [64] Fromherz, Offenhäuser, Vetter, and Weis (1991) *Science* **252**, 1290–2.
- [65] Weiss and Fromherz (1997) *Phys. Rev. E* **55**, 877–89.
- [66] Straub, Meyer, and Fromherz (2001) *Nature Biotechnology* **19**, 121–4.
- [67] Straub Kopplung von Feldeffekttransistoren mit rekombinanten Ionenkanälen Doktorat der naturwissenschaften, genehmigten dissertation. TU München January 2001.
- [68] Zeck Halbleiterchip mit einfachem biologischen neuronalen Netz, Doktorat der naturwissenschaften, genehmigten dissertation. TU München, February 2002.
- [69] Sze (May, 1981) *Physics of semiconductor Devices*, John Wiley & Sons, 2nd edition.
- [70] Webb (1999) *Methods in enzymology* **307**, 3–20.
- [71] Lichtman (1994) *Pour la science* **204**, 62–7.
- [72] Guyon, Hulin, and Petit (1996) *Hydrodynamique physique*, EDP, cnrs edition.
- [73] Latour, Trembley, Tian, Lickfield, and Wheeler (2000) *Biomed. Mater. Res.* **49(1)**, 58–65.
- [74] Fung, Cheung, and Ko (1986) *IEEE Trans. On El. Dev* **ED-33(1)**, 8–18.
- [75] Bard and Faulkner (1980) *Electrochemical methods, fundamentals and applications*, Wiley, NY.
- [76] Israelachvili (1985) *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, Londres.
- [77] Persello (2000) *Surfactant Science Series* **90**, 1106–1116.
- [78] Pincus (1991) *Macromolecules* (24).
- [79] Decher and Schlenoff (2003) *Multilayer thin films*, Wiley-VCH, Weinheim.
- [80] Odberg, Sandberg, Welin-Klintstrom, and Arwin (Langmuir) *1995* **11**, 2621–2625.
- [81] Joanny (1999) *Eur. Phys. J. B* **9**, 117–122.
- [82] Wiegel (1977) *J. Phys A* **10**, 299.
- [83] Odijk (1980) *Macromolecules* **13**, 1542.
- [84] Muthukumar (1987) *J. Chem. Phys* **86**, 7230.
- [85] Van de Steeg, Stuart, C., Keiser, and Bijsterbosch (1992) *Anal. Bioanal. Chem.* **8(6)**, 2538–2546.
- [86] Dobrynin, Deshkovski, and Rubinstein (2000) *Phys Rev Letter* **84(14)**, 3101–3104.
- [87] Dobrynin (2001) *Journal of chemical physics* **114(18)**, 8145–53.
- [88] Dobrynin, Deshkovski, and Rubinstein (2001) *Macromolecules* **34**, 3421–36.
- [89] Biesalski, Johannsmann, and Ruhe (2004) *Journal of chemical physics* **120(18)**, 8807–8814.
- [90] Tran, Auroy, and Lee (1999) *Macromolecules* **32**, 8952–8964.
- [91] Grosberg, Nguyen, and Shklovskii (2002) *Reviews of modern physics* **74**, 329–345.

- [92] Marky and Breslauer (1987) *Biopolymers* **26**, 1601–1620.
- [93] Marmur and Doty (1962) *J. Mol. Biol.* **5**, 109–118.
- [94] Schildkraut and Lifson (1965) *Biopolymers* **3**, 195–208.
- [95] Gulland (1947) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **12**, 95–101.
- [96] Breslauer, Frank, Bloker, and Marky (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3746–3750.
- [97] SantaLucia and Hicks (2004) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 415–440.
- [98] Vainrub and Pettitt, M. (2002) *Wiley Interscience* (www.interscience.wiley.com).
- [99] Belosludtsev, Belosludtsev, Iverson, Lemeshko, Wiese, Hogan, and Powdrill (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun* **282(5)**, 1263–7.
- [100] Wang (2000) *Nucleic Acids Research* **28(16)**, 3011–6.
- [101] Pearson, Gill, and Vadgama (2000) *Ann. Clin. Biochem.* **37**, 119–45.
- [102] Fritzsche, Csáki, Reichert, Möller, and Köhler July 2001 *European Microscopy and Analysis* pp. 5–7.
- [103] Taton, Mirkin, and Letsinger (2000) *Science* **289**, 1757–60.
- [104] Meselson and Radding (1968) *Nature* **217**, 1110–1114.
- [105] Weiss and Richardson (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**, 1021–1028.
- [106] Zimmermann, Little, Oshinsky, and Gellert (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**, 1841–1848.
- [107] *Site Internet* : [http : //www.axon.com/gnGenePix4000.html](http://www.axon.com/gnGenePix4000.html).
- [108] *Site Internet* : [http : //rsb.info.nih.gov/ij](http://rsb.info.nih.gov/ij).
- [109] Larson and Attard (2000) *J. Colloid Interface Sci* **227**, 152.
- [110] *CRC Handbook of Chemistry and Physics, D. R. Lide ed., CRC Press, 1994 (75th Edition)*.
- [111] Atkins (1995) *Physical Chemistry*, Oxford, 5th edition.
- [112] Bergna (1994) *The Colloid Chemistry of silica*, Am. Chem. Soc, Washington.
- [113] Parks (1984) *J. Geophys. Res* **89**, 3997.
- [114] Icenhower and Dove (2000) *Surfactant Science Series* **90**, 2904–2909.

RESUME

Ce manuscrit présente l'étude d'une nouvelle méthode de détection électronique différentielle de l'hybridation entre oligonucléotides, utilisant des réseaux de transistors à effet de champ et une fixation des ADN sondes de type polylysine. Les structures employées sont des réseaux d'EOSFETs, possédant une interface du type électrolyte/oxyde/semi-conducteur (EOS), qui peuvent être immergées dans un électrolyte de mesure dans lequel est plongé une électrode de référence.

La première partie de ce travail détaille les expériences nous ayant permis de montrer la faisabilité d'une détection électronique d'abord de polylysine, puis d'ADN sur un réseau d'EOSFETs. Des micro ou macrogouttelettes de solutions contenant ces biopolymères chargés ont été déposées en des endroits prédéfinis sur les réseaux de capteurs. Ces dépôts locaux induisent des variations des caractéristiques courant-tension des transistors exposés, pouvant être corrélées à un apport de charges soit positives dans le cas de la polylysine, soit négatives en ce qui concerne l'ADN. Il apparaît que le signal électronique détecté peut être considéré comme proportionnel au nombre moyen d'oligonucléotides de 20 bases par unité de surface, tant que celui-ci reste inférieure à $10^3 - 10^4$ molécules par μm^2 , avec une variation de 10 mV pour 100 à 1000 molécules déposées par μm^2 . Au-delà de $10^3 - 10^4$ molécules par μm^2 , une saturation du signal électronique est observable. La détection de microdépôts de faibles concentrations en biopolymères est limitée par l'existence de signaux électroniques parasites observés avec des solutions servant aux dilutions. Des études ont également été menées afin de caractériser la variation des signaux électroniques en fonction de la concentration en sel d'un électrolyte de mesure de KCl.

L'utilisation d'un protocole d'hybridation sur fixation polylysine, sans étape de blocage visant à limiter l'adsorption non spécifique de cibles, a conduit à la mise en évidence d'un signal différentiel de l'ordre de 5 mV lors d'hybridations et de mesures dans un électrolyte de $[\text{KCl}] = 20$ mM. La réalisation de la réaction d'hybridation à haut sel (20 ou 50 mM) et de la phase de détection à bas sel (0,01 mM), permet d'obtenir des différences d'environ 15 mV. En utilisant un bloqueur, aucun signal électronique significatif caractérisant l'appariement entre brins complémentaires n'a pu être observé. La sensibilité de ce système de détection électronique de l'hybridation, estimée à $10^2 - 10^3$ doubles-brins de vingt paires de bases par μm^2 , est proche de celle associée à la technique classique de fluorescence (0,5 à 80 doubles-brins par μm^2).

Mots clés : hybridation, détection électronique différentielle, transistors à effet de champ, réseaux d'EOSFETs, polylysine, ADN, oligonucléotides, fluorescence.

ABSTRACT

A new approach, aiming at detecting electronically and in a differential mode DNA hybridisation using polylysine fixation of the probes, has been developed. The measurements were performed with integrated arrays of EOSFET structures covered with an electrolyte. This type of semiconductor structures is operating with a reference electrode and is characterised by electrolyte-oxide-semiconductor (EOS) interfaces. The electronic detection of two charged biopolymers, polylysine and DNA, has been first investigated. Local spotting of these biomolecules solutions onto the array, induces sizeable variations in the dc current-voltage characteristics of the transistors exposed to the molecular charges. The variations of the dc characteristics due to the adsorption of polylysine or DNA showed opposite effects and can be correlated to a contribution of positive charges for polylysine and negative charges for DNA. For oligonucleotides surface densities lower than $10^3 - 10^4$ molecules. μm^{-2} , the electronic signal detected increases linearly, with a variation of 10 mV for $10^2 - 10^3$ molecules spotted per μm^2 . Above this limit, a saturation of the electronic signal appears. Interfering signals observed on the buffers used for dilutions limit the detection of low biopolymers concentration. A modeling of the interface charge screening by the electrolyte may account for the reductions in the electronic signals observed when the electrolyte salt molarity is gradually increased. A hybridisation protocol without blocking step, aiming at limiting non-specific adsorption of targets, showed a differential electronic signal of 5 mV, measured with a KCl electrolyte at 20 mM, and of 15 mV at $[\text{KCl}] = 0,01$ mM. With a blocking step, no electronic signal has been detected, even if fluorescence tests proved that the hybridization reaction occurred on the array surface. The sensitivity of this hybridization detection system ($10^2 - 10^3$ double stranded DNA molecules per μm^2) is close to the fluorescence detection sensitivity (0,5 - 80 double stranded DNA per μm^2).

Key words : hybridization, differential electronic detection, Field Effect Transistors, EOSFET arrays, polylysine, DNA, oligonucleotides, fluorescence.