



Fabrication et Fonctionnalisation de BioMEMS par Plasma Froid pour l'Analyse de la Biocatalyse en Spectroscopie TeraHertz

Abdenmour Abbas

► To cite this version:

Abdenmour Abbas. Fabrication et Fonctionnalisation de BioMEMS par Plasma Froid pour l'Analyse de la Biocatalyse en Spectroscopie TeraHertz. Physique [physics]. Université de Lille1, 2010. Français. NNT: . tel-00453908

HAL Id: tel-00453908

<https://theses.hal.science/tel-00453908>

Submitted on 5 Feb 2010

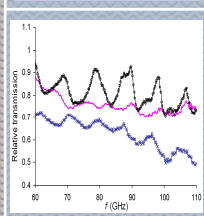
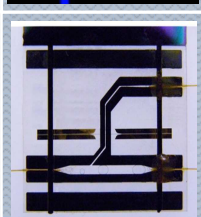
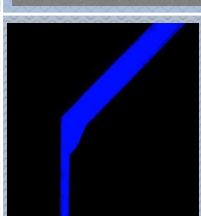
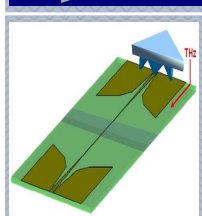
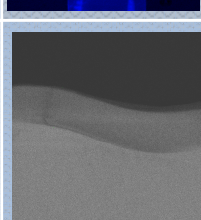
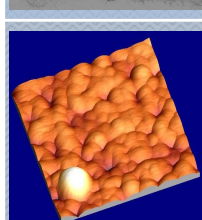
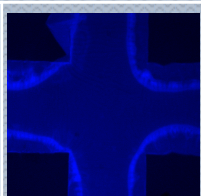
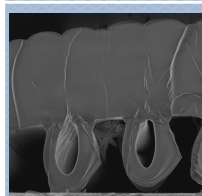
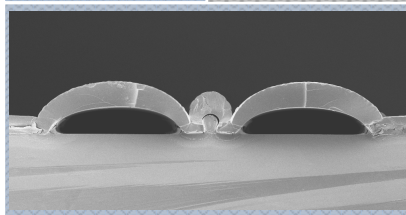
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Fabrication et Fonctionnalisation de BioMEMS par Plasma Froid pour l'Analyse de la Biocatalyse en Spectroscopie TeraHertz

Cold Plasma Fabrication and Functionalization of TeraHertz BioMEMS for Enzyme Reaction Analysis

Abdenmour ABBAS





UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE1
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIERE, DU RAYONNEMENT ET DE L'ENVIRONNEMENT

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE LILLE 1

Spécialité : Sciences des Matériaux et Ingénierie

Présentée par **Abdenmour ABBAS**

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 1

Fabrication et Fonctionnalisation de BioMEMS par Plasma Froid pour l'Analyse de la Biocatalyse en Spectroscopie TeraHertz

Cold Plasma Fabrication and Functionalization of
TeraHertz BioMEMS for Enzyme Reaction Analysis

Thèse soutenue à l'université de Lille1, le 27 octobre 2009

La commission d'examen est composée de:

Président du Jury	Prof. Alain CAPPY	Directeur de l'IEMN
Directeurs de thèse	Prof. Didier GUILLOCHON	Responsable d'équipe au Laboratoire ProBioGEM
	Prof. Philippe SUPLOT	Directeur du laboratoire GÉPIFRÉM
	Prof. Bertrand BOCQUET	Responsable de l'équipe M2T-IEMN
Rapporteurs	Prof. Loïc BLUM	Directeur de l'ICBMS
	Prof. Farzaneh AREFI-KHONSARI	Directrice de l'école doctorale ED-310 Responsable d'équipe au LGPPTS
Membres du Jury	Dr. Pascal COLPO	Responsable de projets scientifiques et techniques au JRC-Italie
	Dr. Philippe LEVEQUE	Chargé de Recherche CNRS à XLIM

A mes Parents avec Reconnaissance...
A ma Grande Famille et mon adorable Femme...

Liste des publications

BREVETS

- “Microchannel fabrication using plasma polymerization on micropatterned surfaces”
Inventeurs: A. Abbas, P. Supiot, D. Guillochon, B. Bocquet
Demande de brevet français déposée le 25 Février 2009, sous la référence: 09.51200.

PUBLICATIONS: Articles entiers dans des revues internationales à comité de lecture (FI: Facteur d'Impact en 2008)

- A. Abbas, A. Trezeibre, P. Supiot, N. Bourzgui, D. Guillochon, D. Vercaigne, B. Bocquet
“Cold plasma functionalized TeraHertz BioMEMS for enzyme reaction analysis”
Biosensors and Bioelectronics, 25 (2009) 154–160. [FI: 5.143].
- A. Abbas, P. Supiot, V. Mille, D. Guillochon, B. Bocquet
“Capillary microchannel fabrication using plasma polymerized TMDS for fluidic MEMS technology”
Journal of Micromechanics and Microengineering, 19 (2009) 045022, 1-8. [FI: 2.233].
- A. Abbas, C. Vivien, B. Bocquet, D. Guillochon, P. Supiot
“Preparation and multi-characterization of plasma polymerized allylamine films”
Plasma Processes and Polymers, 6 (2009) 593–604. [FI: 2.921].
- A. Abbas, D. Vercaigne-Marko, B. Bocquet, P. Supiot, C. Vivien, D. Guillochon
“Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine”
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 73 (2009) 315–324. [FI: 2.593].
- Abbas A., Vivien C., Supiot P., Bourzgui N.-E., Bocquet B., Guillochon D.
«Polymérisation par plasma pour la fabrication de circuits microfluidiques»,
Récents Progrès en Génie des Procédés, N° 98 –2009, 2-910239-72-1, Ed. SFGP, Paris.

Articles non-inclus dans cette thèse:

- A. Abbas, T. Dargent, D. Croix, M. Salzet, B. Bocquet,
“Ex-vivo detection of neural events using millimeter-wave BioMEMS”,
Medical Science Monitor, 2009; 15(9): MT121-125, [FI: 1.607].

Articles à soumettre:

- A. Abbas, D. Vercaigne-Marko, B. Bocquet, P. Supiot, D. Guillochon
“Effects of trypsin immobilization on biocatalysis kinetic behavior”
Biotechnology & Bioengineering.
- A. Abbas, C. Vivien, B. Bocquet, D. Guillochon, P. Supiot
“Plasma allylamine polymer: A 3D functional matrix”
Surface Coating and Technology

4 Conférences internationales: ICOPS 2009 (USA), MMB 2009 (Canada), EuCHEMS 2008 (Italie), E-MRS 2009 (Strasbourg)

2 Conférences nationales, 4 Conférences invitées.

(Plus de détails sur <http://m2t.iemn.univ-lille1.fr/Templates/abbas.html>)

Résumé

Avec l'avènement des BioMEMS (Bio-MicroElectroMechanical Systems), ce sont toutes les pratiques médicales, biologiques, environnementales et agro-alimentaires qui entament une nouvelle ère. Les enjeux scientifique et industriel se rejoignent dans la miniaturisation des systèmes de détection, l'amélioration de leurs sensibilités et la simplification de leurs procédés de fabrication.

Cette thèse hautement interdisciplinaire s'inscrit dans le cadre de ces enjeux. Elle expose la fabrication, la bio-fonctionnalisation et l'application d'un BioMEMS pour l'analyse de réactions enzymatiques en temps réel et à l'échelle micrométrique. Deux choix stratégiques ont été adoptés pour ce travail: le premier concerne l'utilisation de la technologie des plasmas froids ou polymérisation plasma pour la fonctionnalisation de surface à travers le dépôt de films polymères d'allylamine. Ce dépôt a permis ultérieurement l'immobilisation covalente de la trypsine (enzyme modèle protéolytique) au sein du BioMEMS. Cette technologie a été également utilisée pour développer une méthode simple de microfabrication des circuits microfluidiques compatible avec une production à grande échelle. Le second choix concerne l'utilisation de ce bioMEMS autour d'une transduction TeraHertz (THz) mise au point au sein de l'équipe. La spectroscopie THz vise à détecter les événements moléculaires à l'échelle de la picoseconde, sans marqueur et d'une manière non-invasive, en sondant directement les liaisons chimiques de faible énergie.

Au cours de ce travail, nous avons donc développé un procédé de fonctionnalisation de surfaces par des amines, optimisé une méthode de greffage des enzymes, et étudié l'activité de la trypsine immobilisée. Nous avons ensuite intégré ces étapes dans le procédé de microfabrication du BioMEMS. Les mesures réalisées dans le domaine sub-THz (0,06-0,11 THz) sur une réaction de biocatalyse confirment la faisabilité d'une telle approche comme méthode analytique en biologie. Les résultats des différentes études montrent également que le mariage des plasmas froids avec les méthodes lithographiques représente une voie efficace, rapide et très compétitive pour le transfert de la technologie des BioMEMS à l'échelle industrielle.

Mots clés: *BioMEMS, Microfabrication, Plasma froid, Spectroscopie TeraHertz, Fonctionnalisation de surface, polymérisation plasma, réaction enzymatique, Biointerfaces.*

Abstract

The applications of miniaturized devices are no longer limited to electronic industry. Today, a new kind of microsystems called BioMEMS (Bio-MicroElectroMechanical Systems) are spreading in different fields, including biomedical, environmental and food industry applications. Recurring challenges are focusing on enabling processes for smaller, cost-effective, high-functionality devices, with more sensitivity and suitability for industrial scale development.

This highly interdisciplinary thesis work attempts to provide new solutions to meet some of the needs mentioned above. It reports the fabrication, functionalization, and applications of a BioMEMS for enzyme reaction monitoring. First, we have developed a PECVD (plasma enhanced chemical vapor deposition) process for the surface functionalization by plasma polymerized allylamine. Films with high amine density and enhanced stability in aqueous environment were obtained. The amine functions were then used for enzymes immobilization. The covalently bonded trypsin molecules were extensively characterized and kinetic parameters determined using several microscopic and spectroscopic methods. Finally, both optimized processes were applied to the biofunctionalization of a TeraHertz (THz)-based BioMEMS. THz spectroscopy is the only non-invasive analytic method able to monitor molecular events at the picosecond timescale by probing low binding energies directly. It is used here for sensing a biocatalysis reaction inside the bioMEMS microchannels. Sub-THz measurements (0.06-0.11 THz) showed that combining microfluidic microsystems technology with THz detection could be a promising alternative for label-free real-time detection of biological interactions at the microscale.

Additionally, we have developed a new microchannel fabrication process using direct plasma polymerization of TMDS (TetraMethylDiSiloxane) on micropatterned surfaces. This achievement demonstrates that cold plasma processes could be used not only for functionalization purposes or surface treatment but for the 3D microfabrication as well. This highly reduces processing time and manual handling steps, which is of a great importance for further industrial scale production.

Keywords: *BioMEMS, Microfabrication, Cold plasma, TeraHertz spectroscopy, Surface functionalization, Plasma polymerization, Enzyme reaction, Biointerfaces.*

Nomenclature

Abréviations & acronymes

AFM	Atomic force microscopy
ADN	Acide désoxyribonucléique
BA-AMC	N_α -benzoyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarine
BAEE	N_α -Benzoyl-Arginine Ethyl Ester
BCB	Benzocyclobutene
BioMEMS	Bio-MicroElectroMechanical Systems
BSE	back-scattered electrons (mode)
CCD	Charge-Coupled Device (camera)
CPW	CoPlanar Waveguide
CVD	Chemical Vapour Deposition
CW	Continuous-wave
EC	Enzyme Commission (number)
DC	Direct Current (Courant continu)
DI	Di-Ionized (water)
EDX	energy dispersive X-ray analysis
FWHM	Full Width at Half Maximum
FTIR	Fourier Transform InfraRed
GA	glutaraldéhyde
MEB	microscopie électronique à balayage
MW	Microwaves (Micro-ondes)
NBA	Nitrobenzaldéhyde
PBS	Phosphate Buffer Saline (Solution)
PDL	Post-Décharge Lointaine
PECVD	Plasma Enhanced CVD
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
ppAA	Plasma Polymerized Allylamine
PPSL	Plasma Polymerization on Sacrificial Layer
PPMS	Plasma Polymerization on micropatterned Surfaces
ppTMDS	ppTMDS: Plasma Polymerized TMDS
P-V	Peak-to-Valley (separation)
RF	Radiofréquences
RFGD	radio frequency glow discharges
RMS	Root-Mean-Square (roughness)
RPECVD	Remote PECVD
SEM	Scanning Electron Microscopy
slpm	standard liter per minute.
sccm	standard cubic centimeter per minute.
TMDS	1,1,3,3,tetramethyldisiloxane
UV	Ultra-Violet
VNA	vectorial network analyzer
XPS	X-ray Photoelectrons Spectroscopy

Symboles

E	Energie
W	Puissance
ϕ	Débit de gaz ou de monomère
p	Pression
γ	Tension interfaciale
θ	angle de contact
A	Absorbance
α	Coefficient d'absorption
κ	Coefficient d'extinction
γ	Coefficient de diffusion
ε	Permittivité
n	Indice de réfraction
λ	Longueur d'onde
Φ	Phase
f	Fréquence
ω	Fréquence angulaire
τ	Temps de relaxation
R_d	Resolution de dépôt
h	Hauteur
w	Largeur
V	Vitesse
T_R	Transmission relative
μ	Moment dipolaire
T_e	Température des électrons
T_v	Température d'excitation vibrationnelle des molécules
T_0	Température du gaz (molécules neutres)
T_i	Température des ions,
T_r	Degree de liberté des mouvements rotationnels des molécules.
K_m	Constante de Michaelis
[E]	Concentration d'enzyme
[S]	Concentration de substrat
[P]	Concentration de produit
K_{cat}	Constante catalytique
k	Constante de vitesse

Table des matières

Table des matières

LISTE DE PUBLICATIONS	I
RESUME.....	II
NOMENCLATURE	III
1 INTRODUCTION GENERALE.....	1
1.1 BioMEMS, Biocapteurs, Laboratoires sur puces: Historique, enjeux et état de l'art	1
1.2 Les TeraHertz comme outil d'analyse	6
1.3 Les plasmas froids comme outil d'ingénierie de surface.....	9
1.4 Concept de la thèse	13
Références	15
2 PRINCIPES ET METHODES EXPERIMENTALES	18
2.1 Dépôts de films minces par plasma	18
2.1.1 Polymérisation par plasma.....	18
2.1.2 Polymérisation assistée par plasma de décharge radiofréquences.....	19
2.1.3 Polymérisation assistée par plasma micro-onde en post décharge	21
2.2 Traitement de surface par plasma UV-ozone	24
2.3 Techniques de caractérisation de la surface et de la composition chimique.....	26
2.3.1 Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)	26
2.3.2 Angle de contact et énergies libres de surface	27
2.3.3 Microscopie à fluorescence	29
2.3.4 Microscopie à force atomique	30
2.3.5 Spectroscopie photoélectronique des rayons X.....	32
2.3.6 Spectroscopie UV-Visible	34

2.3.7 Spectrofluorométrie.....	35
2.3.8 Microscopie électronique à balayage	37
2.3.9 Dérivations chimiques.....	38
2.4 Mesures en spectroscopie TeraHertz	39
Références	43
 3 FONCTIONNALISATION DE SURFACE PAR PLASMA D'ALLYLAMINE	46
3.1 Dépôt de couches minces par plasma d'allylamine	46
Article 1: Préparation et multi-caractérisation de films d'allylamine déposés par plasma	47
3.2 Polymère plasma d'allylamine: une matrice fonctionnelle tridimensionnelle	59
3.2.1 Rappel des conditions optimales de dépôt des films d'allylamine.....	59
3.2.2 Fonctionnalisation de nanostructures par un film d'allylamine.....	60
3.2.3 Réactivité de l'intérieur du film polymère d'allylamine.....	62
Références	65
 4 IMMOBILISATION COVALENTE DE BIOMOLECULES	66
4.1 Immobilisation de la trypsine sur le polymère plasma d'allylamine	66
Article 2: Immobilisation covalente de la trypsine sur des films d'allylamine déposés par plasma	67
4.2 Effets de l'immobilisation sur l'activité enzymatique.....	77
4.2.1 Disposition des enzymes sur les films de ppAA	77
4.2.2 Rappel théorique	79
4.2.2.1 Les paramètres cinétiques d'une enzyme.....	79
4.2.2.2 Représentation graphique des résultats.....	80
4.2.3 Caractérisation du spectrophotomètre	82
4.2.4 Etude de la réaction enzymatique en solution	83
4.2.5 Etude de la réaction enzymatique sur support solide	84
Références	87

5	MICROFABRICATION ET APPLICATION DU BIOMEMS TERAHERTZ	88
5.1	BioMEMS TeraHertz: fabrication, fonctionnalisation et étude de faisabilité	88
	Article 3: BioMEMS TeraHertz fonctionnalisé par plasma froid pour l'analyse de réactions enzymatiques	86
5.2	Perspectives de la spectroscopie THz comme outil analytique en biologie.....	96
5.2.1	Le besoin de sensibilité.....	96
5.2.2	Le besoin de portabilité.....	96
5.2.3	Le besoin de modèles théoriques	98
	Références.....	101
6	NOUVELLES PERSPECTIVES EN MICROFABRICATION ET FONCTIONNALISATION DE BIOMEMS PAR PLASMA FROID	103
6.1	Applications du plasma froid en micro-biotechnologies.....	103
6.2	Polymérisation plasma: un nouvel outil de microfabrication.....	106
	Article 4: Fabrication de microcanaux capillaires par polymérisation plasma de TMDS pour des applications en MEMS microfluidiques	107
	Références.....	115
	CONCLUSION GENERALE	118
	ANNEXES	122
	LISTE DES TABLEAUX.....	129
	LISTE DES FIGURES.....	130
	REMERCIEMENTS.....	134

Chapitre 1 ---

Introduction générale

Chapitre 1

Introduction générale

Ce chapitre présente les trois grands concepts sur lesquels est construit ce travail de thèse (BioMEMS, plasmas froids, spectroscopie TeraHertz). Il relate également l'historique, les enjeux socio-économiques et l'état de l'art dans ces domaines. Enfin, il définit le concept et l'organisation de ce manuscrit à travers une brève description des différents chapitres, des objectifs visés et de l'approche scientifique adoptée.

1.1 BioMEMS, Biocapteurs, Laboratoires sur puces: Historique, enjeux et état de l'art

Imaginez :

- ✓ Au cours d'une visite médicale, votre médecin vous fait une prise de sang totalement indolore grâce à un petit patch contenant des centaines de micro-seringues. Il dépose le patch sur une plateforme CDLab qu'il introduit dans un analyseur qui vous rappellera le lecteur CD. En quelques minutes, il reçoit les analyses sur son ordinateur, détermine l'espèce bactérienne ou virale à l'origine de votre infection avant de vous prescrire un traitement ciblé et adéquat.
- ✓ Un micro-dispositif qui, une fois implanté sur la rétine, rétablit la vue à des patients aveugles.
- ✓ Au lieu de recourir à une chirurgie risquée, votre médecin vous injecte dans le sang une microcapsule qui va parcourir votre corps et atteindre l'organe malade. Une fois sur la cible, la capsule est activée à distance pour effectuer le traitement ou libérer les médicaments nécessaires.
- ✓ Un patch ou un microdispositif planté sur ou sous la peau qui, selon la concentration du glucose dans le sang, déclenche ou non une libération d'insuline, évitant ainsi aux diabétiques les injections régulières et la surveillance permanente de leur glycémie.

Ces possibilités ne sont qu'un exemple d'une révolution en marche grâce aux biotechnologies. Il s'agit d'une miniaturisation des systèmes de détection, d'analyse et de traitement au service de la biologie, de l'environnement, de la médecine et de l'agro-alimentaire. Au cours de la dernière décennie, les premiers développements de miniaturisation ont d'abord concerné des dispositifs électromécaniques ou MEMS (pour Micro Electro Mechanical Systems) tels que les accéléromètres et les capteurs de pression qui ont eu un large succès commercial. Cette technologie s'est rapidement étendue aux domaines biologique et médical pour donner naissance à ce qui est connu sous les noms de "BioMEMS", "biosensors", "lab on chips" ou " μ -TAS" (pour Micro-Total Analysis Systems). Ces dispositifs (Figure 1) sont généralement composés d'une partie microfluidique incluant des microcanaux, des microvalves, des micropompes, des micromixeurs, des microréacteurs pour la manipulation des différents liquides ou objets biologiques, d'une plateforme de détection plus au moins complexe contenant un ou plusieurs capteurs, et de la composante biologique qui peut être intégrée (biorécepteur) ou momentanément introduite pour les besoins d'analyse.

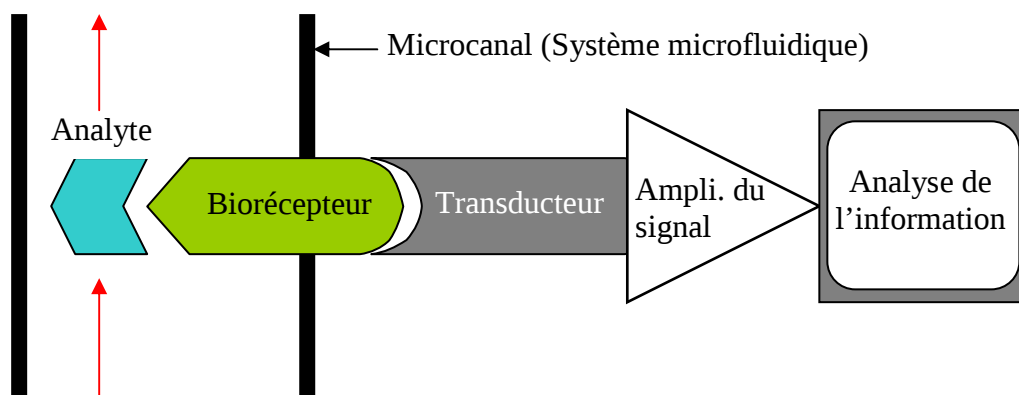


Figure 1. Schéma basique d'un BioMEMS.

L'explosion de la recherche et des applications dans ce domaine a entraîné une multiplication de la nomenclature et des concepts techniques. Nous tenterons donc tout d'abord d'établir une nomenclature précise basée sur les fonctionnalités et les degrés d'intégration des différents systèmes. Les termes de bioMEMS et bio-microsystèmes sont de plus en plus utilisés pour désigner, d'une manière générale, la grande panoplie des microdispositifs destinés aux sciences de la vie. Ces derniers peuvent être classés en 5 grandes catégories:

- ✓ Micropuces ou «*Microarrays*»: Elles sont basées essentiellement sur l'hybridation (brins d'ADN) ou la reconnaissance moléculaire (ligand-récepteur) qui sont généralement détectées par fluorescence sans l'intervention d'un transducteur intégré. Actuellement, beaucoup de développements se font sur des puces à protéines, à lipides ou à saccharides, qui s'ajoutent aux puces à ADN déjà commercialisées.
- ✓ Biocapteurs ou «*Biosensors*»: Ils sont composés de biorécepteurs immobilisés sur un transducteur qui peut être optique ou plus généralement électromagnétique, électrochimique, piézoélectrique, calorimétrique ou acoustique. Le principe de base d'un biocapteur est de transformer une propriété biochimique d'un phénomène biologique en un signal électrique. Le premier biocapteur a été développé en 1950 par Leland Clarke pour mesurer la concentration en oxygène dissout dans le sang grâce à des électrodes fonctionnalisées.
- ✓ Laboratoire sur puces ou «*Lab on chips, μ TAS*»: Ce sont des microdispositifs multifonctionnels et plus élaborés qui permettent, selon leur degré d'intégration, une fonction de transduction, mais surtout de préparation des échantillons, séparation, analyse, de culture cellulaire ou tissulaire. En plus du transducteur, ces composants contiennent un système microfluidique (microcanaux) pour gérer les fluides à analyser.
- ✓ Dispositifs implantables ou «*implantable devices*»: Ce sont des microsystèmes soit biohybrides soit en contact direct avec un système vivant à l'exemple des organes artificiels, les interfaces cerveau-machine et les systèmes de libération médicamenteuse.
- ✓ Les micro/nanomachines: Ce sont des dispositifs qui peuvent être injectés dans les liquides corporels, qui n'ont pas forcément une composante biologique, mais dont la fonction est de cibler puis d'interagir avec le système vivant.

Cette classification n'est évidemment pas statique. Plusieurs dispositifs peuvent résulter de l'intégration de deux ou plusieurs des éléments cités ci-dessus, ou même faire l'objet d'une combinaison avec des systèmes nanométriques pour former ce qui est appelé les BioNEMS (pour Bio-NanoElectroMechanical Systems), à l'exemple des nanomachines destinées au ciblage médical. L'essor de ces micro-dispositifs et l'intérêt montré par les communautés scientifiques et industrielles (Figure 2) est expliqué par les multiples avantages que procure le

principe même de la miniaturisation, mais aussi par les phénomènes et les propriétés qui émergent à l'échelle du micromètre et du nanomètre. Les avantages les plus évidents sont :

- ✓ Le travail sur des microvolumes d'échantillons biologiques ou médicaux, ce qui se révèle d'un grand secours pour le génie génétique, l'analyse paléontologique ou la médecine légale, où l'échantillon disponible n'est pas souvent suffisant pour une analyse classique.
- ✓ L'intégration plus importante des fonctions, ce qui réduit ainsi le besoin de l'intervention humaine dans la préparation et l'analyse des échantillons, et par conséquent, réduit les problèmes de contamination, de fiabilité et de risques sécuritaires.
- ✓ Une très grande sensibilité et une spécificité améliorée, étant donné que l'analyse pourrait potentiellement se faire sur une cellule ou molécule unique.
- ✓ Réactions plus rapides et plus maîtrisées grâce à la microfluidique et aux propriétés inhérentes à la miniaturisation (rapport surface/volume important, domination des forces interfaciales et de la diffusion moléculaire).
- ✓ Réduction du coût et du temps d'analyse grâce, entre autre, à la parallélisation des systèmes de mesure.

En deux décennies, tous ces avantages ont permis aux bioMEMS d'investir toutes les échelles de la structure du vivant, allant du génie génétique (séquençage, génotypage, pharmacogénomique), en passant par la protéomique (conformations, interactions) et les manipulations cellulaires, jusqu'à l'ingénierie tissulaire. De plus en plus d'applications sont également annoncées pour le diagnostic et le traitement médicaux, les organes artificiels, l'interface cerveau-machine et les sécurités agro-alimentaire et environnementale. Plusieurs revues de ces applications sont disponibles dans la littérature [1-5].

Le rapport D&MD (*Drug & Market Development Publications*), du groupe *Informa plc.* a estimé le marché mondial des bioMEMS à 1600 M\$ en 2006, avec une croissance d'environ 32% [6]. Le récent rapport de *Yole Développement* prévoit quant à lui une augmentation du marché de 1000 M\$ en 2008 à 2500 M\$ en 2012 (Figure 3) [7]. Plusieurs grandes entreprises telles que Affymetrix, Agilent, BioMérieux, Aventis, Roche Diagnostic et d'autres récentes et plus spécialisées comme CardioMEMS, Abasys, NovaSensor, Biosciences Inc., Proteus

Biomedical, Sensimed AG, SenseOmics ou i-Stat montrent un intérêt croissant pour ce domaine.

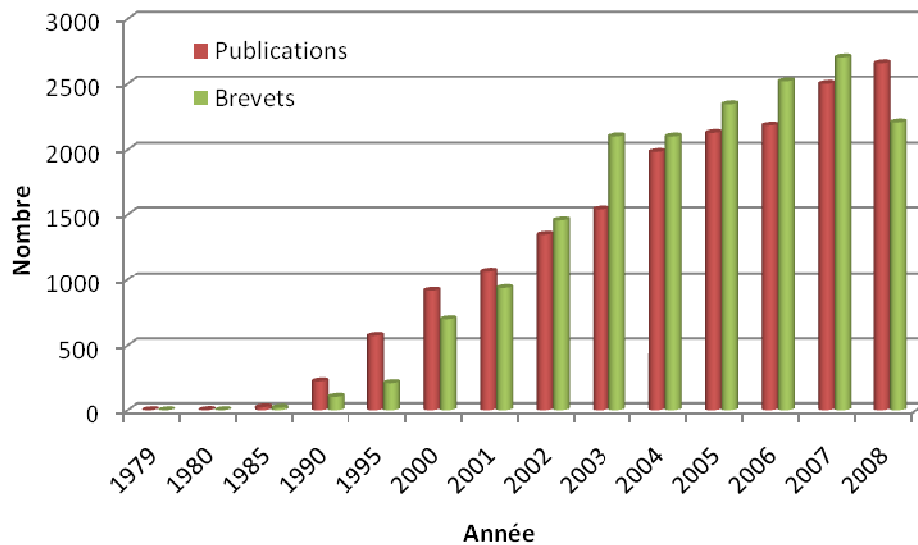


Figure 2. Evolution de la production scientifique (publications, brevets) concernant les bioMEMS depuis l'année 1979. Le graphique a été réalisé par l'interrogation des bases de données SCOPUS et Science Direct, en recherchant les termes : *BioMEMS* OR *biosensors* OR *lab on chip* OR *micro total analysis system*, dans *title* OR *abstract* OR *key words*.

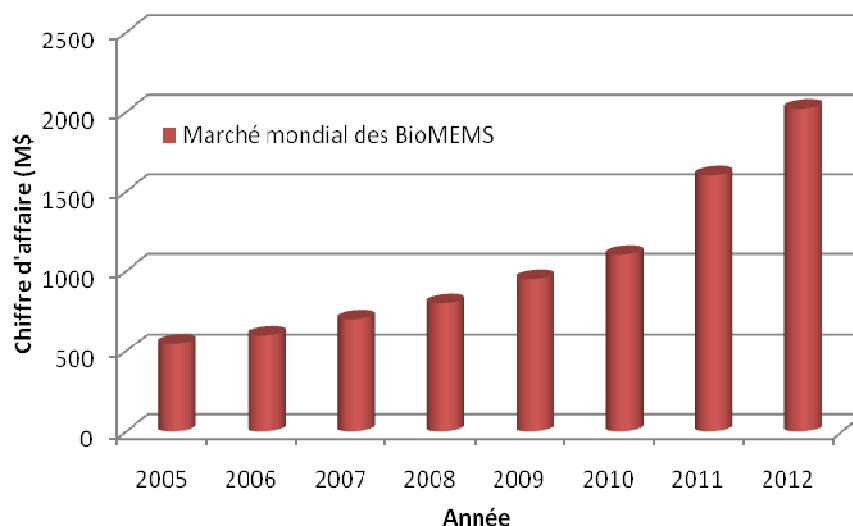


Figure 3. Evolution et perspectives du marché mondial des BioMEMS depuis l'année 2005 [7].

L'enjeu actuel pour ces entreprises et les groupes de recherche académiques est de maîtriser certains aspects de ce domaine, tels que la communication sans fil avec les micro/nanodispositifs (contrôle à distance, réception des résultats d'analyse), l'autonomie énergétique et l'alimentation en énergie de ces dispositifs, notamment grâce aux nouveaux travaux sur la transmission d'énergie sans fil (*Wireless energy transfer*»), l'adaptation des processus à l'échelle industrielle (production de masse) afin de s'affranchir des étapes manuelles qui pénalisent le coût de production, et enfin l'évolution vers des mesures sensibles en temps réel sur une grande variété d'objets biologiques.

Ces deux derniers points, à savoir la production de masse et les mesures dynamiques représentent les principales motivations de ce travail de thèse. Pour y répondre, deux approches ont été parallèlement adoptées: la première est l'investigation de la dernière partie du spectre électromagnétique encore sous exploitée, en l'occurrence le domaine TeraHertz, pour tenter d'appréhender les entités biologiques à travers des phénomènes jusque là inaccessibles. La seconde approche vise à développer de nouveaux matériaux et processus pour la fabrication et la fonctionnalisation en utilisant la très prometteuse technologie des plasmas froids. Ces deux approches seront détaillées ci-dessous.

1.2 Les TeraHertz comme outil d'analyse

Le rayonnement TeraHertz, spécialement appelé «rayons T» dans le domaine de l'imagerie, ou encore l'infrarouge lointain, occupe une région du spectre électromagnétique allant de 0,1 à 10 THz, incluant les longueurs d'ondes millimétriques (30–300 GHz) et submillimétriques (300 GHz à 3 THz) [8]. La localisation des THz entre le domaine électronique et le domaine optique (Figure 4) permet l'utilisation soit d'outils électroniques (oscillateurs électroniques), que nous utiliserons, soit d'outils optiques (les lasers) ou même un mariage des deux pour la génération et la détection de cette gamme de fréquences. Cette dernière a été pendant longtemps sous-exploitée d'où l'appellation «THz gap». Depuis environ 5 ans, cette situation a largement changé. Les THz sont de plus en plus utilisés grâce à l'énorme travail réalisé sur les sources et les détecteurs, ainsi que la disponibilité commerciale de spectromètres THz de plus en plus adaptés aux différents besoins d'analyse.

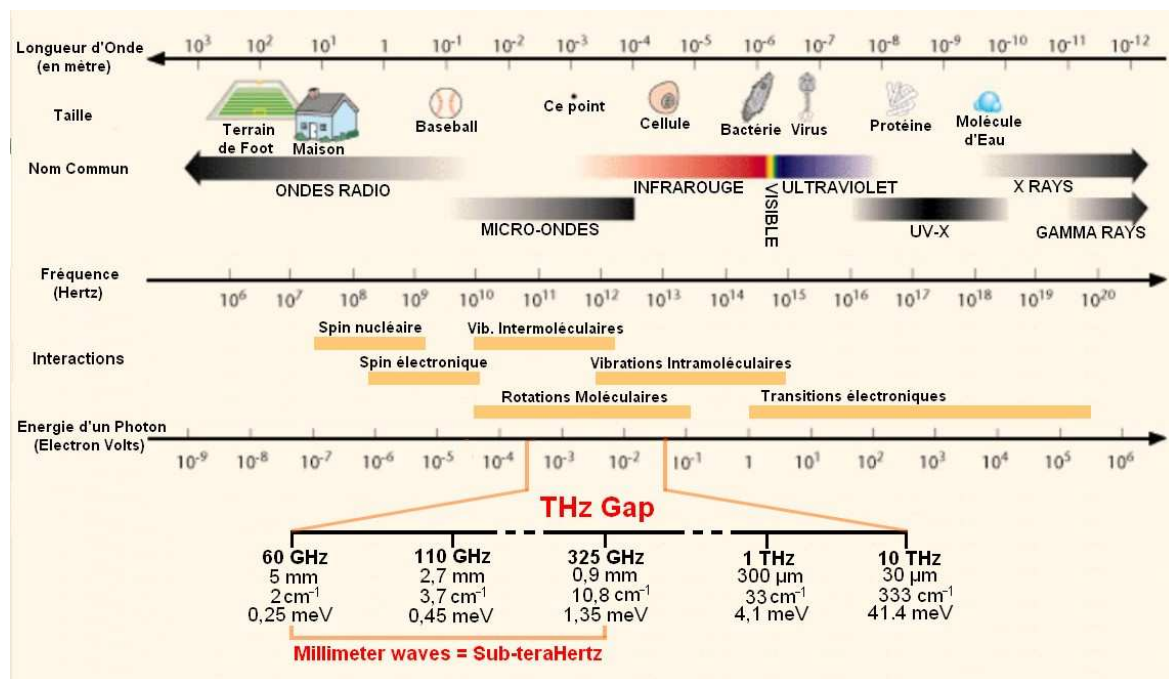


Figure 4. Le spectre électromagnétique et l'emplacement du champ TeraHertz.

Plusieurs études ont démontré l'intérêt des THz pour la biologie: imagerie *ex vivo* de tissus cancéreux [9, 10], analyse histopathologique *in vivo* [11], étude des complexes ADN-protéines, ADN-molécules [12], de l'ADN hybridé, hydraté ou dénaturé [12, 13], détection de gaz [14], et étude des acides aminés [15]. La spectroscopie THz a permis également l'étude de l'interaction entre biomolécules (formation du complexe biotine-avidine) [16]. L'application des THz au monde du vivant s'est développée au cours de cette dernière décennie. Bien que la recherche académique semble enregistrer une évolution timide suivie d'une stagnation (Figure 5), l'intérêt de l'industrie évolue quant à lui trois fois plus vite avec une orientation vers la brevetabilité plutôt que vers la publication, révélant la course vers la maîtrise de ce marché.

L'intérêt porté aux THz s'explique par les caractéristiques même de cette bande de fréquences. Le champ THz présente plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes spectroscopiques et d'imagerie, parmi lesquels on peut citer:

- ✓ Contrairement à certains rayons énergétiques (ex. rayons X), les radiations THz sont non ionisantes: l'énergie des photons de cette région du spectre est de 0,3 à 42 meV (Figure 4). La plus basse énergie qui peut ioniser la molécule d'eau est de 33 eV (8000 THz) et la plus basse énergie qui peut ioniser n'importe quelle molécule est d'environ

10 eV (2400 THz). De ce fait, une exposition aux radiations de quelques THz ne cause pas de dommages à l'ADN et n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire [17].

- ✓ Les THz interagissent fortement avec les substances polaires. Plusieurs radicaux et molécules réactives ont donc une activité spectrale dans le domaine THz (OH, CH, CO, HCO, NO, NO₂, N₂O, H, O, H₂O, C, N₂, O₂, O₃, HCl, SO₂, CH₃CN). Cette activité est même constituée de plusieurs pics par molécule [8].
- ✓ Les constituants biologiques (tissus, molécules, cellules) ont des signatures distinctes dans ce domaine de fréquences. Les THz peuvent également interagir à un certain niveau avec les structures cellulaires, principalement les membranes et les organites. Cet aspect sera plus amplement discuté dans le chapitre 4.
- ✓ Vu la taille des protéines (1–10 nm), leur structure et leur moment dipolaire, celles-ci réagissent aux THz principalement par des transitions rotationnelles, alors que les transitions vibrationnelles et de polarisation électronique concernent plutôt des fréquences plus élevées (infrarouge, visible, ultraviolet) [18]. La possibilité d'étudier les modes conformationnels des biomolécules et la dynamique structurale des protéines a été démontrée sur des substances déshydratées [19].
- ✓ En terme d'intensité, le rapport signal/bruit peut dépasser 10⁴ [8].
- ✓ Les rayons T peuvent pénétrer le corps humain jusqu'à quelques millimètres, rendant ainsi possible la détection de certains types de cancer, principalement ceux de la peau [11], mais également certaines anomalies dentaires. L'analyse THz dans le domaine biomédical est essentiellement basée sur la sensibilité des THz à la composition en eau des objets en question.
- ✓ Plusieurs matériaux opaques, tels que les emballages, le bois, les céramiques et les vêtements, sont transparents aux THz, alors que les métaux et les corps vivants composés principalement d'eau absorbent beaucoup et d'une manière différente ces radiations. Ces propriétés sont à la base des applications dans le domaine sécuritaire, déjà en usage dans certains grands aéroports, grâce à des caméras THz (0,1-0,2 THz) mises au point entre autre par la société ThruVision.
- ✓ Les images formées avec les radiations THz peuvent relativement avoir une bonne résolution (<1 mm). Aussi, beaucoup de matériaux ont une signature spectrale spécifique dans le domaine THz ce qui permettrait leur identification. Plusieurs exemples ont été démontrés tels que les différents types d'explosifs, les formes polymorphiques de plusieurs produits pharmaceutiques, ainsi que des substances narcotiques.

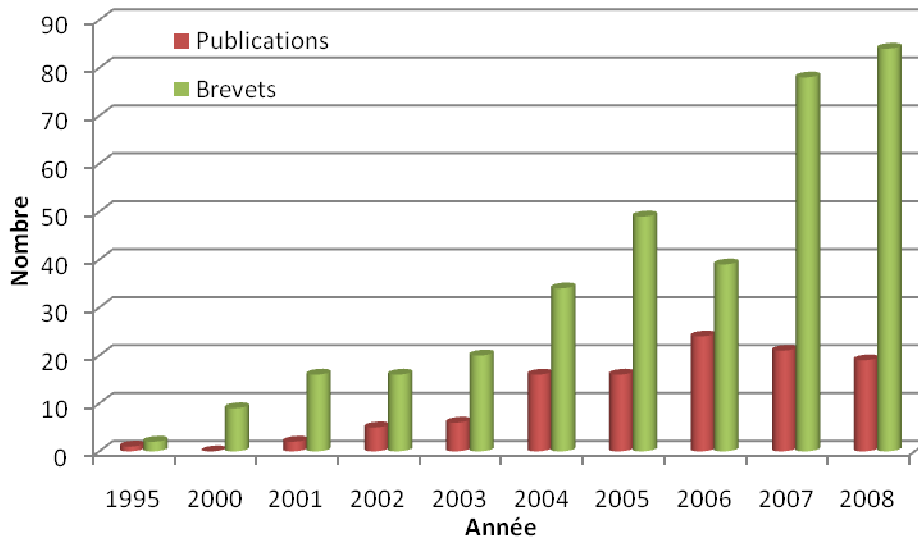


Figure 5. Evolution de la production scientifique (publications, brevets) concernant l'utilisation des THz pour les sciences de la vie, depuis l'année 1995. Le graphique a été réalisé par l'interrogation des bases de données SCOPUS et Science Direct, en recherchant les termes: *Terahertz OR THz OR sub-TeraHertz OR millimeterwaves AND bio*, dans *title OR abstract OR key words*.

1.3 Les plasmas froids comme outil d'ingénierie de surface

Les états communément connus de la matière sont les états solide, liquide, et gazeux. La transformation respective d'un état vers un autre est obtenue par un apport externe d'énergie. Un apport supplémentaire d'énergie à l'état gazeux aboutit à l'ionisation, i.e. détachement d'électrons de certains atomes ou molécules composant le gaz, formant ainsi un quatrième état de la matière appelé plasma. Ce dernier est donc un mélange d'atomes neutres, de molécules, d'ions, et d'électrons. Les charges électriques libres (ions et électrons) rendent le plasma électriquement conducteur (parfois plus que l'or et le cuivre), chimiquement très réactif, et hautement sensible aux champs électromagnétiques. Le plasma est aussi un gaz ionisé électriquement neutre, où la densité des électrons libres est rééquilibrée par celle des ions positifs. Le terme «plasma» a été pour la première fois utilisé par Irving Langmuir en 1928, en référence justement à la composition hétérogène et l'interactivité du plasma sanguin [20].

Les plasmas présentent des caractéristiques physico-chimiques particulières qui les rendent très avantageux par rapport aux technologies chimiques conventionnelles: la température de certains composants du plasma peut varier de la température ambiante à celle qui prévaut sur la surface du soleil rendant ainsi possible une large gamme de réactions chimiques; les plasmas peuvent également produire de grandes concentrations d'espèces énergétiques et chimiquement actives (états excités, photons de différentes longueurs d'ondes de l'infrarouge à l'ultraviolet), ce qui accélère les réactions et améliore significativement le rendement; en outre, ils sont capables d'interagir avec les champs électrique et magnétique, ce qui permet leur confinement et le contrôle des différents paramètres opérationnels du plasma par une simple injection d'énergie électromagnétique. Leurs applications touchent des domaines aussi différents que la microfabrication en électronique, le dépôt de revêtements protecteurs pour l'industrie automobile, aéronautique ou textile, la conversion d'énergie, la production d'hydrogène et d'ozone, le traitement de polymères, la stérilisation d'eau et d'outil médicaux, les lampes à néons, la dépollution de l'air et les télévisions plasmas. En plus de leur importance et de leurs rôles dans l'industrie moderne et la vie courante, les plasmas formeraient plus de 99 % de la matière visible de l'univers.

Les plasmas peuvent être générés dans un gaz par un apport d'énergie mécanique, thermique, chimique (réactions exothermiques), nucléaire ou électromagnétique (décharges DC, RF, MW, laser), ou par la combinaison de certains de ces éléments. Ils peuvent être essentiellement classés en deux grandes catégories: les plasmas thermiques (proche de l'équilibre thermique) et les plasmas non thermiques, également appelés plasmas hors équilibre ou encore plasma froids (Tableau I). La température d'un plasma est déterminée par les énergies moyennes des particules neutres et chargées qui le composent et leur degré de liberté (translationnelle, rotationnelle, vibrationnelle, et d'excitation électronique). La majorité des plasmas utilisés ont des températures d'électrons comprises entre 1 et 20 eV, avec des densités d'électrons de 10^6 – 10^{18} cm⁻³. (Les grandes températures sont conventionnellement exprimées en électron-Volt; 1 eV $\approx$ 11600 K). Le degré d'ionisation (i.e., rapport de la densité des espèces chargées à celles des espèces neutres) est quant à lui de 10^{-7} – 10^{-4} [21, 22].

Tout comme l'application des THz pour la biologie, l'application de plasmas froids pour les bio-microtechnologies s'est également développée au cours de la dernière décennie. Une autre similitude concerne la brevetabilité importante dans ce domaine, qui évolue 4 fois plus

vite que le nombre de publications (Figure 6). Dans ce travail, nous allons traiter essentiellement de l'utilisation des plasmas froids pour le dépôt de films minces organiques ou organosiliciés (polymérisation plasma) à des fins de traitement et d'ingénierie de surface. Cet aspect sera plus amplement détaillé dans le chapitre 2. Les plasmas froids sont généralement générés soit en basse pression (0,01–10 Torr), ou à basse puissance, ou encore avec des systèmes de décharge pulsées. Dans plusieurs cas, la température des électrons est d'environ 1 eV, alors que la température du gaz avoisine la température ambiante. Ces caractéristiques donnent aux plasmas froids des avantages uniques par rapport aux techniques classiques de modification de surface en milieu liquide ou vapeur [23]. Parmi ces avantages on peut citer :

- ✓ Modification chimique de la surface, sans affecter les propriétés intrinsèques du matériau traité et sans modifier son aspect de surface.
- ✓ Formation de polymères à partir de presque tous les composants organiques ou organosiliciés, contrairement à la polymérisation conventionnelle qui exige des monomères spécifiques.
- ✓ Utilisation de faible quantité de matière et sans recours à des catalyseurs chimiques dangereux, toxiques ou polluants.
- ✓ Développement d'une chimie de surface très spécifique, contrôlée par le choix des gaz de traitement et leurs mélanges.
- ✓ Traitement des surfaces de composition chimique hétérogène et de formes variées.
- ✓ Meilleure maîtrise du dépôt à l'échelle du nanomètre (épaisseur, fonctionnalité,...) par un simple réglage des paramètres physiques (pression, puissance, flux des gaz).
- ✓ Adaptation plus facile à l'échelle industrielle en utilisant un traitement de surface en défilé à grande vitesse, par des plasmas à pression atmosphérique.

Tableau I. Caractéristiques des plasmas thermiques et non thermiques (froids).

Paramètres	Plasma thermiques	Plasmas froids
Température	T_e tends vers T_0	$T_e > T_v > T_r \approx T_i \approx T_0$
Electrons	Haute (1-4 eV)	11000-23000 K (1-2 eV)
Ions et Particules neutres	Proche de T_e	Basse Ions: 300-600K (0,02-0,05 eV) P. neutres: 300-600 K
Degré d'ionisation	$> 10^{-4}$ (Proche de 100 %)	10^{-4} - 10^{-6}
Exemples	Arcs électriques, Jets plasmas, Thermonucléaire (Tokamaks)	Plasma RF basse pression, Plasma DC basse pression, Décharge corona
Pression	$\geq 10^5$ Pa	10^{-2} - 10^3 Pa

T_e : température des électrons, T_v : température d'excitation vibrationnelle des molécules, T_0 : température du gaz, T_i : température des ions, T_r : Degré de liberté des mouvements rotationnels des molécules.

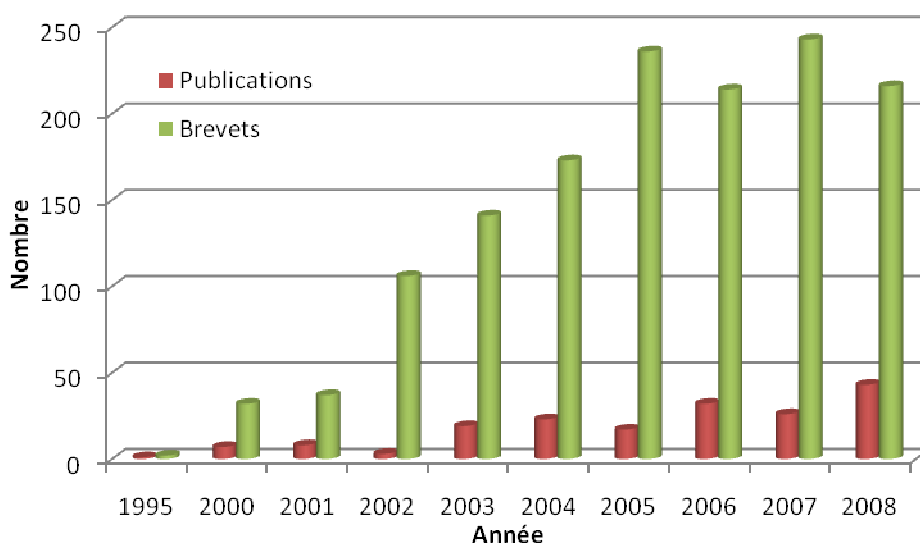


Figure 6. Evolution de la production scientifique (publications, brevets) concernant l'utilisation du plasma froid en micro et nanotechnologie, depuis l'année 1995. Le graphique a été réalisé par l'interrogation des bases de données SCOPUS et Science Direct, en recherchant les termes: *cold plasma* OR *non thermal plasma* AND *BioMEMS* OR *microtechnology*, *microfabrication*, *nanotechnology*, *biosensors*, *fonctionnalization* OR *lab on chip* OR *micro total analysis system*, dans *title* OR *abstract* OR *key words*.

1.4 Concept de la thèse

La recherche et le développement dans le domaine des BioMEMS sont hautement interdisciplinaires, avec des aspects très variés, exigeant ainsi un savoir et une maîtrise de disciplines aussi différentes que la physique, la microfluidique, la microélectronique, les sciences des matériaux, la chimie de surface, la biologie moléculaire et cellulaire, et la médecine.

Ce travail s'inscrit dans ce cadre précis, visant à développer un BioMEMS pour l'analyse biologique en utilisant le champ THz. Les premières analyses biologiques ont déjà été réalisées sur des tissus [24], des cellules et des biomolécules [25, 26]. L'un des enjeux de ce travail et d'aboutir à une mesure dynamique, en temps réel et à l'échelle microscopique d'une réaction enzymatique. Pour permettre un tel objectif, un développement préalable est nécessaire concernant le traitement et modification de surface, l'immobilisation des biocatalyseurs, et l'analyse de l'activité biocatalytique. Viendra ensuite la réalisation du BioMEMS et les mesures THz.

Après l'introduction générale (chapitre 1) où nous avons décrit le principe, l'historique, l'état de l'art et les enjeux socio-économiques des principaux axes d'investigation de cette thèse (BioMEMS, plasmas froids, spectroscopie THz), nous décrirons dans le chapitre 2 tous les concepts, les outils et les méthodes expérimentales employés dans ce travail. Nous décrirons les deux procédés plasmas utilisés (décharge radiofréquence, post-décharge microonde), le principe de fonctionnement des instruments employés, mais aussi les motivations des choix effectués sur les différents procédés. La suite de ce rapport de thèse décrit les procédés que nous avons développé et les résultats obtenus. Elle s'organise en 4 chapitres, suivant les grandes étapes chronologiques du travail de recherche. Chaque chapitre est composé d'un article déjà publié ainsi que d'autres sections rapportant des résultats et des discussions supplémentaires.

La première étape, décrite dans le chapitre 3, concerne le développement d'un procédé de fonctionnalisation de surface par une polymérisation plasma d'allylamine. Une optimisation des paramètres plasma et une caractérisation approfondie du film déposé y ont été présentés. Le chapitre 4 décrit la seconde étape, qui consiste à utiliser le polymère plasma déposé pour l'immobilisation de la trypsine, notre enzyme modèle. Dans ce chapitre, nous aborderons

particulièrement la caractérisation de l'interface polymère-enzyme à l'échelle nanométrique et la détermination des effets de l'immobilisation sur les paramètres cinétiques biocatalytiques.

Les deux procédés optimisés, i.e. le dépôt d'un polymère plasma fonctionnel et la méthode d'immobilisation d'enzymes, ont été employés pour la bio-fonctionnalisation d'un BioMEMS THz préalablement conçu au laboratoire IEMN. L'adaptation de ces procédés au processus de microfabrication du BioMEMS, le test de faisabilité d'une mesure de la biocatalyse par ce microdispositif, ainsi que l'analyse des résultats obtenus sont décrits dans le chapitre 5. Les perspectives de la spectroscopie THz en biologie y sont également discutées.

Enfin, dans le cadre des perspectives des applications du plasma froid en bio-microtechnologies, le chapitre 6 rapporte la première utilisation de la polymérisation plasma comme méthode de fabrication de microcanaux et plus généralement des circuits microfluidiques pour les BioMEMS. Ce chapitre présente aussi les avantages de cette technique, les enjeux et les perspectives dans ce domaine d'applications.

La partie technologique de ce travail de thèse a été réalisée à l'IEMN en s'appuyant en partie sur l'expertise et le travail préalable du groupe de recherche M²T⁽¹⁾ concernant la réalisation de lignes de transmission THz (lignes coplanaires et lignes de Goubau), et leur intégration dans des microsystèmes microfluidiques en vue de leur utilisation comme biocapteurs [27-29]. La fonctionnalisation de surface a été développée au laboratoire GéPIFRéM⁽²⁾ qui conçoit des réacteurs et développe des procédés permettant le traitement de surface par plasma froid et le dépôt de films minces par polymérisation plasma. La maîtrise d'une méthode d'immobilisation de la trypsine à la surface du polymère a été conduite au sein du laboratoire ProBioGEM⁽³⁾, spécialisé dans le génie enzymatique et microbien.

Cette thèse et ses résultats sont donc le fruit d'une collaboration étroite entre les trois laboratoires sus-cités, avec des développements spécifiques à chaque discipline, mais qui au final ont convergé pour la réalisation d'un bioMEMS THz fonctionnel dédié à l'analyse de la biocatalyse.

⁽¹⁾ Microsystèmes microfluidiques et THz, (<http://m2t.iemn.univ-lille1.fr/>).

⁽²⁾ Laboratoire de génie des procédés d'interaction fluides réactifs-matériaux, (<http://www.univ-lille1.fr/gepifrem/>).

⁽³⁾ Laboratoire des procédés biologiques, génie enzymatique et microbien, (<http://www.univ-lille1.fr/cgi-bin/probiogem/mesPages/Objectif.php>).

Références

- [1] Zhang Y., Ozdemir P., “Microfluidic DNA amplification: a review”, *Anal. Chim. Acta*, **638**, 2009, 115-125.
- [2] Bashir R., “BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 2004, 1565-1586.
- [3] Andersson H., Van den Berg A., “Microfluidic devices for cellomics: a review”, *Sens. Actuators B: Chemical*, **92**, 2003, 315-325.
- [4] Ioanna G., Jurgen K., Cornie S., “BioMEMS in Diagnostics: Review and Recent Developments”, *Recent Patents Eng.*, **2**, 2008, 114-121.
- [5] Feng X., Du W., Luo Q., Liu B.-F., “Microfluidic chip: Next-generation platform for systems biology”, *Anal. Chim. Acta*, in press, doi:10.1016/j.aca.2009.04.051.
- [6] “Microbiotechnology: Seizing New Opportunities in a Complex Market”, rapport de Drug & Market Development Publications, cité par *WTEC Panel Report* dans “International research and development in biosensing”, World Technology Evaluation Center (WTEC) Inc. Août 2004.
- [7] “BioMEMS 2008-2012: *How Microsystems and Semiconductor Industries make money out of the Life Science market?* ”. Publié par Yole Développement, Mars 2008.
- [8] Dragoman D.M., “Terahertz fields and applications”, *Prog. Quantum Electron.*, **28**, 2004, 1-66.
- [9] Fitzgerald A. J., Wallace V. P., Mercedes J.-L., Bobrow L., Pye R. J., Purushotham A. D., Arnone D. D., “Terahertz Pulsed Imaging of Human Breast Tumors”, *Radiology*, **239**, 2006, 533-540.
- [10] Knobloch P., Schildknecht C., “Medical THz imaging: an investigation of histopathological samples”, *Phys. Med. Biol.*, **47**, 2002, 3875-3884.
- [11] Pickwell E., Cole B. E., Fitzgerald A. J., Pepper M., PWallace V., “In vivo study of human skin using pulsed terahertz radiation”, *Phys. Med. Biol.*, **49**, 2004, 1595-1607.
- [12] Nagel M., Richter F., Kurz H., “A functionalized THz sensor for marker-free DNA analysis”, *Phys. Med. Biol.*, **48**, 2003, 3625-3636.

- [13] Markelz A.G., Heilweil E.J., “Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz”, *Chem. Phys. Lett.*, **320**, 2000, 42-48.
- [14] Drouin B.J. et Maiwal F.W., “Extended THz measurements of nitrous oxide, N₂O”, *J. Mol. Spectrosc.*, **236**, 2006, 150-152.
- [15] Nagai N., Kumazawa R., Fukasawa R., “Direct evidence of inter-molecular vibrations by THz spectroscopy”, *Chem. Phys. Lett.*, **413**, 2005, 495-500.
- [16] Menikh A., “Label-free amplified bioaffinity detection using terahertz wave technology”. *Biosens. and Bioelectron.*, **20**, 2004, 658-662.
- [17] Doria A., “THz radiation studies on biological systems at the ENEA FEL facility”, *Infrared Phys. Tech.*, **45**, 2004, 339-347.
- [18] Smye S.W., Chamberlain J.M., Fitzgerald A., Berry E. “The interaction between TeraHertz radiation and biological tissue”, *Phys. Med. Biol.*, **46**, 2001, 101-112.
- [19] Markelz AG, Whitmire S, Hillebrecht J et Birge R., “THz time domain spectroscopy of biomolecular conformational modes”, *Phys. Med. Biol.*, **47**, 2002, 3797-3805.
- [20] Langmuir I. “Oscillations in ionized gaz”, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **14**, 1928, 627-637.
- [21] Denes F. S., Manolache S., “Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science”, *Prog. Polym. Sci.* **29**, 2004, 815-885.
- [22] Fridman A., “Plasma Chemistry”, Cambridge University Press, 2008, New York, USA. 1024 pages.
- [23] Chu P.K., Chen J.Y., Wang L.P., Huang N., “Plasma-surface modification of biomaterials”, *Mat. Sci. Eng.: R: Reports*, **36**, 2002, 143-206.
- [24] Abbas A., Dargent T., Croix D., Salzet M., Bocquet B., “Ex-vivo detection of neural events using THz BioMEMS”, *Med. Sci. Monitor*, **15**, 2009, MT121-125.
- [25] Treizebré A., Bocquet B., “Nanometric metal wire as a guide for THz investigation of living cells”, *Int. J. Nanotechnology*, **5**, 2008, 784-795.
- [26] Treizebré A., Bocquet B., Legrand D., Mazurier J., “Cell investigation by THz BioMEMS”, *Proc. of the 28th IEEE Engineering in Medecine and Biology Conf.*, 2006, 29 august-3 sept., pp 3509-3512, New York (USA).
- [27] Treizebre A., Akalin T., Bocquet B., “Planar excitation of Goubau Transmission Lines for THz BioMEMS”, *IEEE Microwave Wireless Compon. Lett.*, **15**, 2005, 886-888.

- [28] Mille V., Bourzgui N.E., Vivien C., Supiot P. , Bocquet B. , “ppTMDS as a new polymer technology for a high throughput BioMEMS design”, *J. Micromech. Microeng.*, **18**, 2008, 125026-125036.
- [29] Treizebré A., Bocquet B., Xu Y. and Bosisio R.G., “New THz excitation of Planar Goubau Line”, *Microw. Opt. Tech. Lett.*, **50**, 2008, 2998-3001.

Chapitre 2 _____

Principes et méthodes expérimentales

Chapitre 2

Principes et méthodes expérimentales

Ce chapitre décrit tout d'abord les procédés plasmas employés dans cette thèse, les principales réactions de polymérisation pour obtenir des films minces, ainsi que l'usage prévu pour chaque film polymère dans le cadre de la conception finale d'un Bio-MEMS. Il définit ensuite les outils et les méthodes analytiques utilisés, leurs principes de fonctionnement, et les motivations de chaque choix expérimental.

2.1 Dépôts de films minces par plasma

2.1.1 Polymérisation par plasma

D'une manière générale, la modification de surface par plasma couvre un large éventail de techniques, de procédés et de réacteurs. Le plasma peut servir à structurer la surface par gravure et à la modifier pour la rendre soit hydrophile par des fonctions oxygénées (O_2 , NO_2 , CO , CO_2 , NO) ou chlorées (CF_2Cl_2 , CCl_4), soit hydrophobes par des composés fluorés (SF_6 , CF_4 , C_2F_6). Il peut servir également à modifier la surface par un dépôt de films polymères, aussi appelé polymérisation plasma ou encore dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD; *Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition*). Ce dernier consiste à introduire un monomère (pratiquement n'importe lequel) dans un plasma réactif ou non, ce qui déclenchera un processus d'ionisation, fragmentation, réarrangement et de recombinaison, pour former un film polymère à la surface d'un substrat. Ce phénomène est classiquement décrit par trois étapes principales [1, 2]: l'initiation qui consiste en l'ionisation des molécules monomères (avec ou sans gaz de dilution) suite aux collisions avec les électrons accélérés par la décharge. Cette ionisation entraîne la formation de radicaux libres, d'atomes et d'ions qui, à leur tour, participent à l'ionisation et la dissociation du monomère. Deuxièmement, la propagation de la réaction aboutit à la formation de chaînes polymériques dans la phase

gazeuse et à la surface du substrat, par réarrangement et recombinaison des fragments moléculaires et des radicaux. Enfin, l'étape de terminaison suit des processus similaires à la propagation, mais finalise la réaction en aboutissant à un produit final chimiquement stable, i.e. un film polymère. Le degré de réticulation, la fonctionnalité et les caractéristiques physico-chimiques de ce film dépendent largement des paramètres opérationnels du plasma (pression «P», puissance «W», débit de gaz et de monomère « ϕ », type de monomère). Une grande partie de cette thèse est dédiée à ce dernier procédé et à ses applications dans le domaine des BioMEMS. Le dépôt de films polymères par plasma froid est réalisé ici pour deux objectifs distincts et avec deux procédés et réacteurs différents que nous allons détailler ci-dessous.

2.1.2 Polymérisation assistée par plasma de décharge radio-fréquence

La première application de la polymérisation plasma dans cette thèse est le développement d'un procédé de fonctionnalisation de surface pour l'immobilisation de biomolécules. La littérature scientifique dans ce domaine montre une utilisation fréquente de fonctions acide ($-\text{COOH}$), hydroxyle ($-\text{OH}$) et amines ($-\text{NH}_2$) [3]. Les amines représentent une très bonne approche grâce à leur présence dans la structure des protéines, notamment dans les acides aminés basiques (lysine, arginine), mais aussi leur interaction spontanée avec certains agents espaceurs tels que le glutaraldehyde. Pour déposer un polymère riche en amines primaires, le monomère d'allylamine ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$) a été choisi comme précurseur. Ce dernier semble présenter un meilleur rendement et une plus grande densité de fonctions que beaucoup d'autres composés [4]. La polymérisation a été réalisée dans un réacteur plasma initié dans l'argon par décharge radiofréquence (13,56 MHz) à couplage capacitif (Figure 7). Ce type de décharge présente souvent un faible degré d'ionisation ($<10^{-4}$ à quelques Torr) et les collisions électron-particules neutres sont prédominantes. Il offre également l'avantage de produire des plasmas spatialement uniforme à des basses pressions [5, 6].

La polymérisation de l'allylamine passe par les trois étapes décrites précédemment. Le monomère est d'abord ionisé puis fragmenté pour former des radicaux (Figure 8). Ces derniers se recombinent pour former un revêtement réticulé qui exposera différentes fonctions amines à sa surface. Une analyse plus détaillée sur les caractéristiques du film obtenu et l'influence des différents paramètres plasma sur ce film sera apportée au chapitre 3. L'objectif

étant de réussir à déposer un revêtement de polymère plasma d'allylamine (ppAA) qui présente une densité suffisante de fonctions amines primaires, une bonne stabilité en milieu aqueux et avec une vitesse de dépôt relativement importante.

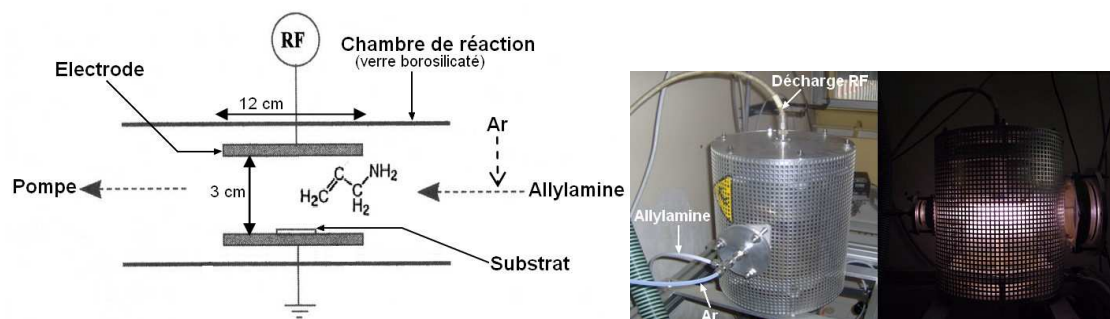


Figure 7. Principe de fonctionnement et photos du réacteur plasma à décharge RF (rfGD).

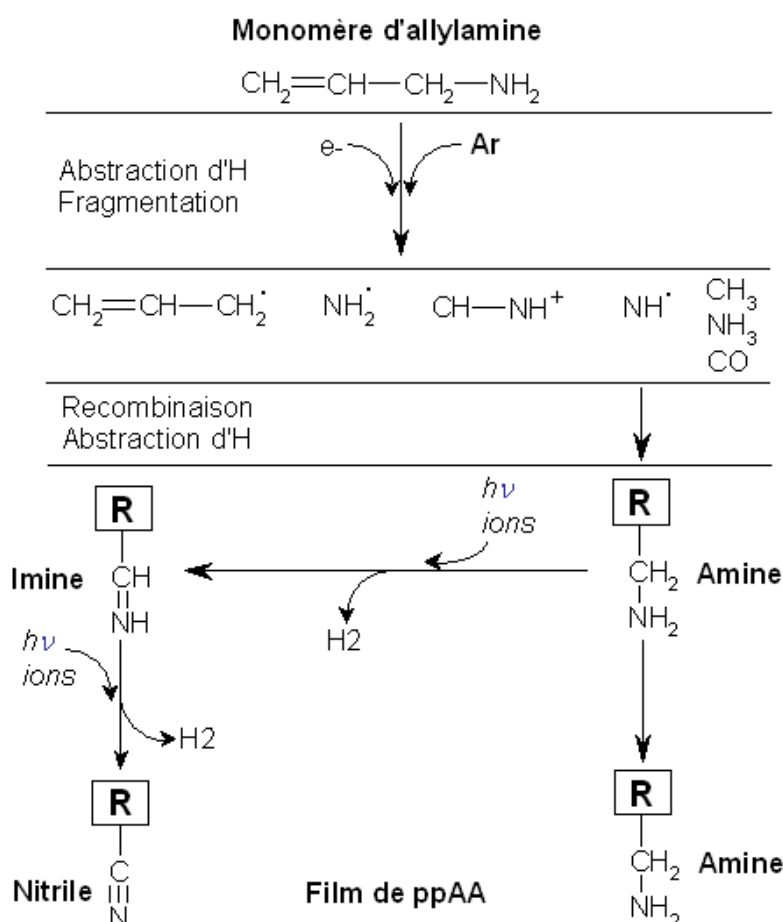


Figure 8. Schéma simplifié du mécanisme de polymérisation plasma d'allylamine en décharge RF et en présence d'argon (Ar), R: radical.

2.1.3 Polymérisation assistée par plasma micro-onde en post-décharge

Durant ces cinq dernières années, l'utilisation du plasma froid en microélectronique et en microbiotechnologie s'est limitée au dépôt de films minces pour la protection des dispositifs électroniques ou la fonctionnalisation de surface notamment pour les BioMEMS [7, 8, 9]. La seconde utilisation du plasma froid dans cette thèse consiste justement en une nouvelle application. En effet, dans le chapitre 6, nous décrivons la première utilisation de la polymérisation plasma comme outil de microfabrication des BioMEMS, ce qui représente un pas en avant vers l'industrialisation des étapes de fabrication. Le monomère choisi pour atteindre cet objectif est le 1,1,3,3-TetraMethylDiSiloxane (TMDS) $[H(CH_3)_2SiOSi(CH_3)_2H]$. C'est un organosilicié qui présente une bonne biocompatibilité grâce à sa partie organique (hydrocarbones), et une bonne résistance thermique et mécanique grâce aux atomes de silicium. Sa polymérisation est réalisée en présence d'azote et d'oxygène dans un réacteur plasma en post-décharge (Figure 9). L'épaisseur des dépôts du polymère plasma de TMDS (ppTMDS) est mesurée par interférométrie laser [10].

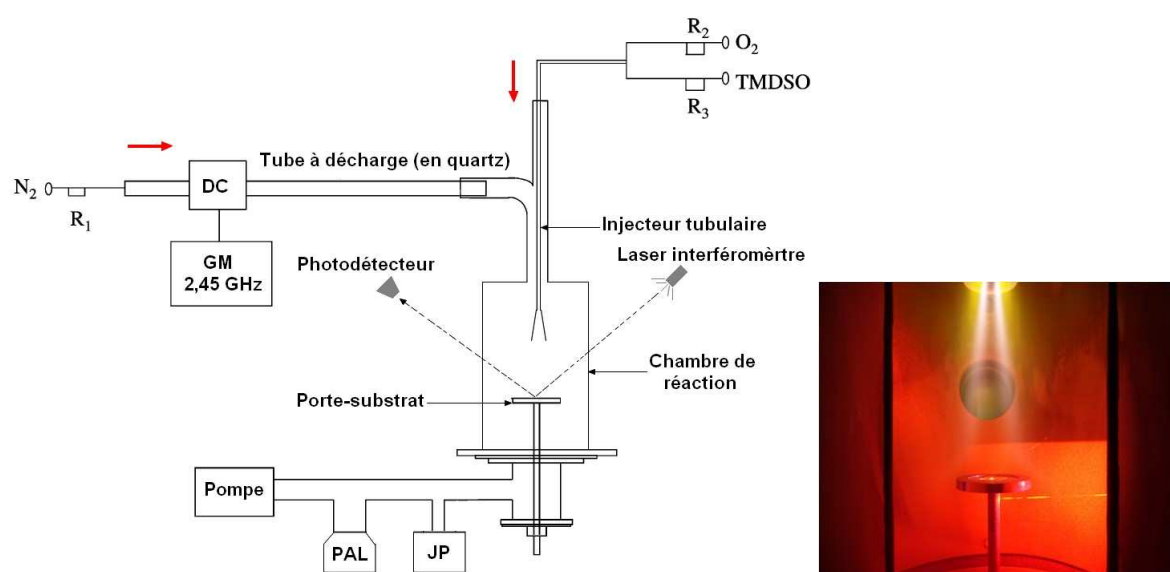


Figure 9. Réacteur RPECVD pour le dépôt de ppTMDS. R: régulateur de débit massique; JP: jauge de pression; GM: générateur micro-onde; PAL: piège à azote liquide; DC: dispositif de couplage. L'image à droite montre la chambre de réaction (post-décharge) pendant la polymérisation plasma.

Le procédé de dépôt débute par le déclenchement d'une décharge micro-onde (2,45 GHz) dans l'azote en écoulement. Ce dernier présente le long du tube de réaction des zones aux propriétés distinctes (Figure 10). Nous pouvons distinguer une zone de décharge, où le plasma est caractérisé par une très forte luminosité et de hautes températures du gaz (700-1000 K), ainsi que des concentrations très élevées d'espèces excitées; une zone d'ionisation secondaire (IS) riche en particules chargées issues d'une ré-ionisation du gaz, séparée de la décharge par un espace sombre de transition (ET); puis une zone de Post-Décharge Lointaine (PDL) formée principalement d'espèces neutres. Cette région de couleur jaunâtre dans l'azote pur, devient bleue après l'injection de l'oxygène et la formation de l'oxyde nitrique (NO) lorsque les concentrations en azote et en oxygène sont de même ordre.

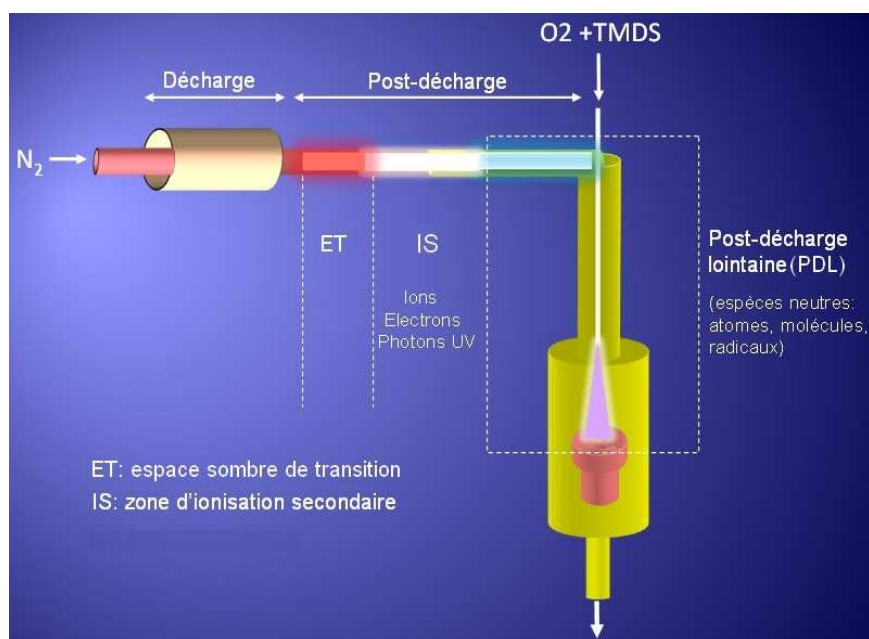


Figure 10. Différentes régions plasma du réacteur RPECVD.

Du point de vue du traitement de surface, cette dernière zone (PDL) est particulièrement intéressante pour deux raisons: la première est l'absence de bombardement ionique qui attaque la surface, et la deuxième est le travail à température ambiante qui rend possible une éventuelle utilisation *in situ* du matériel biologique.

La polymérisation du TMDS est initiée par une abstraction d'un atome d'hydrogène labile par un atome d'azote ou d'oxygène pour former un monoradical, suivi ou non par une seconde abstraction pour donner un diradical (Figure 11). Les radicaux obtenus subissent une fragmentation après collision avec des atomes d'azote. Le diméthylsilanone, très réactif, est probablement une espèce intermédiaire majeure de cette réaction. Les fragments se

réarrangent ensuite et se recombinent pour former un film de ppTMDS à la surface du substrat. Le film ainsi obtenu est principalement composé de siloxanes. Dans certains cas, lorsque $\phi_{\text{TMDSO}} \geq \phi_{\text{O}_2}$, l'azote peut être faiblement incorporé dans le polymère par l'intermédiaire des radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$), pour donner des structures silazanes ($\equiv\text{Si}-\text{NH}-\text{Si}\equiv$) [11]. Vu sa structure riche en groupements $-\text{CH}_3$ et pauvre en fonctions polaires, le ppTMDS présente une surface hydrophobe.

Contrairement aux polymères de ppAA, la fonctionnalité de la surface du ppTMDS ne représente pas l'enjeu principal du dépôt. L'objectif est plutôt d'obtenir un film assez rigide, résistant aux solvants chimiques et pouvant former des couches de plusieurs dizaines voir des centaines de micromètres. L'optimisation des différents paramètres de dépôt a déjà fait l'objet de deux thèses précédentes [12, 13]. L'enjeu pour nous est d'affronter ce procédé aux contraintes des processus de microfabrication des BioMEMS en salle blanche, pour pouvoir remplacer certaines étapes manuelles par un simple dépôt plasma.

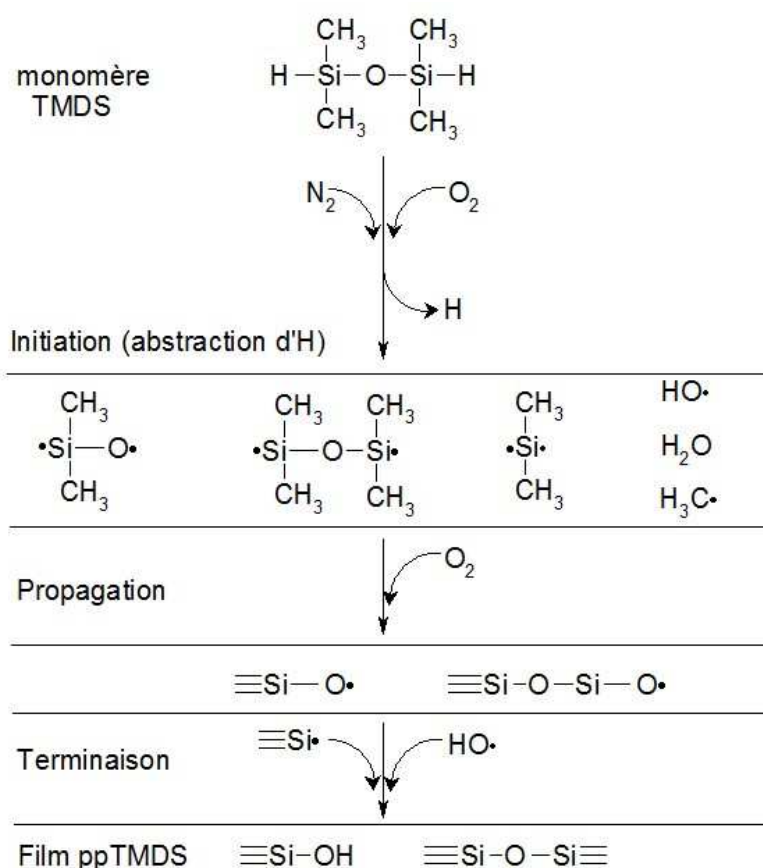


Figure 11. Mécanisme simplifié de polymérisation plasma de TMDS en RPECVD, en présence d'azote et d'oxygène.

2.2 Traitement de surface par plasma UV-ozone

Avant le dépôt de ppTMDS et de ppAA, la surface des différents supports ont subi un traitement par l'UV-ozoneur *UVO Cleaner* de la société *Jelight Co.Inc*. Ce dispositif peut être assimilé à un petit réacteur à plasma oxygène activé par un rayonnement UV (Figure 12). La réaction ne nécessite pas de vide, et a lieu à température ambiante. La température peut évidemment augmenter après une utilisation prolongée.



Figure 12. Photographie de l'UV-ozoneur (UVO Cleaner)

Le traitement UV/Ozone est initialement utilisé pour le nettoyage des surfaces contaminées par des composés organiques [14]. L'UV-ozoneur *UVO Cleaner* contient une lampe à vapeur de mercure qui génère du rayonnement UV de 185 nm et de 254 nm. L'oxygène atmosphérique dans la chambre de réaction absorbe le rayonnement UV à 185 nm et se dissocie pour former de l'oxygène atomique et de l'ozone. D'un autre côté, le rayonnement UV à 254 nm excite et/ou dissocie les molécules organiques et les rend ainsi plus réactives. La réaction de ces composés avec l'ozone et l'oxygène atomique aboutit à la formation de produits volatiles tels que le CO_2 et les vapeurs d'eau (Figure 13).

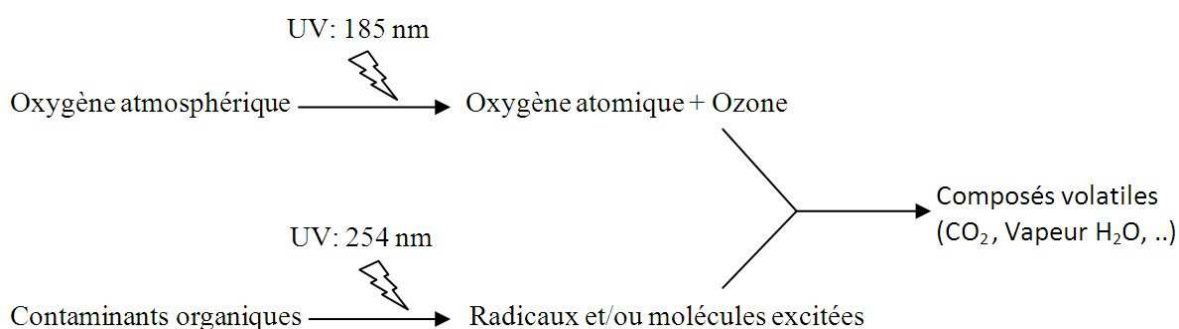


Figure 13. Schéma des différentes interactions induites par le plasma UV-ozone.

En plus du nettoyage, ces réactions augmentent l'énergie de surface et améliorent donc l'adhésion. Nos essais ont montré qu'un traitement de 20 min est suffisant pour atteindre un angle de contact inférieur à 10° (Figure 14), et induire l'apparition de fonctions oxygénées qui vont servir comme premiers sites d'accroche pour la polymérisation (Figure 15).

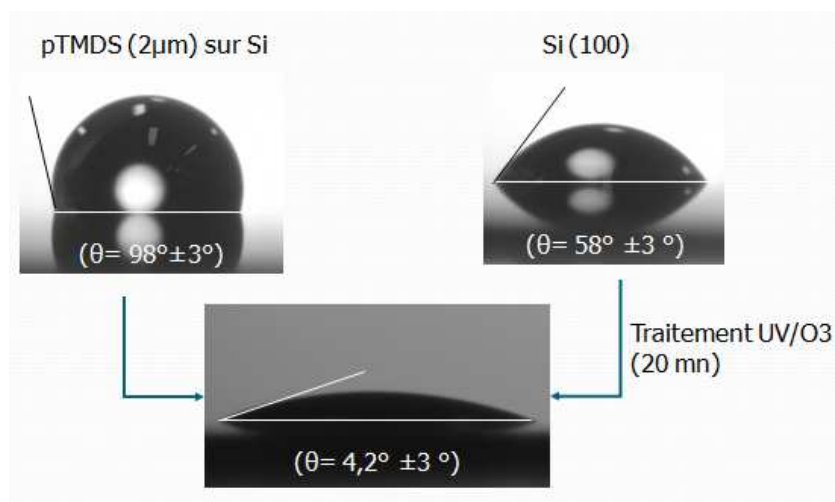


Figure 14. L'effet du traitement UV-ozone sur l'angle de contact du silicium et du ppTMDS.

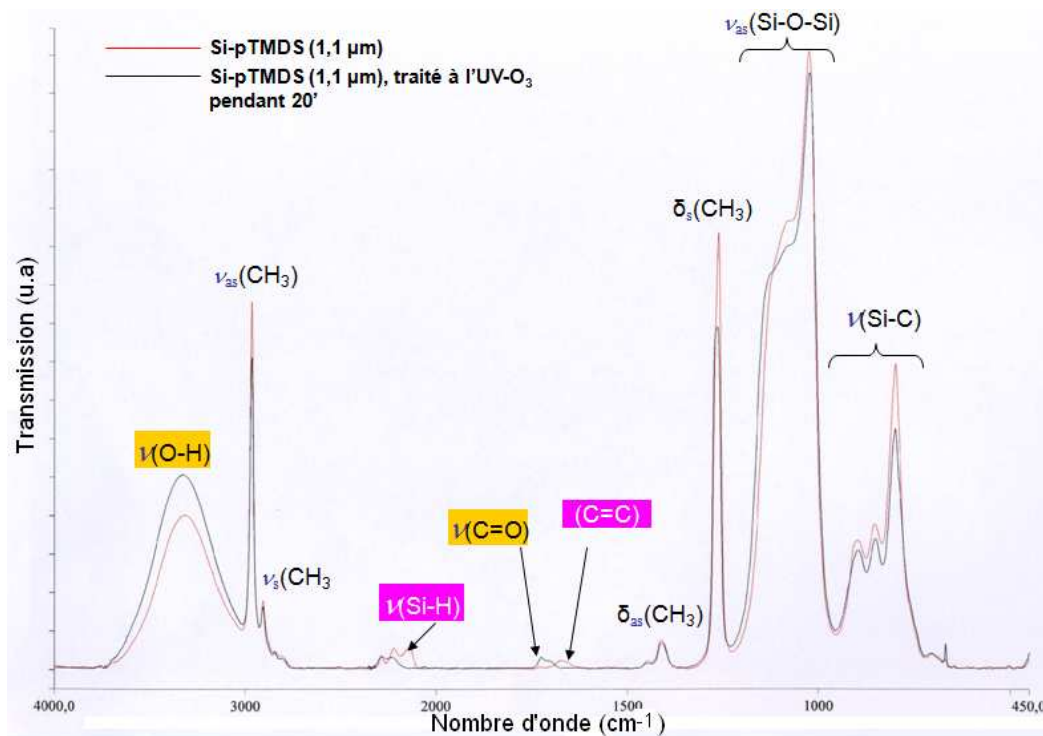


Figure 15. L'effet du traitement UV-ozone sur la composition chimique de la surface du ppTMDS.

2.3 Techniques de caractérisation de la surface et de la composition chimique

2.3.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La plupart des méthodes physiques d'analyse structurale des molécules organiques résultent d'une interaction de la matière avec les radiations électromagnétiques de différentes énergies. Selon cette énergie, l'effet sur les molécules est différent. En ce qui concerne l'infrarouge (IR) moyen (4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1}) ($2,5\text{ }\mu\text{m}$ – $25\text{ }\mu\text{m}$), l'énergie étant faible, les vibrations moléculaires peuvent être sondées.

La spectroscopie infrarouge exploite donc le fait que les molécules possèdent des fréquences spécifiques pour lesquelles elles tournent ou vibrent en correspondance avec des niveaux d'énergie discrets (modes vibratoires). Ces fréquences de résonance sont déterminées par la nature des deux atomes vibrants mais aussi par l'environnement électronique. Aussi chaque groupement fonctionnel aura-t-il des fréquences caractéristiques d'élongation et de déformation [15]. Des tables permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques présents. Les principaux modes de vibrations des molécules sont: l'étirement (*stretching*) symétrique ou antisymétrique, cisaillement (*scissoring*), basculement (*rocking*), agitation hors du plan (*wagging*) et torsion (*twisting*).

L'analyse des échantillons solides par le FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*) peut se faire selon trois techniques différentes:

- ✓ La méthode ATR (*Attenuated Total Reflexion*): Dans cette méthode, le faisceau est réfléchi dans un cristal rencontrant ainsi plusieurs fois l'échantillon à analyser, ce qui amplifie le rapport signal/bruit. Cependant, cette technique ne permet de travailler qu'entre 1000 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} , à cause de l'absorbance des cristaux utilisés pour la réflexion.
- ✓ Analyse en transmission: Dans ce type d'analyse, le faisceau infrarouge traverse l'échantillon déposé sur un substrat à deux faces polies et qui laisse passer le faisceau IR. Ce dernier est dirigé sur l'échantillon avec un angle précis (angle de Brewster pour certains modèles) ce qui permet de recueillir le spectre en transmission. Cela signifie

que certains substrats (Or, Al) ne peuvent pas être utilisés, et les échantillons de Si doivent avoir une épaisseur inférieure à 300 μm et un dopage faible (environ 100 $\Omega\cdot\text{cm}$).

- ✓ Réflexion spéculaire: Cette technique est la plus fréquemment utilisée, notamment pour ce travail de thèse. Elle permet une analyse dans un intervalle de fréquence plus large (400cm^{-1} - 4000 cm^{-1}). Le faisceau IR est ici envoyé en incidence rasante sur l'échantillon (environ 80° à la normale de la surface). Dans notre cas, on utilisera un spectromètre PerkinElmer, avec un angle d'incidence de 45° qui a montré de meilleurs résultats pour l'analyse de nos échantillons. L'aluminium sera utilisé comme substrat réfléchissant.

2.3.2 Angle de contact et énergies libres de surface

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact (θ). Il est généré par combinaison de la tension de surface d'un liquide et de l'énergie libre de surface du solide (Figure 16). La mesure de cet angle nous donne trois types d'informations:

- ✓ L'utilisation de l'eau pour mesurer l'angle de contact donne une information directe sur le caractère hydrophobe ($\theta > 90^\circ$, faible énergie de surface) ou hydrophile ($\theta < 90^\circ$, grande énergie de surface) de la surface. Le *mouillage total* est obtenu quand l'énergie libre de surface est égale ou supérieure à la tension de surface. Dans ce cas, l'angle de contact est voisin de zéro.
- ✓ L'utilisation de plusieurs liquides différents permet d'accéder à l'énergie libre de la surface avec ses différentes composantes chimiques.
- ✓ La mesure de l'hystérésis entre l'angle à l'avancée de la goutte et à son retrait nous renseigne sur la non homogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface.

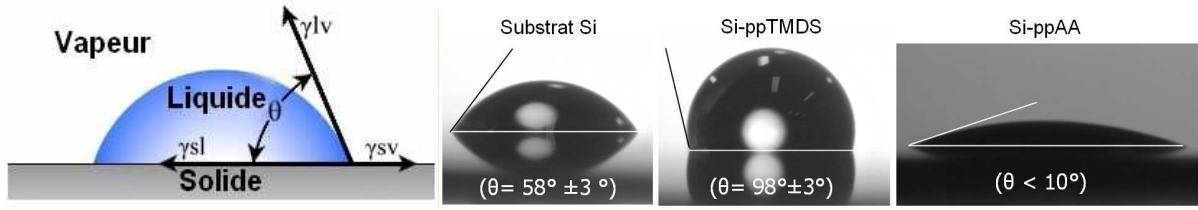


Figure 16. Schéma représentant les différentes forces intervenants dans l'angle de contact, et des images représentant de gauche à droite: l'angle de contact de l'eau sur le silicium (Si), le polymère plasma hydrophobe du TMDS (ppTMDS) et le polymère plasma hydrophile d'allylamine (ppAA).

La forme d'une goutte (angle θ) à la surface d'un solide est régit par l'équation de Young (1):

$$\gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos\theta - \gamma_{SV} = 0 \quad (1)$$

Où γ représente les tensions interfaciales solide-liquide (γ_{sl}), solide-vapeur (γ_{sv}) et liquide-vapeur (γ_{lv}). Etant donné que seules γ_{lv} et θ sont mesurables, il est nécessaire d'avoir recours à des modèles théoriques pour estimer les inconnues γ_{sl} et γ_{sv} . Plusieurs modèles sont disponibles. Nous ne décrivons cependant que les deux qui seront utilisés dans cette thèse:

- Modèle d'Owens et Wendt [16]: dans ce modèle, l'énergie de surface d'un solide s'exprime par l'équation (2):

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad (2)$$

Avec: γ_s^d la composante dispersive (interactions dipôle-dipôle), et γ_s^p la composante non-dispersive ou polaire. L'angle de contact est ainsi lié à ces deux composantes par l'équation (3):

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_s^d} \sqrt{\gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_s^p} \sqrt{\gamma_L^p} \quad (3)$$

Ce modèle nécessite l'utilisation de deux liquides différents pour obtenir l'énergie de surface.

- Modèle Good Van Oss [17]: Ce modèle permet de séparer la composante non dispersive ou polaire en composante acide γ_s^- et composante basique γ_s^+ . L'énergie de surface s'exprime alors par:

$$\gamma_s = \gamma_s^d + 2\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} \quad (4)$$

Et la relation entre l'angle de contact et les énergies de surface s'écrit :

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2\left(\sqrt{\gamma_s^d \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_L^+}\right) \quad (5)$$

Cette méthode nécessite l'utilisation de trois liquides différents dont les composantes dispersives et polaires sont connues pour obtenir l'énergie de surface du solide. Les trois liquides utilisés dans cette thèse sont l'eau, le glycérol et le diiodométhane. La mesure de l'angle de contact est réalisée ici grâce à un goniomètre GBX Digidrop (Figure 17), composé d'un support de substrat éclairé par une lampe, une caméra, un porte-seringue et un ordinateur équipé d'un logiciel pour numériser les images et calculer les différents paramètres.

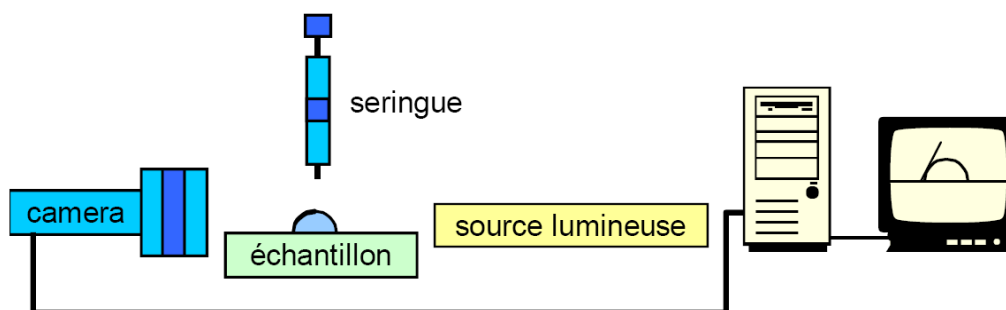


Figure 17. Schéma du dispositif de mesure de l'angle de contact.

2.3.3 Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence est une méthode de visualisation optique basée sur la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière ou plus exactement de la fluorescence après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. Il s'agit d'une méthode très utilisée en biologie, mais nous allons l'utiliser ici pour deux analyses spécifiques: la

détection de la présence des amines primaires à la surface des polymères plasmas déposés (Chapitre 3), et la détection d'une réaction enzymatique sur un support solide dans un microcanal (Chapitre 5).

On peut distinguer deux types d'émission: la fluorescence primaire où les molécules sont autofluorescentes, à l'exemple de la molécule 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) utilisée dans ce travail, et la fluorescence secondaire où la molécule a besoin d'interagir avec une autre substance pour émettre une fluorescence, à l'exemple de la fluorescamine également utilisée. Pour les objets non fluorescents, leur visualisation nécessite un marquage par des molécules appelées fluorochromes.

Il existe différents types de microscopes qui exploitent la fluorescence (microscope confocal à balayage, épifluorescence, microscope de fluorescence par réflexion totale interne). Nous n'utiliserons cependant ici que le microscope optique classique de modèle Leica DM IRE2, équipé d'un filtre A4 et d'une caméra Leica DFC 300FX. Comme toute méthode optique, cette microscopie est limitée par la diffraction de la lumière, ce qui donne un pouvoir de résolution d'environ 200 nm [18].

2.3.4 Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM; *Atomic Force Microscopy*) est une technique de microscopie à sonde locale qui permet d'observer la topographie d'une surface à l'échelle nanométrique et même atomique. Grâce à cette haute précision, cette technique a été utilisée dans ce travail pour l'analyse de la surface des films polymères déposés par plasmas (continuité, rugosité), ainsi que pour le suivi des différentes étapes d'immobilisation de biomolécules à la surface de ces films.

L'AFM est basée sur le balayage de la surface avec une pointe nanométrique supportée par un micro levier (*cantilever*) flexible. Quand la pointe est très loin de la surface, aucune interaction n'est observée. Dès que la pointe s'en rapproche, celle-ci subit une force attractive ou répulsive selon la «distance de liaison»⁽⁴⁾ (Figure 18a). Cette interaction provoque une

⁽⁴⁾ Lorsque deux atomes sont très proches, les forces de Van der Waals les rapprochent encore plus (force d'attraction) jusqu'à une certaine distance, ou les deux atomes se repoussent du fait de la soumission des électrons du cortège électronique à la répulsion électrostatique. L'endroit où les deux forces sont égales tout en étant opposées est désigné par le terme «distance de liaison». C'est une sorte de position d'équilibre. Ce phénomène est appelé le principe d'exclusion de Pauli.

déviations du levier. La déformation de ce dernier est détectée par un laser et des photodiodes qui transmettent l'information (différence de tension) à un ordinateur qui à son tour reconstitue une image de la surface (Figure 18b). Les sondes AFM (*tips*) et les leviers sont fabriqués avec du Si ou Si_3N_4 , avec un rayon de courbure typique de 10 à 15 nm. Ce dernier limite la résolution latérale à une dizaine de nanomètres. La résolution verticale est par contre de l'ordre de l'ångström, et la surface visualisable peut aller de 100 nm à environ 150 μm [19].

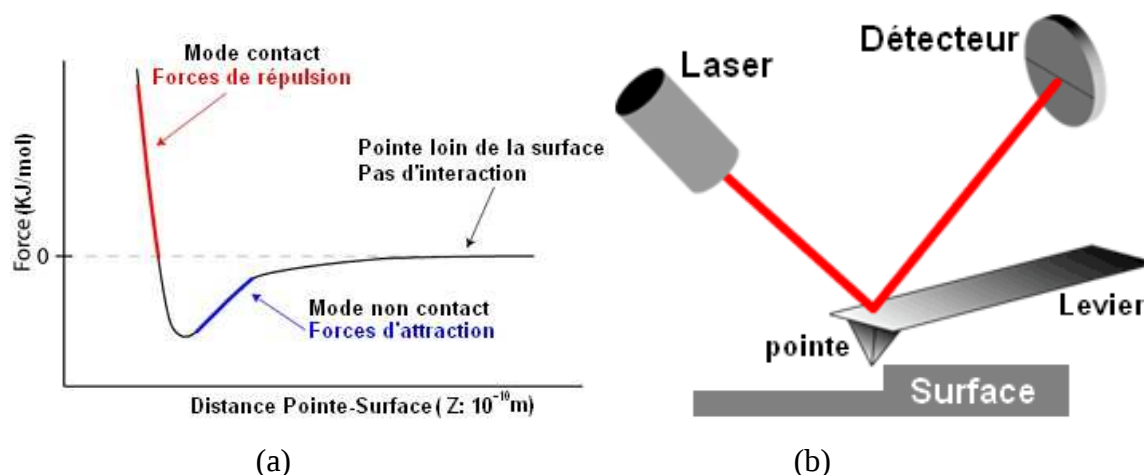


Figure 18. Principe de fonctionnement de la microscopie à force atomique. (a) Courbe des forces intervenant sur la pointe de l'AFM. (b) Schéma du dispositif de mesure.

Il existe trois méthodes de balayage AFM: le mode contact où la pointe appuie continuellement sur la surface (répulsion continue); le mode non contact où la pointe subit continuellement les forces d'attraction de la surface (sensible au bruit ambiant); et le mode tapping où le contact entre la pointe et la surface est intermittent. Ceci est obtenu en faisant vibrer le levier à sa fréquence de résonance (une centaine de kHz), avec une certaine amplitude. Lorsque la pointe interagit avec la surface, la fréquence de résonance change entraînant une décroissance de l'amplitude. Ce dernier mode est celui adopté dans cette thèse étant donné que les pointes s'usent moins vite rendant possible l'utilisation de pointes très fines ($< 15\text{ nm}$). Le microscope utilisé est de type multimode/Nanoscope IIIA (Digital Instruments).

2.3.5 Spectroscopie photoélectronique des rayons X

La spectroscopie photoélectronique des rayons X (XPS: *X ray photoelectron spectroscopy*), parfois aussi nommé ESCA (*Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*) est une technique spectroscopique quantitative qui permet une mesure de la composition élémentaire, liaisons chimiques, formule empirique et états électroniques de la surface des matériaux. Cette technique est cependant limitée aux matériaux qui résistent aux conditions d'analyse, à savoir, la grande énergie des rayons X utilisés (1,5 kV), une chambre sous ultravide ($<10^{-8}$ torr). Cette technique est utilisée ici pour l'analyse de la composition chimique de la surface du polymère plasma d'allylamine, ainsi que pour le suivi du changement de cette composition après différents traitements chimiques et l'immobilisation de la trypsine.

Le principe de la spectrométrie XPS est basé sur le bombardement de la surface d'un échantillon sous ultra-vide par un faisceau de rayons X monochromatiques. Les photons X absorbés entraînent l'excitation et l'émission des électrons de cœur des atomes composant la surface du matériau. Le spectroscope utilisé ici est de modèle *Physical Electronics Type5600*, avec une source de rayons X monochromatique Al K α , possédant une énergie de photons d'environ 1,5 KeV (longueur d'onde 0,8 nm), avec une résolution d'énergie qui peut atteindre 0,25 eV. Connaissant l'énergie du laser, il est possible de calculer l'énergie de liaison des électrons par l'équation Ernest Rutherford (6):

$$E_{\text{binding}} = E_{\text{photon}} - (E_{\text{kinetic}} + \phi) \quad (6)$$

Avec : E_{binding} : l'énergie de liaison du photon, E_{photon} : l'énergie des photons du rayonnement X, E_{kinetic} : l'énergie cinétique des électrons mesurés par l'analyseur, et ϕ une fonction intrinsèque au spectromètre (*work fonction*).

En pratique, les électrons émis sont collectés par une lentille (Figure 19). La détection consiste en un filtrage en énergie cinétique des photoélectrons émis et le calcul de leur nombre par un spectromètre⁽⁵⁾. Le spectre XPS est alors décrit par une succession de pics qui correspondent à une énergie cinétique donnée. La position de chaque pic est spécifique à une

⁽⁵⁾ Le spectromètre est un analyseur formé de deux électrodes hémisphériques. La différence de potentiel entre deux électrodes hémisphériques définit l'énergie de passage des électrons.

configuration électronique d'un atome (analyse élémentaire), alors que l'amplitude du pic est proportionnelle au nombre d'atomes (analyse quantitative).

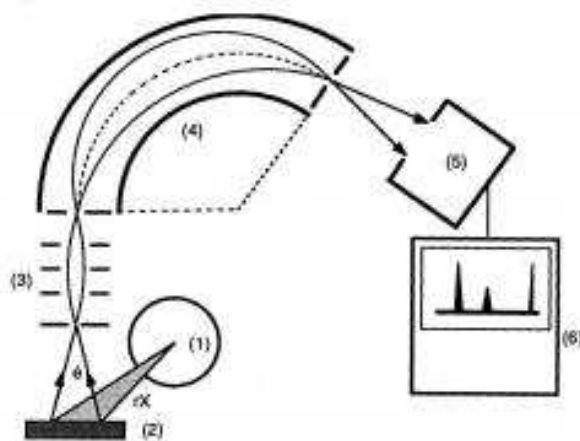


Figure 19. Schéma de principe d'un appareil XPS, composé de (1) tube à rayons X, (2) échantillon dans une chambre sous ultravide, (3) système de focalisation électronique ; (4) spectromètre analyseur, (5) détecteur à électrons (*channeltron*) et (6) un système d'acquisition et de traitement des données.

L'analyse d'un échantillon peut durer de 1-10 min pour un balayage global (analyse élémentaire) ou pour un balayage détaillé (liaisons chimiques), et 1-4 h pour une analyse en profondeur avec gravure (jusqu'à 1 μm). Seules les deux premières analyses sont réalisées dans ce travail. La surface d'analyse peut aller de 10 μm à 5 mm selon les systèmes. Enfin, une bonne analyse d'un spectre XPS exige une connaissance des principales limitations de cette technique :

- ✓ L'XPS détecte tous les éléments chimiques possédant un numéro atomique (Z) supérieur ou égal à 3 (lithium). Il n'est donc pas possible de détecter l'hydrogène ($Z = 1$) et l'hélium ($Z = 2$).
- ✓ Une sensibilité de détection atomique de 0,1 - 0,5 % suivant les éléments.
- ✓ Bien que les rayons X puissent pénétrer de 1- 5 μm dans le matériau analysé, seuls les électrons issus des 1-10 nm de la surface sont détectés. Les autres sont recapturés dans différents états électroniques excités dans le matériau [20]. Autrement dit, l'intensité du signal en fonction de l'épaisseur de l'échantillon est amortie par un facteur exponentiel: plus on s'éloigne de la surface, moins les électrons éjectés auront de

chance d'être détectés, et plus leur contribution au signal total est faible. C'est ainsi que 70 % du signal détecté provient des premiers nanomètres. Comme nous allons le voir au chapitre 4, la prise en compte de ce phénomène est importante pour bien comprendre les spectres XPS obtenus.

2.3.6 Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-visible exploite la partie du spectre électromagnétique comprise entre 190-400 nm (UV) et/ou 400-780 nm (visible). C'est une méthode quantitative très utilisée pour l'analyse des solutions de métaux de transition et des composés organiques conjugués. Nous allons l'utiliser ici pour le dosage indirect des amines primaires à la surface du polymère plasma d'allylamine par dérivation chimique avec le nitrobenzaldehyde qui absorbe à $\lambda_{\text{max}} = 267$ nm. Elle sera également utilisée pour le dosage direct des enzymes (trypsines) immobilisées à la surface du même polymère. Les enzymes sont des protéines qui absorbent à $\lambda_{\text{max}} = 280$ nm. Le spectroscope utilisé est un *Perkin-Elmer Lambda 800 UV-VIS*. Etant donné que les longueurs d'ondes d'intérêt sont situées principalement dans l'ultraviolet, toutes nos analyses ont été effectuées dans une cuvette en quartz qui est transparente dans l'UV-visible, contrairement au verre qui peut absorber dans l'UV.

Le principe de cette spectroscopie est relativement simple. Il consiste à orienter un faisceau lumineux (avec une intensité I_0) sur un échantillon et détecter l'intensité de la lumière émise (I) (Figure 20). Le rapport I/I_0 est appelé *transmittance*, et est habituellement exprimé comme un pourcentage (%). La différence entre I_0 et I est une atténuation composée de deux contributions: la diffusion de la lumière par les particules du milieu, et l'absorbance d'une partie des photons par les électrons de la couche externe de ces particules, entraînant des transitions électroniques.

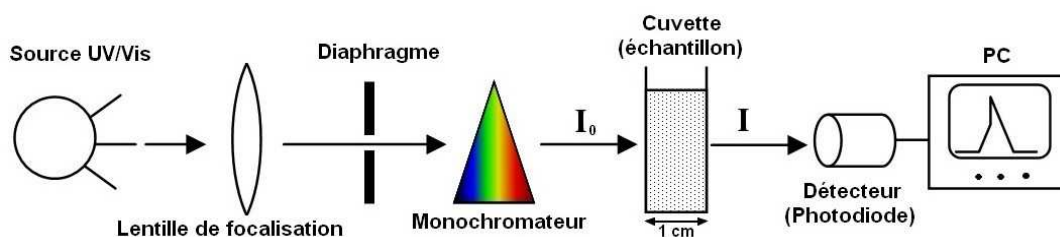


Figure 20. Schéma du principe de fonctionnement de la spectroscopie UV-visible.

A partir de l'équation de propagation du champ électromagnétique (Annexe 1), le rapport I_0/I peut s'exprimer par:

$$I / I_0 = e^{-\kappa l} \quad (7)$$

Où κ est le coefficient d'extinction et l la longueur du trajet optique (en cm).

La loi de Beer-Lambert résulte directement de l'équation (7) :

$$I / I_0 = e^{-\varepsilon c l} \quad (8)$$

Où: $\kappa = \varepsilon c$, avec ε le coefficient d'absorption molaire (en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) et c la concentration de l'espèce absorbante (en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

La loi de Beer-Lambert est habituellement exprimée par sa forme logarithmique:

$$\log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = A_\lambda = \varepsilon_\lambda l c$$

Où : A_λ est l'absorbance ou la densité optique de la solution pour une longueur d'onde λ et ε_λ le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution pour la longueur d'onde λ . La valeur absolue de ε_λ change par un facteur de 2.303 si le logarithme népérien ($\ln$) est employé à la place du logarithme décimal ($\log_{10}$).

Il est à noter que cette loi n'est pas une relation universelle et présente certaines limites. Elle n'est linéaire que pour des valeurs de concentrations inférieures à $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [15].

2.3.7 Spectrofluorométrie

La spectrofluorométrie, également appelée spectroscopie de fluorescence est basée sur l'utilisation d'un faisceau lumineux d'excitation (généralement dans l'UV) pour exciter les électrons des atomes de certains composés et les faire émettre un rayonnement de plus basse énergie dit «spectre d'émission» ou fluorescence (généralement dans le visible). Ce phénomène est lié aux niveaux d'énergie et états électroniques et vibrationnels de certaines molécules. La lumière émise est ensuite captée par un détecteur placé dans notre cas à un

angle de 90° (au lieu de 180°) par rapport à l'incidence de la lumière d'excitation, afin d'éviter les interférences pour la lumière d'excitation transmise.

Le spectrofluoromètre utilisé ici est un *Perkin-Elmer Luminescence spectrometer LS 50B*. Ce dernier possède des monochromateurs couplés et une source de rayonnement d'excitation continue. Il est capable d'enregistrer à la fois le spectre d'excitation et celui de la fluorescence. Le spectre d'excitation est généralement identique au spectre d'absorption et l'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'absorption à faibles concentrations [21].

Le spectrofluoromètre permet soit une mesure fréquentielle (détection de la longueur d'onde d'émission) soit une mesure temporelle où l'évolution de la fluorescence à une certaine longueur d'onde peut être suivie au cours du temps. Ce dernier mode de mesure a été adopté ici pour le suivi d'une réaction enzymatique sur un support solide en temps réel. Bien que cette spectroscopie soit habituellement utilisée pour des analyses en solution, nous avons réussi, avec quelques aménagements (Figure 21), à étudier la cinétique des enzymes immobilisées. La réaction du substrat *N* α -benzoyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin (BA-AMC) avec les enzymes génère un produit fluorescent détecté en temps réel par le fluorimètre (Annexe 1). L'évolution de la fluorescence correspond à la cinétique d'apparition du produit et donc à l'activité enzymatique. L'analyse détaillée et les précautions techniques entreprises sont décrites dans le chapitre 4.

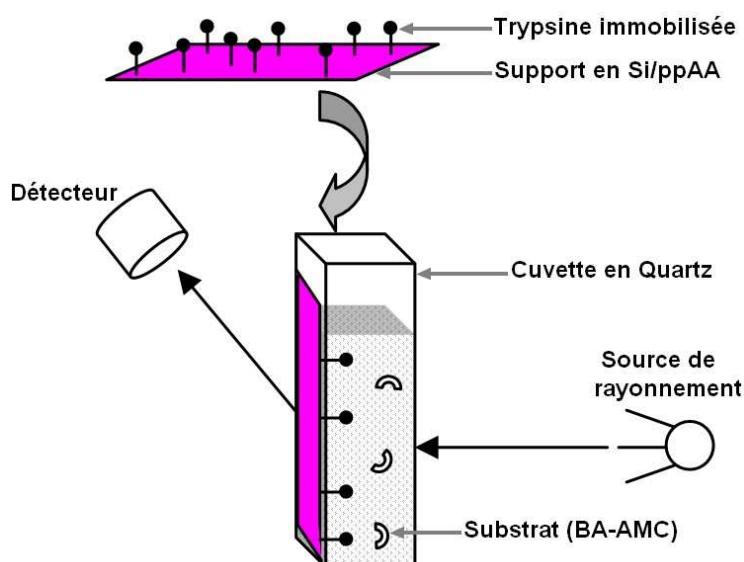


Figure 21. Dispositif d'analyse de la réaction enzymatique sur support solide par spectrofluorométrie.

2.3.8 Microscopie électronique à balayage

La Microscopie Electronique à Balayage (MEB ou SEM pour *Scanning Electron Microscopy*) est une technique qui exploite les interactions électrons-matière pour produire des images 2D ou 3D avec une résolution nanométrique de la surface d'un échantillon et une grande profondeur du champ. Le microscope utilisé dans ce travail est de type *Zeiss Ultra 55*. Il a principalement servi à l'observation de l'aspect des films déposés par plasma (ppAA, ppTMDS) en surface et en tranche par clivage de l'échantillon, ainsi que pour l'observation des microcanaux fabriqués par polymérisation plasma (voir Chapitre 6).

En pratique, une source du faisceau d'électrons (canon à électrons de 10-40 keV) viendra balayer la surface de l'échantillon à analyser. L'interaction entre les électrons incidents et l'échantillon produit l'émission d'électrons d'énergies différentes, de rayons X et de luminescence (Figure 22). Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface.

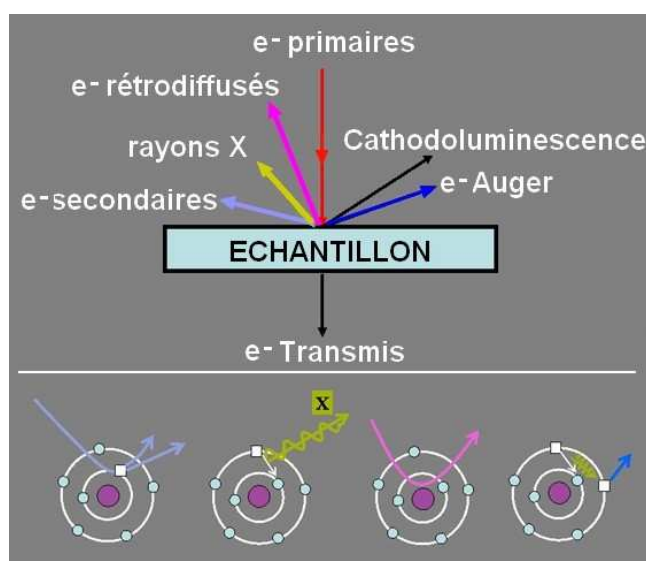


Figure 22. Signaux produits par interaction d'un électron primaire avec l'échantillon.

Suivant les particules détectées, un microscope électronique à balayage peut avoir plusieurs modes d'imagerie [22]:

- ✓ Les électrons secondaires arrachés à la matière par les électrons incidents ou rétrodiffusés, d'énergie plus faible, permettent d'imager la topographie de la surface avec des effets d'ombres. C'est la méthode la plus couramment utilisée.
- ✓ Les électrons rétrodiffusés (*backscattered electrons*), d'énergie comparable à celle des électrons incidents permettent d'obtenir des images par contraste de phase, idéal pour voir les différents matériaux d'un échantillon.
- ✓ Les photons X, donnant accès à la microanalyse élémentaire (types d'éléments chimiques composant la surface).
- ✓ Les électrons Auger, de très faible énergie, ne pouvant être étudiés que dans des conditions d'ultra-vide.
- ✓ Les photons visibles (cathodoluminescence) spécifiques de certains matériaux ou impuretés.

Il est à noter que l'interaction électron-matière conduit à des effets d'accumulation de charges à la surface. Ces charges sont évacuées vers la masse dans le cas d'un échantillon conducteur. Par contre, dans le cas d'un isolant, leur accumulation déforme le faisceau d'électrons et modifie son énergie effective; on dit que l'échantillon charge: il faut donc déposer une couche-mince de métallisation à la surface (or, or-palladium, carbone) et/ou travailler à de faibles épaisseurs. Ce problème est aussi rencontré dans l'analyse XPS comme nous allons le voir dans le chapitre 4 (Article 2).

2.3.9 Dérivations chimiques

Les dérivations chimiques sont des réactions de marquage spécifique dont l'objectif est de rendre une molécule visible à l'une des techniques d'analyse ou de visualisation, notamment celle décrite ci-dessus. Cela consiste à faire réagir et/ou coupler la molécule qu'on veut doser ou observer avec une autre molécule facilement détectable grâce à son pouvoir d'absorption, de fluorescence ou autre. Deux réactions ont été utilisées dans ce travail afin de détecter puis doser les fonctions d'amines primaires à la surface du polymère plasma d'allylamine:

- ✓ La première consiste à exposer la surface de ppAA à une molécule nommée fluorescamine, également appelée Fluma (Figure 23). Cette dernière peut réagir avec plusieurs produits nucléophiles tels les amines primaires, secondaires et les alcools. Cependant, seule la réaction avec les amines primaires aboutit à un produit fluorescent appelé Pyrrolinnone [23]. Cela permet de détecter la présence des amines primaires au microscope à fluorescence, par une excitation à 390 nm (émission à 475 nm).

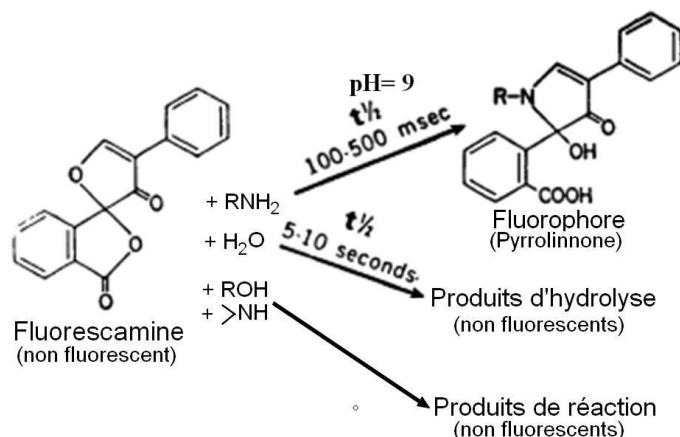


Figure 23. Réactions de la fluorescamine avec différents nucléophiles.

- ✓ La seconde consiste à exploiter l'affinité spécifique du nitrobenzaldehyde (NBA) avec les amines primaires. En plus de cette affinité, le NBA présente deux caractéristiques très utiles: sa réaction avec les amines devient réversible dans un milieu aqueux (Figure 24), ce qui permet leur récupération et leur dosage en spectroscopie UV-visible, puisqu'ils ont un maximum d'absorbance autour de 267 nm. Cette méthode permet de remonter à la quantité des amines primaires par unité de surface [24].

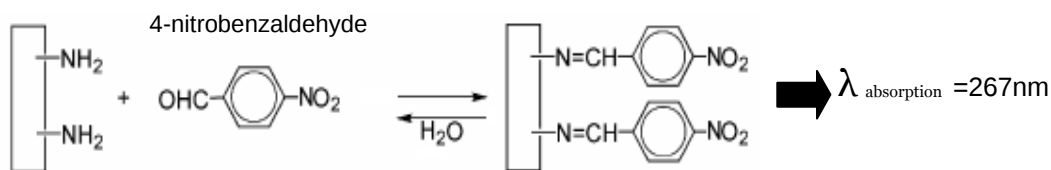


Figure 24. Dérivation chimique des amines primaires par le nitrobenzaldehyde.

2.4 Mesures en spectroscopie TeraHertz

Nous avons mentionné précédemment que l'utilisation très tardive du champ THz dans les différents domaines, principalement analytiques, est dû en partie au manque de sources et de

détecteurs pour ces fréquences. Un grand nombre des travaux scientifiques sur la génération et la détection des THz a été fourni au cours de ces cinq dernières années, rendant possible l'apparition des premiers spectromètres et microscopes THz. Les sources THz peuvent être optiques, électro-optiques ou électroniques (multiplication de fréquences). Ce dernier mode est celui utilisé par l'analyseur de réseaux vectoriels (VNA; *Vectorial Network Analyser*) que nous allons employer ici. Le VNA, de modèle 8510XFNNA (Agilent technologies), permet de faire des mesures fréquentielles dans la bande 0,045–110 GHz. Ces mesures donnent accès à des informations en phase (indice de réfraction) et en amplitude (permittivité diélectrique), ce qui apporte plus de renseignements que les spectroscopies conventionnelles à transformée de Fourier sensibles uniquement à l'amplitude. Cependant ces mesures se font dans une bande étroite et sur des composants adaptés à une impédance 50 Ω .

Le champ THz se propage soit dans l'air libre en utilisant des antennes, soit sur des guides d'ondes, à l'exemple des guides d'ondes coplanaires (CPW) et les lignes de Goubau que nous allons utiliser. Les lignes coplanaires sont composées d'un substrat diélectrique (silicium à haute résistivité) sur lequel sont déposées trois lignes métalliques (en Or) parallèles: un ruban central et deux plans de masse (Figure 25). La conception, la simulation de la propagation des ondes électro-magnétiques et l'adaptation de ces lignes avec une transition vers un seul fil de transmission appelé ligne de Goubau (GL) (Figure 26) ont précédemment fait l'objet d'une thèse au sein de l'équipe M²T [25].

Dans le domaine de fréquence que nous allons exploiter (60 GHz-110 GHz, ondes millimétriques), beaucoup d'effets de relaxation sont présents à côté des modes vibratoires. L'analyse des échantillons se fait par la mesure de l'énergie absorbée, transmise et réfléchie des fréquences émises, ce qui peut s'exprimer en termes d'impédance ou de permittivité électrique. Dans cette région, la dépendance en fréquence de la permittivité diélectrique complexe (ϵ^*) peut être décrite dans la majorité des cas par les équations de Debye [26]:

$$\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon'' \quad (9)$$

$$\text{Avec: } \epsilon' = \epsilon_{\infty} + \frac{\Delta\epsilon}{1 + (\omega\tau)^2} \quad \text{et} \quad \epsilon'' = \frac{\Delta\epsilon\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (10)$$

Où: ε' est la partie réelle, ε'' la partie imaginaire qui correspond principalement aux pertes d'énergie par dissipation, $j = (-1)^{1/2}$, ω la fréquence angulaire ($\omega = 2\pi f$, f est la fréquence), τ le temps de relaxation ($\tau = 1/(2\pi f_0)$, f_0 est la fréquence caractéristique), $\Delta\varepsilon$ est l'intensité ou magnitude de la relaxation ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_0 - \varepsilon_\infty$, ε_0 et ε_∞ sont respectivement les fréquences limites basse et haute de la permittivité relative ε ($\varepsilon = \varepsilon'$)).

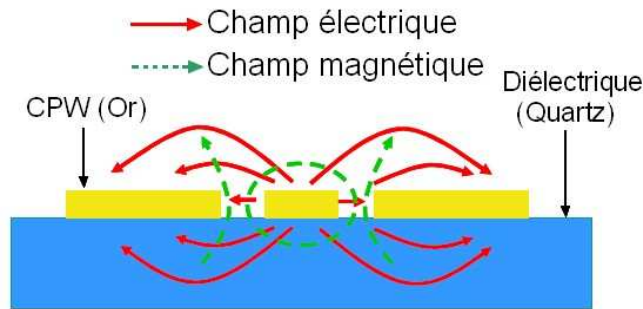


Figure 25. Propagation des champs électrique et magnétique sur les lignes coplanaires (CPW).

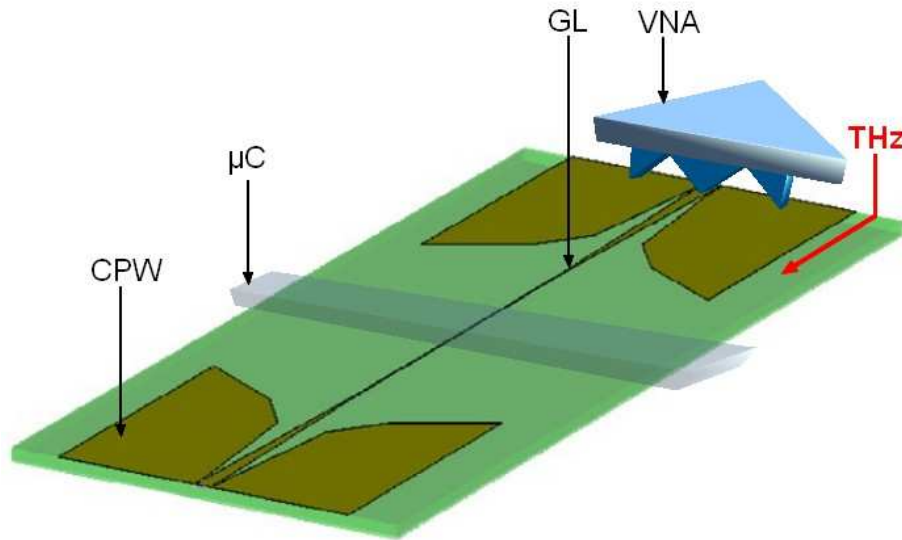


Figure 26. Schéma des lignes de transmission coplanaires (CPW) avec la ligne de Goubau (GL) sous les pointes de l'analyseur de réseaux vectoriel (VNA). En pratique, les pointes du VNA sont déposées sur les deux extrémités de la ligne de transmission. L'analyse d'un échantillon se fait par son introduction dans un microcanal (μC) qui traverse la ligne de transmission THz.

En plus des paramètres de permittivité présentés ci-dessus, l'interaction du champ électromagnétique avec les milieux diélectriques peut être également décrite par des paramètres optiques: l'indice de réfraction et le coefficient d'absorption [27, 28]. Ces deux quantités sont généralement décrites en terme d'indice de réfraction complexe (n^*) exprimé par :

$$n^* = n + j\kappa \quad (11)$$

Où:

- ✓ n est l'indice de réfraction réel qui peut être obtenu expérimentalement par la différence de phase de deux signaux (I et I_0) pour une fréquence donnée:

$$n = 1 + \frac{\Phi_I - \Phi_0}{2\pi d} \lambda \quad (12)$$

Avec: Φ_I et Φ_0 sont respectivement les phases du signal entrant (I) et sortant (I_0);

- ✓ Et κ le coefficient d'extinction lié au coefficient d'absorption (α) par la relation de Kramers-Kronig (14), suivant la démonstration décrite dans l'annexe 2:

$$\alpha = 2 \frac{\kappa \omega}{c} = \frac{4\pi \kappa}{\lambda} \quad (13)$$

Ces paramètres optiques peuvent être reliés aux termes de la permittivité complexe:

$$\epsilon' = n^2 - \kappa^2 \quad (14)$$

et

$$\epsilon'' = 2n\kappa \quad (15)$$

Enfin, il est à noter qu'une grande partie des mesures effectuées dans ce domaine de fréquences concerne des échantillons solides. Ceci est expliqué par la grande absorbance de l'eau pour le champ électromagnétique entre 1GHz et 30 THz à cause des vibrations des faibles liaisons hydrogènes. Cette limitation a été l'un de facteurs majeurs qui ont ralenti l'utilisation des THz en analyses biologiques. A cet égard, la technologie des BioMEMS permet de miniaturiser les systèmes d'analyse, réduisant ainsi le volume de l'échantillon à analyser, et permettant une meilleure transmission du signal.

Références

- [1] Yasuda H. K., ‘‘Plasma Polymerization’’, Academic Press, New York 1985.
- [2] Biederman H., Osada Y., ‘‘Plasma polymerization processes: Plasma technology, vol. 3’’. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1992, 210 pages.
- [3] Siow K. S., Britcher L., Kumar S., Griesser H. J., ‘‘Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review’’, *Plasma Process. Polym.*, **3**, 2006, 392-418.
- [4] Gancarz I., Bryjak J., Pozniak G., Tylus W., ‘‘Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization II. Amines plasma’’, *Eur. Polym. J.*, **39**, 2003, 2217-2224.
- [5] Chu P.K., Chen J.Y., Wang L.P., Huang N., ‘‘Plasma-surface modification of biomaterials’’, *Mat. Sci. Eng.: R: Reports*, **36**, 2002, 143-206.
- [6] Denes F. S., Manolache S., ‘‘Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science’’, *Prog. Polym. Sci.*, **29**, 2004, 815-885.
- [7] Yu Y.-J., Kim J.-G., Boo J.-H., ‘‘Plasma-polymerized thiophene films for corrosion protection in microelectronic devices’’, *J. Mat. Sci. Lett.*, **21**, 2002, 951-953.
- [8] Dhayal M., Hyung G. J., Jeong S. C., ‘‘Use of plasma polymerisation process for fabrication of bio-MEMS for micro-fluidic devices’’, *Appl. surf. sci.*, **252**, 2005, 1710-1715.
- [9] Bouaidat S., Winther-Jensen B., Flygenring C. S., Jonsmann J., ‘‘Plasma-polymerized coatings for bio-MEMS applications’’, *Sens. Actuators A: Physical*, **110**, 2004, 390-394.
- [10] Supiot P., Vivien C., Aimard M., Sumera R., Bocquet B., ‘‘In situ laser assisted diagnostics on growth of thick PACVD organosilicon films’’, *High Temperature Material Process*, **9**, 2005, 287-297.
- [11] Supiot P., Vivien C., Granier A., Bousqtiet A., Mackova A., Escaich D., Clergereaux R., Raynaud P., Stryhal Z., Pavlik J., ‘‘Growth and modification of organosilicon films in PECVD and remote afterglow reactors’’, *Plasma process. Polym.*, **3**, 2006, 100-109.
- [12] Abou Rich S., «Etude des films polymères organosiliciés déposés par plasma d’azote en écoulement ». Thèse de doctorat soutenue le 06 Déc. 2008 à l’Université de Lille1, 233 pages, disponible sur: <https://iris.univ-lille1.fr/dspace/handle/1908/3>.

- [13] Mille V., «Conception et réalisation de BioMEMS TéraHertz dédiés à la spectroscopie de solutions biologique». Thèse de doctorat soutenue le 28 Nov. 2007 à l'Université de Lille1, 144 pages, disponible sur: <https://iris.univ-lille1.fr/dspace/handle/1908/3>.
- [14] Vig J. R., "UV/Ozone cleaning of surfaces", *J. Vac. Sci. Technol A*, **3**, 1985, 1027-1034.
- [15] Gauglitz G., Vo-Dinh T., "Handbook of Spectroscopy", Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003, Weinheim, 1156 pages.
- [16] Owens D. K., Wendt R. C., "Estimation of the Surface Free Energy of Polymers", *J. Appl. Polym. Sci.*, **13**, 1969, 1741.
- [17] Van Oss C.J., "Interfacial Forces in Aqueous Media" Marcel Dekker, 1994, New York.
- [18] Rost F., Oldfield R., "Fluorescence microscopy, Photography with a Microscope", Cambridge University Press, 2000, Cambridge, United Kingdom,.
- [19] Cohen S. H., Lightbody M. L., "Atomic Force Microscopy/Scanning Tunneling Microscopy", Kluwer Academic Publishers, 2002, New York, 210 pages.
- [20] Watts J. F., Wolstenholme J., "An Introduction to Surface Analysis by XPS and AES", John Wiley & Sons Ltd, 2003, Chichester, England, 225 pages.
- [21] Sharma A., Schulman S. G., "Introduction to Fluorescence Spectroscopy", Wiley interscience, 1999, Singapore, 960 pages.
- [22] Yao. N., Wang Z. L., "Handbook of microscopy for nanotechnology", Kluwer Academic Publishers, 2005, New York, 745 pages.
- [23] Ivanov V. B., Behnisch J., Holländer A., Mehdorn F., Zimmermann H., "Determination of Functional Groups on Polymer Surfaces Using Fluorescence Labelling", *Surf. Interf. Anal.*, **24**, 1996, 257-262.
- [24] Moon J. H., Shin J. W., Kim S. Y., Park J. W., "Formation of uniform aminosilane thin layers: an imine formation to measure relative surface density of the amine group," *Langmuir*, **12**, 1996, 4621-4624.
- [25] Treizebre A., "BioMEMS teraHertz pour l'étude du trafic informationnel de cellules biologiques". Thèse de doctorat soutenue le 06 Décembre 2007, à l'Université de Lille1, 233 pages. Disponible sur: <https://iris.univ-lille1.fr/dspace/handle/1908/3>
- [26] Debye P., "Polar molecules", Dover publications, 1965, Canada, 172 pages.

- [27] Walther M., “Modern spectroscopy on biological molecules: structure and bonding investigated by THz time-domain and transient phase-grating spectroscopy”. Thèse de doctorat à l’université de Freiburg, Novembre 2003, 155 pages. Disponible sur: <http://frhethz.physik.uni-freiburg.de/?display=4>
- [28] Asami K., “Characterization of heterogeneous systems by dielectric spectroscopy”, *Prog. polym. Sci.*, **27**, 2002, 1617-1659.

Chapitre 3 _____

*Fonctionnalisation de surface par plasma
d'allylamine*

Chapitre 3 ---

Fonctionnalisation de surface par plasma d'allylamine

Ce chapitre inaugure la partie des résultats et des discussions de cette thèse. Il est composé de deux parties: la première se présente sous la forme d'un article déjà publié décrivant le dépôt de film polymère par plasma d'allylamine. La seconde partie rapporte deux méthodes d'utilisation de ce film pour amplifier sa capacité de charge. En plus de la fonctionnalisation de nanofils pour démultiplier la surface, une démonstration a été faite que le film d'allylamine est une matrice tridimensionnelle, présentant des amines réactives à la surface mais aussi à l'intérieur du film.

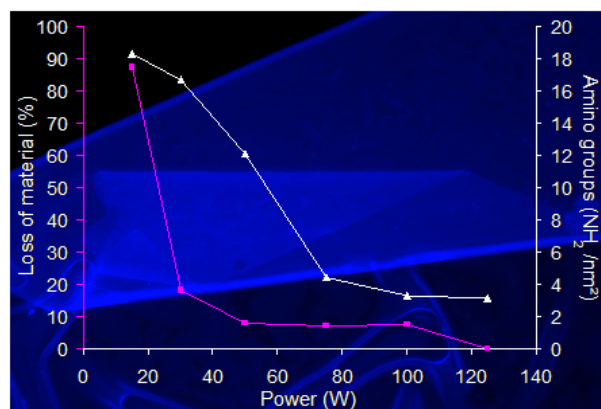
3.1 Dépôt de couches minces par plasma d'allylamine

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article publié dans la revue internationale à comité de lecture *Plasmas Processes and Polymers*. Cette publication, notée «Article 1» est intitulée: «Préparation et multi-caractérisation de films d'allylamine déposés par plasma ». Elle décrit le développement d'un procédé PECVD pour la polymérisation d'allylamine dans un réacteur à décharge RF et couplage capacitif. Le film ppAA obtenu a été caractérisé par différentes techniques microscopiques (fluorescence, AFM, MEB) et spectroscopiques (FTIR, XPS, UV-visible). Plusieurs caractéristiques du film déposé ont été étudiées en fonction de la puissance RF injectée. Cette étude a permis d'identifier les conditions optimales pour obtenir un film présentant à la fois une bonne adhésion sur les différents substrats, une bonne stabilité dans les milieux aqueux et une densité de fonctions amines primaires suffisante pour une éventuelle immobilisation de biomolécules.

Preparation and Multi-Characterization of Plasma Polymerized Allylamine Films

Abdenmour Abbas, Céline Vivien, Bertrand Bocquet, Didier Guillochon, Philippe Supiot*

Plasma polymerized allylamine (ppAA) films were deposited in a radio-frequency glow discharge plasma reactor using a continuous-wave mode and varying the discharge power from 15 to 125 W. The deposition rate reached $26 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ and was constant within at least half an hour of process. The chemical structure and elemental composition of the deposited films were investigated by Fourier transform infrared and X-ray photoelectron spectroscopies, whereas surface properties were analyzed by atomic force microscopy and surface free energy measurement. A special focus is given to the stability of ppAA in aqueous media and primary amine quantification. The use of fluorescent microscopy and UV-Visible spectroscopy enabled us to detect and quantify the primary amine, respectively. All the studied parameters varied widely with enhanced power with a transition point around 50 W. Over this value, the results remain relatively unchanged.



Introduction

Plasma polymerization is becoming a very attractive way for the deposition of thin polymer films in dry process. A wide number of monomers can be used as precursors to

incorporate functional groups on various surfaces. The deposition reaction does not change material bulk properties of the substrates and can be controlled by varying the operational parameters, which are mainly the monomer flow rate, the applied power, and the working pressure. Besides these advantages, the process is relatively very fast. Few seconds are sufficient to incorporate amine functions on various surfaces, while traditional vapor- or solution-based procedures require from one to several hours.^[1] Nowadays, one of the most attractive challenges in aided-plasma techniques, in particular plasma polymerization, is the reliable tailoring of the nature and concentration of functional groups on the deposited polymer surface. Despite many works devoted to this purpose, many questions remain concerning the reactive functional groups quantification, the film stability in water-based solutions, and the dependence of these features on plasma deposition parameters. The difficulty lies on the diversity of

A. Abbas, C. Vivien, P. Supiot

Laboratory of Process Engineering of Reactive Fluids-to-Materials Interactions, EA 3571, University of Lille1, Bat P3 – 3ème étage, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Fax: (+33) 03 20 43 41 58; E-mail: philippe.supiot@univ-lille1.fr
B. Bocquet

Institute of Electronics, Microelectronics and Nanotechnology, UMR CNRS 8520, Avenue Poincaré BP 60069, Villeneuve d'Ascq 59652, France

D. Guillochon

Laboratory of Biological Processes, Enzymatic and Microbial Engineering, EA 1026, Polytech'Lille, Avenue Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

reactions that occur in the plasma chamber. In addition, plasma polymerization is system dependent, which means that the results depend not only on the process parameters but also on the reactor geometry as well.

Primary amine functionalities have attracted a growing interest for surface biofunctionalization. Many organic monomers have been used as precursors for the plasma deposition of thin aminated films, including heptylamine, allylamine, lysine, ethylenediamine, *n*-butylamine, aniline, diaminocyclohexane, and diaminopropane.^[2–8] Among these monomers, allylamine is the most used one. It is a non-saturated molecule, so it can be polymerized at low energies and then produces films with a high retention of primary amine functionalities. Allylamine films have been prepared with different plasma methods, varying from radio-frequency (RF) plasma to microwave plasma, either in a continuous-wave (CW) or pulse modes. It has been deposited on a wide variety of substrates including polymers, metals, powders, and organic membranes.^[9–11] Plasma polymerized allylamine (ppAA) can be polymerized alone or with reactive or neutral gas such as ammonia (NH₃), hydrogen (H₂), and argon (Ar). The allylamine/argon mixture seems to be more efficient in point of view of biomedical applications.^[5] Furthermore, allylamine can be co-polymerized with various organic monomers to introduce new functional groups or for a controlled chemical modification of the coatings.^[12–14] ppAA is known to be one of the most interesting amine-containing plasma polymers for biotechnology applications.^[5] It was widely used as a support for biomolecule immobilization^[5,15–17] and cell attachment.^[18–20] Additionally, it is found to have potential applications as a dielectric material for electronic components,^[21] as a recognition element for gas sensors,^[22] and as a functional polymer for biochip fabrication.^[23] Regarding all these potential applications, the mechanistic study of the polymerization process and multi-analysis of the deposited films appear to be a fundamental step. In fact, the best understanding of the influence of different process parameters will aid to provide the films with the desired characteristics in terms of surface chemistry, mechanical strength, and physical properties. This paper deals with the preparation and surface characterization of ppAA using a wide panel of techniques. It focuses especially on the influence of the input power on the film behavior in aqueous environment and on the chemical features, particularly primary amine content. Additional parameters are studied as a function of RF discharge power, including the deposition rate and the surface free energy.

Experimental Part

Materials

Plasma polymerized allylamine films were deposited on glossy aluminum (Al) disks of 2.5 cm diameter (Almet, France) and on

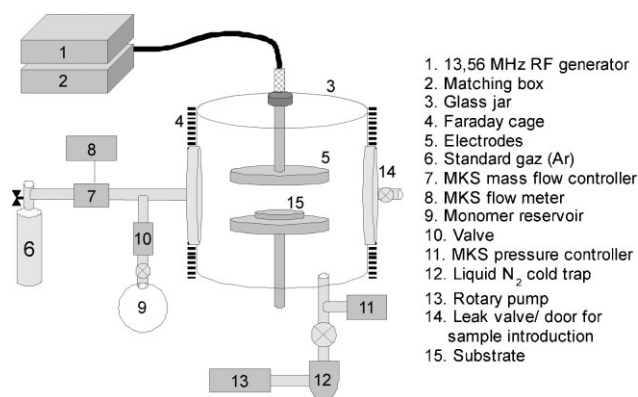
single side polished p-doped silicon wafers obtained from Siltronic. The Al disks were used for Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analysis because of the good reflectivity of Al in infrared spectral region. The Si substrates with dimensions of 1 cm × 1 cm or 2 cm × 2 cm were used for all the following characterization techniques. All the substrates were ultrasonicated in acetone and isopropyl alcohol for 5 min each, then dried under nitrogen flow. Prior to use, the substrates underwent UV light-Ozone treatment (UVO cleaner, Jelight Company Inc.) for 30 min to improve adhesion effects and eliminate the organic contaminants. 3-Aminopropene solution, i.e., allylamine solution (MW: 57.09 g · mol⁻¹, 99% purity) was purchased from Fluka Analytical. Fluorescamine, i.e., Fluram (MW: 278.26 g · mol⁻¹, ≥99% purity), nitrobenzaldehyde (MW: 151.12 g · mol⁻¹), and sodium cyanoborohydride (NaBH₃CN, 94% pure) were acquired from Sigma-Aldrich Chemical Co. Glutaraldehyde (25%) was obtained from VWR Prolabo. Fluorescamine solutions were prepared by using Milli-Q water (Millipore, USA) with the resistivity of 18 mΩ · cm. All the chemicals were used as received unless otherwise specified.

Plasma Deposition

The ppAA in this work was prepared in a home built 13.56 MHz capacitively coupled RF plasma reactor shown in Figure 1. It consists of a cylindrical borosilicated glass chamber (31 cm length, 18 cm diameter) containing two parallel plate electrodes. The upper one was powered and the lower acts as a sample holder. The electrode gap is 3 cm, and each electrode diameter is 12 cm. The plasma discharge region is situated between the two Al plates. Before each deposition process, the plasma chamber was evacuated to a background pressure of 0.3 Pa. Plasma discharge was ignited using argon gas with a flow rate of 250 sccm and a work pressure of 165 Pa. Then, the organic precursor allylamine, heated to 45 °C, was allowed to enter the reaction chamber giving a total pressure of 190 Pa. The input power was varied from 15 to 125 W in CW mode, and deposition time going from 2 to 30 min. After deposition, the samples were immediately stored in a desiccator until analysis.

Thin Film Characterization

Fourier transform infrared spectroscopy was used to investigate the chemical structure of ppAA films. Spectra were recorded immediately after deposition, using a Perkin-Elmer spectrometer in



■ Figure 1. Schematic diagram of the plasma deposition apparatus.

specular reflection mode. Thirty (30) interferograms were averaged per spectrum at a resolution of 4 cm^{-1} . Ratios of the spectra areas were calculated after a linear baseline correction. The elemental composition was investigated using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) (Physical Electronics Type 5600), with a monochromatic Al K α X-ray source operated at 350 W. The constant take-off angle was 45° and the wide scans (0–1400 eV) were acquired using a pass energy of 46.95 eV. Chemical binding information was obtained from high resolution scans of C 1s and N 1s components collected with an energy bandpath of 11.75 eV. All spectra were referenced by setting the hydrocarbon C 1s peak to $285 \pm 0.2\text{ eV}$. After the background and linear baseline subtractions, percent atomic composition, atomic ratios, and peak fitting were carried out using Peakfit application (Systat. Software Inc.) assuming Gaussian functions. Elemental sensitivity factors were used to calculate the atomic concentration percentages. Glutaraldehyde [$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$] derivatization was used to get more insight on the contribution of primary amine to N 1s peak. The samples prepared at 75 W input power were allowed to react with 5% glutaraldehyde solution, followed by immersion in 0.1 M sodium cyanoborohydride solution for 30 min. Then, they were washed by deionized water under stirring 3 times for 5 min each and dried before XPS analysis.

The deposition rate was estimated by controlling the film thickness for various deposition times. Measurements were realized by the surface profiler TENCOR P-10 with a scan length of 500 nm at $50\text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ scan speed.

To study the stability and behavior of ppAA films in water in respect to the deposition RF power, films deposited at different wattage, 25 Pa monomer partial pressure and 9 min deposition time were immersed in deionized water for 2 h under gentle stirring. Then, they were heated at 100°C for 10 min to evaporate the water molecules. Reference samples were prepared by heating directly the films without water immersion. The film thickness was measured after each treatment using the surface profiler mentioned above. Obtained results would provide information about the increase or decrease of thickness caused by the aqueous environment. Different behaviors are expected for the different samples. Additionally, the interface ppAA film/substrate was imaged using Zeiss Ultra 55 scanning electron microscope (SEM). The apparatus present a magnification from $20\times$ to $900\,000\times$ and a resolution up to 1 nm. Images were obtained at accelerating voltage of 0.70 kV, with the back-scattered electrons (BSE) mode. The later enables the detection of contrast between areas with different chemical compositions.

Atomic force microscopic (AFM) analysis was performed few hours after deposition. The polymer surface topography was imaged using a multimode/Nanoscope IIIA (Digital Instruments). All samples were characterized in a tapping mode under ambient conditions, using a commercially available Si_3N_4 tip with a radius of approximately 10–15 nm. Scans of $500\text{ nm} \times 500\text{ nm}$ were performed at various surface positions to check the surface uniformity. The average root-mean-square (RMS) roughness was evaluated before and after sample submersion in water for 2 h. The AFM images are processed using the freely available WSxM software. Water contact angles were measured and surface free energies calculated using a GBX Digidrop and the manufacturer-supplied software. The analysis was performed typically 1 h after

deposition using $10\text{ }\mu\text{L}$ deionized water droplets. The plotted values were averaged from five different substrates for each sample and four measures for each substrate. For the surface free energy evaluation, the same procedure was applied for three other liquids, namely glycerol, diiodomethane, and hexadecane. Polar and dispersive components of the surface energy were calculated according to Owens and Wendt,^[24] while the basic and acidic components were determined using van Oss method.^[25]

The primary amine groups on the polymer surface were specifically detected using fluorescence labeling. Fluorescamine solution was prepared in dry acetone to a final concentration of $0.25\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The samples were immersed in the solution for 5 min, and then washed twice with water and once with ethanol. The fluorescence detection was carried out in 0.2 M borate buffer (pH 9.0) at 390 nm excitation wavelength (emission at 475 nm). Fluorescence emission was detected with a Microscope Leica DM IRE2, equipped with A4 filter and Leica DFC 300FX camera. The surface primary amine density was determined by UV-Visible absorption spectroscopy using Perkin-Elmer Lambda 800 UV-VIS Spectrophotometer. The acquired data were processed by the manufacturer-supplied software. 4-Nitrobenzaldehyde (4-NBA) was used as a chemical tag. It reacts specifically with primary amine to form a Schiff base. A reversible reaction can be obtained by hydrolysis. This reaction has already been used for amine quantification on aminosilane thin films.^[26] The same procedure is used here with some changes. ppAA-coated Si substrates were immersed in 2 mM 4-NBA solution prepared in anhydrous ethanol to which $20\text{ }\mu\text{L}$ acetic acid were added, and allowed to react for 4 h at 50°C . It is to note that the exposition of ppAA films to temperatures below 150°C has no significant effect on the amine groups content.^[27] The samples were then washed twice with anhydrous ethanol, hexane, and methanol 5 min each sequentially and dried under a nitrogen stream. For the absorption spectroscopy analysis, each sample was immersed in 3 mL of deionized water containing $4\text{ }\mu\text{L}$ acetic acid for 15 h at 50°C . The solution after hydrolysis was then used to measure the absorption intensity of 4-NBA at 267 nm. To obtain a correlation curve for absorption intensity versus 4-NBA concentration (Beer's law), solutions with different concentrations of 4-NBA were analyzed. The calculated absorption coefficient ($\epsilon_{267} \approx 14\,600\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) was used to determine the amount of $-\text{NH}_2$ groups on the known surface area of the substrates. As a control, five Si unmodified substrates underwent the same characterization process. The primary amine concentrations were evaluated after subtraction of the control absorbance. Samples prepared with various RF powers were analyzed similarly to study the amine density changes as a function of input power.

Results and Discussion

Thin Film Chemical Composition

The chemical composition of the deposited films depends essentially on how the polymerization mechanism occurs. In this work, allylamine plasma polymerization occurs in the presence of argon flow. The later serves for surface cleaning of the substrates through a short pre-treatment, for plasma stabilization and as gas carrier to facilitate the

monomer entrance. The plasma polymerization proceeds as follows. The electrical potential generated in the plasma chamber provides a kinetic energy to the charged species (electrons, ions). Various kinds of radicals and positive ions are formed by collision between energetic electrons and neutral species (atoms, radicals, molecules) especially monomer molecules. These are fragmented and rearranged, and then the resulting radicals undergo recombination to form larger molecules. The deposited coating structure was investigated by FTIR spectroscopy and XPS analysis. FTIR spectra from films polymerized at 17 and 25 Pa monomer partial pressure with constant input power at 75 W are shown in Figure 2. Strong absorption peaks were observed at $3\,500\text{--}3\,100\text{ cm}^{-1}$ attributed to stretching vibrations of amine groups, and at $2\,800\text{--}3\,000\text{ cm}^{-1}$ attributed to the stretching vibration of aliphatic C–H groups. The third important band appears around $1\,660\text{ cm}^{-1}$ and can be assigned to the bending modes of primary amine groups and the imine stretch vibrations. Additional features with weak narrow lines are observed. That includes two peaks in the $1\,350\text{--}1\,470\text{ cm}^{-1}$ region, which correspond to C–H bending vibrations, and a band in the $2\,100\text{--}2\,250\text{ cm}^{-1}$ region that pertains to absorptions of nitrile $\text{C}\equiv\text{N}$ stretch vibrations. The O–H stretch vibration bands which are expected at $>3\,500\text{ cm}^{-1}$ are overlapped by the neighboring amine peaks.

Furthermore, the comparison of the spectra (a) and (b) on Figure 2 shows clearly that the monomer partial pressure 25 Pa provides films with high amine ratio (–NH) in respect to –CH groups. This result is explained by the fact that the high monomer partial pressure decreases the energy input per unit mass of monomer. Hence, the monomer is less fragmented and functional groups are more preserved. The most interesting for us is to obtain polymers with sufficient and controllable amount of reactive functional groups for

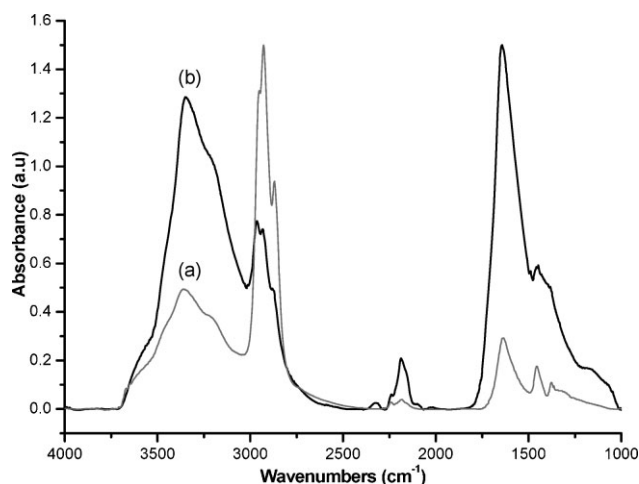


Figure 2. FTIR absorption spectra of the ppAA films, deposited at 75 W with (a) 17 Pa or (b) 25 Pa monomer partial pressure and 30 min deposition time.

Table 1. Peak assignments in the infrared spectra of the allylamine monomer and ppAA films.

Material	Peak position cm^{-1}	Assignments ^{a)}
Allylamine monomer	3 500–3 300	$\nu(\text{N–H})$ (three peaks)
	3 100–3 000	$\delta(\text{C–H})$ in ($=\text{CH}_2$ and $=\text{CH–}$)
	1 720	C=O
	1 694, 1 642	$\nu(\text{C=C})$
	1 842	CH_2
	1 422	CH_2
	1 284	CH
	1 000–1 250	C–N
	996	CH
	916	CH_2
ppAA	3 600–3 400	$\nu(\text{O–H})$, H-bonded OH
	3 363	$\nu_{\text{as}}(\text{N–H})$
	3 198	$\delta(\text{N–H})$
	2 948	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
	2 928	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
	2 870	$\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$, $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$, $\nu(\text{C–H})$ in ($-\text{CH=NH}$)
	2 182	$\nu(\text{C}\equiv\text{N})$
	1 635	$\nu(\text{C=N})$, $\delta(\text{N–H})$, $\nu(\text{C=C})$
	1 456	$\delta(\text{CH}_2)$
	1 374	$\delta(\text{CH}_3)$

^{a)}The assignments of the infrared absorptions are based on ref.^[20,34,35]. ν , stretching; δ , bending; subscript a, asymmetric; subscript s, symmetric mode.

further biological applications. So, to study the effect of input RF power on the film properties, the monomer partial pressure of 25 Pa has been adopted for all the following experiments. Table 1 shows the infrared chemical bands and related wavenumbers of the allylamine monomer ($\text{CH}_2=\text{CH–CH}_2\text{–NH}_2$) and the ppAA films at 75 W. The comparison shows that three important events occurred during the polymerization: the disappearance of a peak at $1\,694\text{ cm}^{-1}$, the absence of peaks at $3\,000\text{--}3\,100\text{ cm}^{-1}$ and $1\,000\text{--}1\,250\text{ cm}^{-1}$, corresponding to $\nu(\text{C=C})$ bands, $\delta(\text{C–H})$ bands of alkene ($=\text{CH}_2$ and $=\text{CH–}$), and C–N bending in the monomer, respectively. Additional changes concern the disappearance of the peaks at $1\,284$, 996 , and 916 cm^{-1} , assigned to $=\text{C–H}$ bending. The electron density of radio-frequency glow discharge (RFGD) plasma for the work pressure used here is in the range of $10^9\text{--}10^{11}\text{ cm}^{-3}$, with

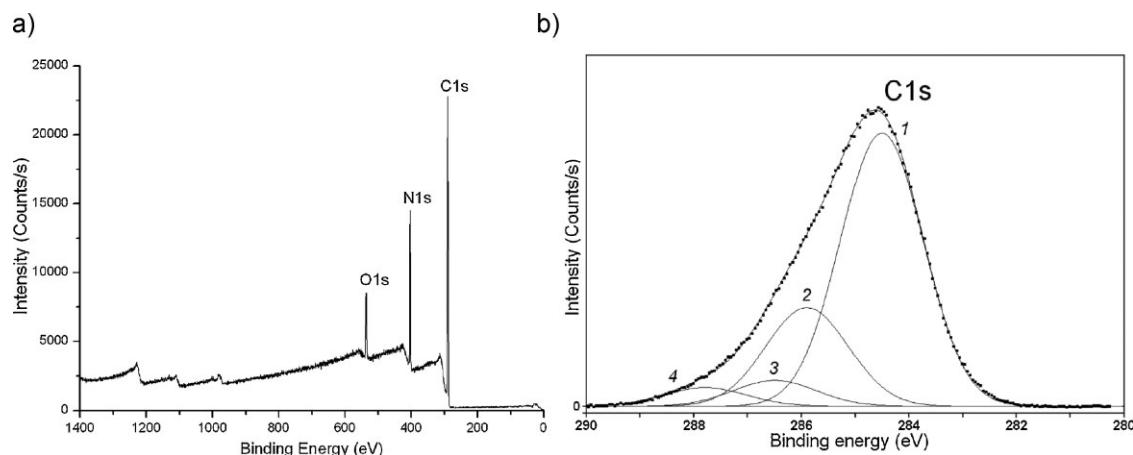


Figure 3. (a) XPS survey spectrum and (b) C 1s detailed spectrum of ppAA film deposited at 75 W and 25 Pa monomer partial pressure. The decomposition is obtained using the full width at half maximum (FWHM) of 1.81 eV. Four components are defined: (1) C–C, C–H; (2) C–N; (3) C–O, C=N; and (4) C=O, O=C–NH.

electron energies varying from 1 to 10 eV.^[28] These values are sufficient to break any molecular bond. Therefore, the observed changes indicate the important fragmentation degree and re-organization of the broken monomer units leading to a complete conversion of some bands and the appearance of other bands, like nitrile (C≡N) stretching vibration at around 2182 cm^{-1} . As a result, polymers with additional functional groups are formed. Additional mechanism was already described to explain the results reported above. The appearance of bands at around 2185 cm^{-1} suggests hydrogen abstraction from carbon and nitrogen atoms, leading to a partial transformation of amine functionalities into amide, imine, or nitrile groups. This mechanism has been already reported in the literature for various organic monomers.^[29–35]

X-ray photoelectron spectroscopy measurements with spectra fitting can provide reliable information about the atomic composition and chemical bonds concentrations. The XPS elementary analysis (Figure 3) shows that ppAA film prepared at 75 W input power is composed of carbon (72.3%), nitrogen (21.8%), and oxygen (5.9%), whereas the monomer contains 75% carbon and 25% nitrogen (without considering hydrogen atoms). The film presents three important features comparing to the monomer: the decrease in carbon content, a slight decrease of the N/C ratio from 0.33 to 0.30, and oxygen appearance. Oxygen atoms which are not present in the monomer are probably incorporated in the polymer from residual oxygen in the deposition chamber and by oxidation reaction of unstable functional groups after exposition to the ambient atmosphere. More details on the chemical bonds environment are obtained by high resolution XPS spectra. The C 1s spectral decomposition revealed the presence of hydrocarbon peak (C–C, C–H) at 284.5 eV, amine groups (C–N) that might be primary, secondary, or tertiary at 285.9 eV,

C–O/C=N/C–N at 286.5 eV, and carbonyl (C=O) and/or amide (O=C–NH) at 287.8 eV. These results are in agreement with the FTIR spectrum data.

The ppAA films structure can strongly change according to the applied RF power. Infrared spectra of polymerized allylamine at different wattage and constant monomer flow rate are shown in Figure 4. It can be seen that the intensity of the peak ratios NH/CN and NH/CH decreases similarly with enhanced power, whereas the ratio CN/CH remains relatively unchanged. As reported previously, higher RF power induces more monomer fragmentation than low power, leading to lower amine density. At low discharge power, –NH groups seem to be the dominant moieties in the film. Increase in power leads to extensive monomer fragmentation and hydrogen abstraction.

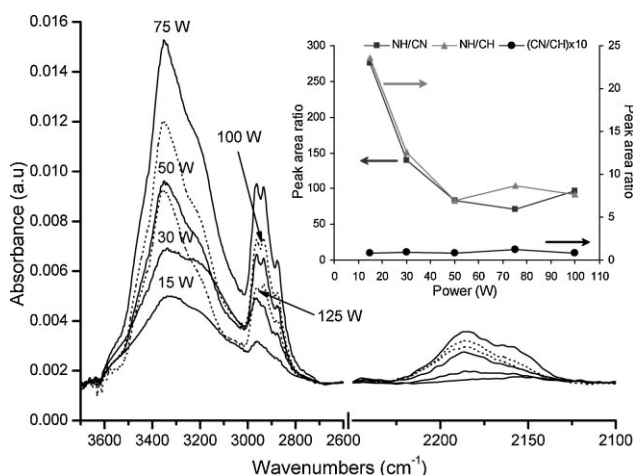


Figure 4. FTIR absorption spectra of ppAA as a function of applied RF power. The films were deposited at constant monomer pressure (25 Pa) and 10 min deposition time. The inset represents the area ratios of the main IR absorption peaks in respect to RF power.

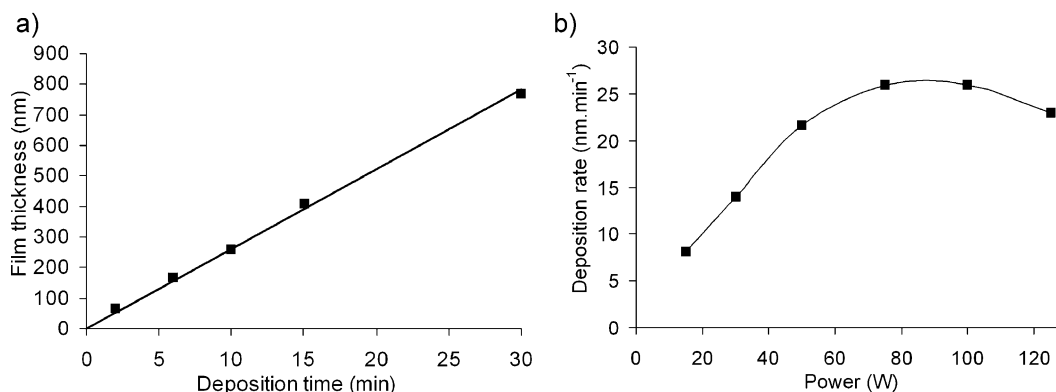


Figure 5. Evolution of the measured ppAA film thickness in respect to (a) the deposition time at 75 W, 190 Pa work pressure, 25 Pa monomer partial pressure and (b) the deposition rate as a function of discharge power at the same pressure conditions.

Consequently, more primary amine groups were converted to imine and nitrile groups. Transition power is observed around 50 W. This point reflects the inversion of the correlation of functional groups content in respect to the wattage. This transition is also found for contact angles, surface free energies, and the evolution of primary amine content versus applied power as it can be seen below.

Plasma Polymerized Allylamine Deposition Rate

The thickness of ppAA layers was measured as a function of deposition time, while the deposition rate was measured in respect to the discharge power. Figure 5 shows that thickness increased linearly with time, within at least 30 min. This allows the preparation of films with thickness ranging from few nanometers to several hundred nanometers. It is to note that the plotted values represent the average thickness taken from four samples processed at the same conditions. The deposition rate is given by the linear curve slope. Likewise, the deposition speed at different RF powers was determined. It clearly appears that input power variations cause significant changes in the deposition rate. The rate increases with increasing power (from 15 to 75 W), and remains relatively unchanged between 75 and 100 W. Further increase of power leads to a decrease of the deposition rate. This can be explained by the competition of two important processes: plasma polymerization including fragmentation, re-arrangement, and recombination on one side and plasma ablation on the other side.^[29] The growth rate increases almost linearly at 15–50 W, then tends to stabilize when all available monomer is excited and/or ionized. At the power range 75–100 W, equilibrium is achieved between the two mechanisms. Finally, the deposition rate decreases gradually when the ablation becomes dominant at high power. Moreover, the plasma polymerization can occur either in the gas phase or on the substrate surface according to the input power. It is already

reported that at a low input power/monomer pressure ratio, plasma polymerization proceeds mainly on the substrate surface by plasma-induced reaction of allylamine molecules with surface radicals, which gives partially rise to the linear evolution observed between 15 and 50 W.^[28,29] The maximum deposition rate reached in this work is $26 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, which is approximately 4–5 times higher than the values reported by other authors^[30–33] and 50 times higher than that described by Choukorouv et al.^[34] This result could be mainly explained by two points: (i) the applied monomer partial pressure (25 Pa) is higher than that used in the mentioned literature. The high mass of allylamine precursor molecules contained in the reactor volume increases the mass transfer rate on the surface, and the use of high power affords high plasma density of free radicals, allowing a relatively high deposition rate; (ii) the work pressure (165 Pa $\approx$ 1.2 Torr) is also relatively high. This increases the electron density and ionization when sufficient power is applied. A deposition test performed at lower work pressure (75 Pa) revealed a significant decrease of the deposition rate, indicating the positive role of the applied pressure. Additional influences could rise from the electrodes configuration and the plasma temperature.

Polymer Behavior in Aqueous Media

Since the biological applications of plasma polymers concern reactions occurring in aqueous media, it was of great importance to investigate the stability of these films during water exposure. The behavior of plasma polymer in aqueous environment is affected by several parameters including the polymer molecular weight and thickness, plasma deposition conditions, and the nature of the solution. A review of this theme is provided by Miller-Chou and Koenig.^[36] Because solution pH and ion composition could affect the polymer behavior,^[17]

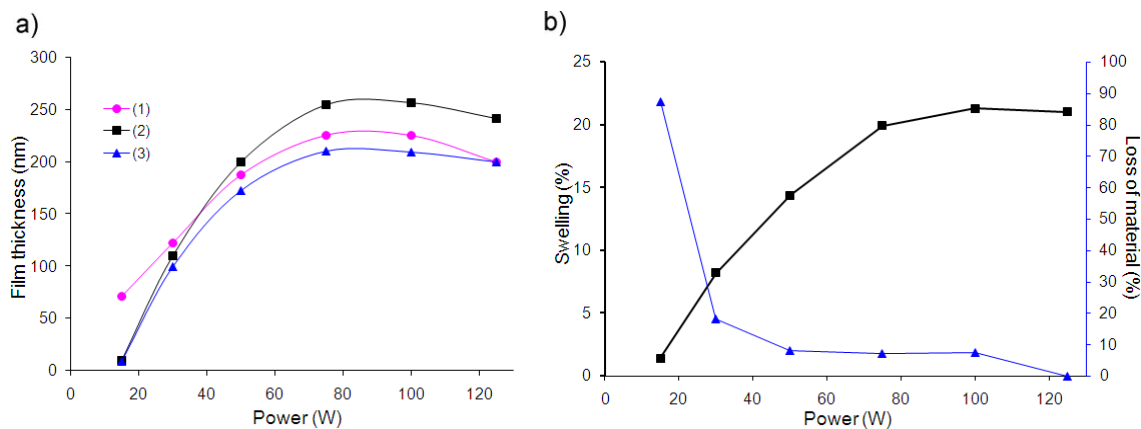


Figure 6. Behavior of ppAA films in aqueous environment as a function of RF plasma power. (a) Thickness of ppAA film as deposited (1), after submersion in water (2), and after heating treatment (3). Each plotted thickness represents the average value of four samples with a standard deviation of ± 2 nm. (b) Swelling (T_s) and loss of material (T_l) caused by water submersion, represented by the percentage of thickness change.

deionized water is used in the following experiment. That allows the limitation of the contributing factors. ppAA films are submersed in water and thickness changes were measured as a function of RF power (Figure 6a). A significant increase in thickness is observed. This is mainly due to the polymer network swelling. The obtained thickness (T_1) after water submersion could be considered as the resultant of both the increase in thickness, i.e., swelling (T_{swell}) and the decrease caused by the loss of material (T_{loss}). Therefore, T_1 could be written as

$$T_1 = T_0 + T_{\text{swell}} - T_{\text{loss}} \quad (1)$$

where T_0 represents the thickness of the film as deposited.

However, the subsequent heating of the swollen films at water boiling temperature reveals a decrease in thickness comparing to the film after submersion. It is to note that the reference samples show no significant changes after heating even for 30 min, suggesting that the observed decrease is mainly due to water evaporation. This means that heating eliminates the effect of swelling. Hence, the thickness of the film (T_2) after submersion and heating at 100 °C could be expressed by

$$T_2 = T_1 - T_{\text{swell}} \quad (2)$$

From Equation (1) and (2), we can write: T_{swell} (nm) = $T_1 - T_2$, and T_{loss} (nm) = $T_0 - T_2$.

The results of T_{swell} and T_{loss} measurements are reported in Figure 6b as percentage of thickness change in respect to the thickness of the film as deposited (T_0).

The film swelling and loss of material are reported to be essentially related to the cross-linking degree and thickness of the polymer network.^[10,36–38] Two main phenomena contribute to the loss of material: the dissolution process, e.g., hydrolysis of low molecular weight material non-

covalently bonded to the film matrix; and the washing out of the uppermost polymer layer. The later could be relatively easily washed away because of two main reasons. First, it is partially composed of non-polymerized molecules deposited after the plasma had been extinguished. Second, it was subjected to plasma discharge (particle bombardment, UV irradiation) for a shorter period of time than the bulk film, and then presents likely a lower cross-linking degree. However, this layer would present a different structure and thickness following the applied RF power, which could then help to explain the different behavior observed for the different samples.

Data displayed in Figure 6 show a dependence of both the swelling and the loss of material on RF input power. The swelling degree increases with increasing power and remains steady over 75 W at approximately 20–21% of the film thickness. This trend is highly affected by the increasing thickness of ppAA films.^[36,37] When plasma films are deposited at low power (15 W), around 87% of the film is washed away from the substrate and no significant swelling is observed. The absence of swelling is likely due to the small thickness of the film, while the substantial loss of material is related to a high amount of hydrophilic nitrogen components and more soluble or non-covalently bonded material. Over 50 W, the loss of material stabilizes at around 7–8% of the film thickness. This relatively low value is associated with the decrease of hydrophilic component as shown by surface energy measurement and the increase of hydrocarbon component as reported by FTIR results. These data suggest a film with a high cross-link density and more rigid polymer network. Plasma films deposited at 125 W present no significant loss of material. Besides the high cross-link density of the bulk polymer, this could be explained by the fact that the uppermost layer is more stable and contains negligible unbonded or soluble material because of the increased plasma etching rate.

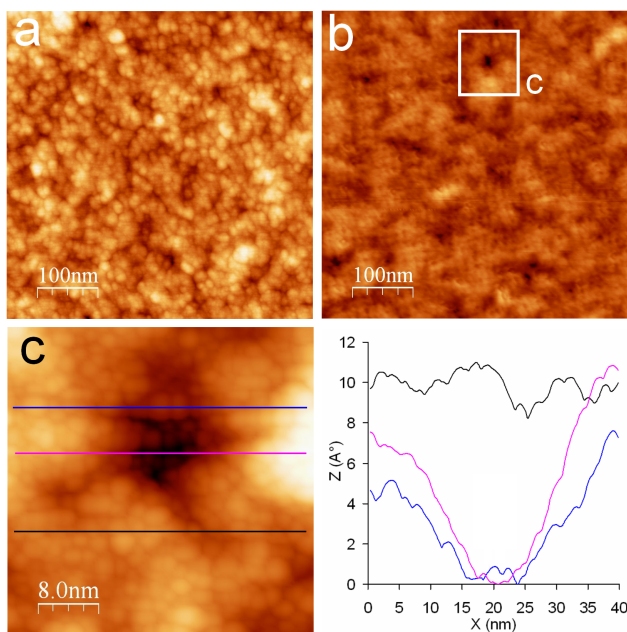


Figure 7. AFM images of the ppAA polymer surface (a) before and (b) after 4 h of immersion in aqueous solution. (c) represents a zoom in a hole caused by water submersion. The polymerized film seems to be formed by small clusters of approximately 1–2 nm. Films are deposited at 75 W, 25 Pa monomer partial pressure and 10 min deposition time.

This statement is consistent with the decreasing deposition rate at this wattage as described previously. Considering all these results, the optimum stability under aqueous environment is obtained at ≥ 50 W plasma power.

Polymer Surface Properties

Atomic force microscopic analysis was used to investigate the surface topography of films deposited at 75 W for 10 min (Figure 7). The roughness of ppAA samples was measured at $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm}$ scan size. The results show a continuous film of (0.35 and 3.13 nm) RMS roughness and

peak to valley (P-V) distance, respectively. All the values were reported with a standard deviation of (± 0.02 and ± 0.04 nm) for the two parameters, respectively. After immersion in water, ppAA samples show two important changes: the first is the decrease of the surface roughness to 0.25 and 2.16 nm. It is interesting to note that the RMS value is not significantly different from that obtained for oxidized Si substrate (0.24 and 1.78 nm), which means that the film surface is highly smooth and the observed roughness is likely due to the replication of the Si substrate surface. The smooth topography indicates that the plasma polymerization occurred essentially on the substrate surface, rather than in the gas phase.^[29,32,34] The decrease of the surface roughness is mainly due to the washing out of the uppermost layer of the film (≈ 17 nm) as evidenced previously. This layer is weakly cross-linked and partially formed by oligomeric and non-polymerized molecules, which could increase the surface roughness. Moreover, the uppermost layer is directly exposed to ion bombardment, generating some additional roughness. This could explain the decrease observed after the polymer washing, giving access to a more cross-linked and less rough surface. The second modification is the appearance of nanometric holes of 5–30 nm width and 1–2 nm deep on the polymer surface, consistent with the measured P-V distance (Figure 7). The nanoholes formation could be explained by the same reason described above, with a contribution from the hydrolysis of non-covalently bonded material. Furthermore, AFM images show that the ppAA film appears to be composed of smooth hill-type morphologies of approximately 1–2 nm. Considering the roughness values, these morphologies could originate from interfacial phenomena during the first stages of the plasma polymerization on the substrate surface and/or the replication of the Si substrate structure. More investigations are needed to clarify this aspect.

Contact angles and surface free energies of ppAA films deposited at different input powers were measured by the static sessile drop method. It is clearly shown in Figure 8

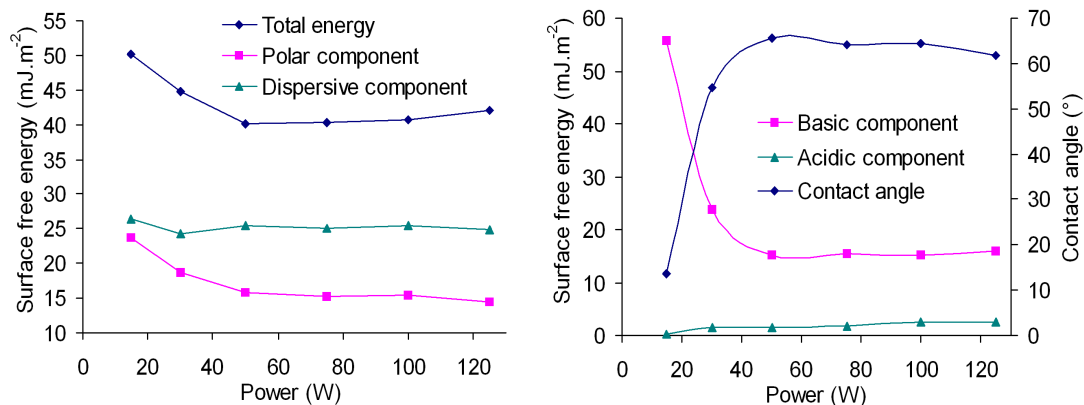


Figure 8. Water contact angle and surface free energy of ppAA as a function of discharge power. Films are deposited at 75 W, 25 Pa for 10 min.

that at lower values of power, ppAA presents the highest total free energy ($50.1 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$) and consequently the lowest contact angle ($<10^\circ$). While the first decreases, the last increases with increasing power, and both remain constant at 41 ± 1 and $63 \pm 2^\circ \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$, respectively, over a power value of 50 W. Based on Owens/Wendt theory,^[24] it is very interesting to observe that the decrease in the surface free energy is almost entirely due to the polar component change. The later could be separated into basic and acidic components, according to van Oss Theory.^[25] That corresponds mainly to amine, hydroxyl, carbonyl, and possible carboxyl functionalities. The analysis reveals that only basic component varies, while the acidic part remains relatively unchanged. These observations suggest that plasma discharge power affects the ppAA surface energy by changing the density of amine functions. This result corroborates the FTIR spectra data. After 6 days of storage in silica gel desiccator, the contact angles of all the prepared films converge to one value around 62° . This change is likely due to the turnover of the polar groups from the surface to the bulk.^[39] It is to note that the contact angles of films prepared at discharge power ≥ 50 W are very close to those obtained after aging, which means that these films are more stable over time.

Primary Amine Detection and Quantification

The presence of primary amines on the polymer surface was observed using fluorescence microscopy.^[40] The fluorescence labeling method was found to be very sensitive. A detection limit close to $10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ was reported.^[41] Fluorescamine was used as labeling agent. It was prepared in organic solvent because of its rapid hydrolysis in aqueous media. At pH 8–9, fluorescamine reacts instantaneously with many nucleophiles including primary aminogroups, secondary amines, and alcohols. However, only the reaction with primary aminogroups affords a highly fluorescent compound.^[42] Figure 9 displays images of ppAA films after immersion in deionized water (a) and acetone (b, c) for 2 h. The film fluorescence confirms the presence of primary amine groups and suggests their uniform distribution on the surface. It can also be seen that the films peeled off

partially forming irregular network patterns. This is mainly due to a weak adhesion of the polymer on the silicon surface and its high affinity to the solvents. This phenomenon represents a real hindrance for further investigations or applications on solutions. To overcome this problem, all the following deposition experiments were preceded by UV light-Ozone treatment of the substrates. Figure 9(c) shows clearly that this treatment strongly improves the adhesion effect by increasing the surface free energy. In fact, contact angles decrease from 56° to less than 10° within 20 min for Si substrates and remain stable for at least 1 h. As a consequence, films with a good adhesion can be obtained on silicon surface, on polymers, or as interfacial films between Si and a second plasma polymer, as shown in Figure 10. These films exhibit sufficient adhesion and stability to enable long analysis procedures in aqueous media.

To determine the surface density of primary amines, ppAA films underwent a chemical derivatization reaction. 4-NBA is used as a labeling agent that can be detected by UV-Visible absorption spectroscopy. The absorbance of 4-NBA molecules corresponding to the reactive amine functionalities on the polymer surface appeared at around 267 nm. The obtained values were referred to the surface of the substrates. The primary amine concentration calculated by this traditional method, could be considered as the apparent density. The $-\text{NH}_2$ density was plotted as a function of input power. As expected, it can be obviously observed in Figure 11 that amine density decreases significantly with increasing power, going from $18.3 \text{ NH}_2 \cdot \text{nm}^{-2}$ (for 71 nm film thickness) at 15 W to $4.4 \text{ NH}_2 \cdot \text{nm}^{-2}$ (for 226 nm film thickness) at 75 W. Over this value, the amine density remains relatively steady at a lower value. This is probably due to the fact that fragmentation/recombination reaction reached its optimum, in agreement with the FTIR results. The higher value of $-\text{NH}_2$ contents at low energy (15 W) can be explained by a very low fragmentation rate allowing the deposition of relatively intact allylamine monomers and free radical additions to the carbon-carbon double bond. Despite the amine enrichment, these films are usually uninteresting because of their instability in water and their low cross-linking as described previously. Considering the swelling experiment results, it is obvious that the most interesting

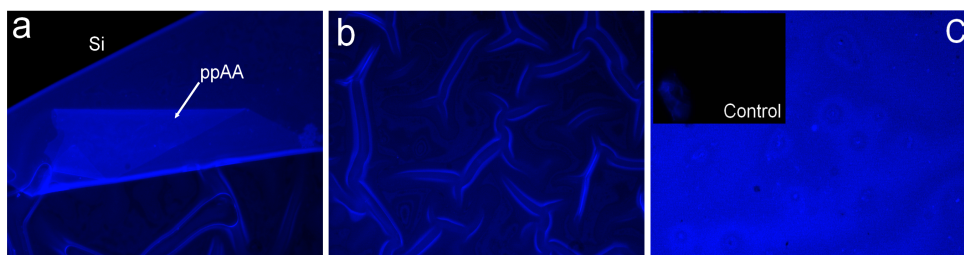


Figure 9. Fluorescence labeling of primary amine groups on the ppAA surface. Fluorescamine reacts with the amine groups affording a fluorescent product (in blue). Films (a, b) before and (c) after UV light-Ozone treatment for 20 min can be seen.

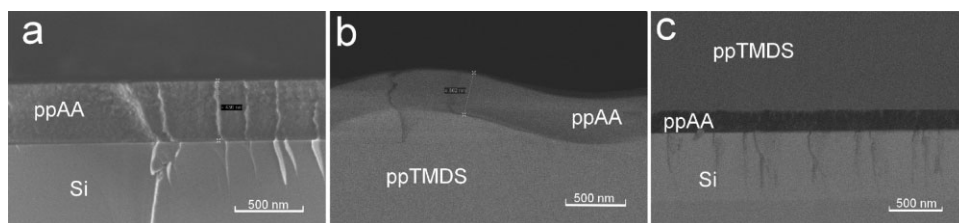


Figure 10. SEM images of a cross-sectional view of ppAA films. The films were deposited (a) on a silicon substrate, (b) on plasma polymerized TetraMethylDiSiloxane (ppTMDS) film, and (c) in a sandwich-like structure between a silicon substrate and a ppTMDS film.

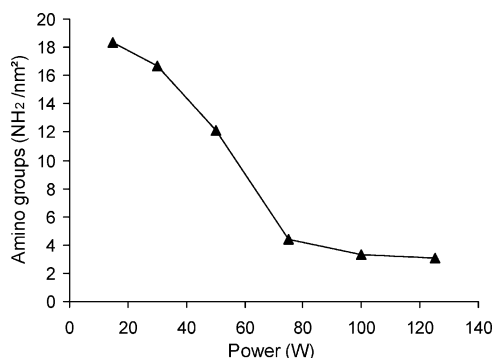


Figure 11. Apparent primary amine density on ppAA films as a function of discharge power.

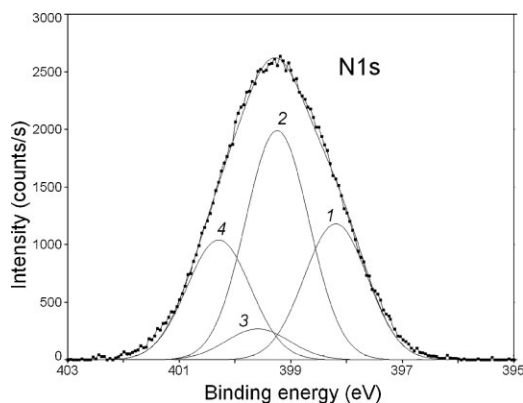


Figure 12. High resolution N 1s XPS spectra of ppAA surface deposited at: 75 W, 25 Pa for 10 min. The FWHM value was set at 1.34. The peak is resolved into four components: (1) C–N=C type bonds, (2) aliphatic (unprotonated) amines, (3) nitriles, and (4) O–CO–N with a possible contribution from CO–N–CO.

films are those prepared around 50 W. XPS measurements were also used to investigate the chemical environments of nitrogen atoms on the polymer surface. As shown in Figure 12, high resolution N 1s spectrum is fitted by four main components: the low energy component at 398.2 eV is generally assigned to C–N=C groups, while the peak at a binding energy 399.3 eV is assigned to aliphatic (unprotonated) amines. The later is the major component with

approximately 45%. The third peak at 399.6 eV is attributed to nitriles. The peak at 400.3 eV is due mostly to O–CO–N with a possible contribution from CO–N–CO. The different peaks were assigned according to the data found in the literature.^[43–50] To estimate the part of reactive amines, the samples underwent glutaraldehyde derivatization. Glutaraldehyde is used here as a labeling molecule. It reacts instantaneously with primary amine groups to form imine bonds in a reversible manner. Cyanoborohydride treatment reduces the intermediate imine bonds forming more stable amino links. The later presents sufficient stability to withstand the washing steps and avoid glutaraldehyde leakages. Changes in C 1s XPS spectra of the film surface are compared to the composition of untreated films (Table 2). The results reveal a decrease of C–N groups by around 49.4% for the treated sample, in respect to the untreated one. This is accompanied by an increase of C=N moieties with approximately the same concentration (47.5%). This result suggests that about a half of the amines on the polymer surface reacted with glutaraldehyde and are presumably primary amine groups, which are in agreement with N 1s decomposition results. The increase of C=O concentration from 4.4 to 7.7% can be explained by the presence of terminal free carbonyl groups of bonded glutaraldehyde.

Based on the atomic concentration of nitrogen (21.8%) and considering all the results described above, we can assume that primary amine groups represent around 15 NH₂ per 100 carbon atoms for a film deposited at 75 W input power with the experimental conditions described previously.

Table 2. Chemical bond contents in the ppAA layer before and after derivatization treatment with glutaraldehyde.

	Si-ppAA	
	Untreated	Treated
C–C, C–H (%)	65.9	71.4
C–N	23.6	12.0
C–O, C=N	6.1	9
C=O	4.4	7.7

The rare works that tried to quantify primary amine on ppAA reported a density of $3\text{--}12\text{ nm}^{-2}$,^[15,16,51] or $6\text{--}16$ amine per 100°C atoms,^[34,52] which are in the same order of the values obtained here. However, it is not easy to compare closely the different results reported in the literature because of three main differences: (i) plasma conditions, including the reactor geometries and polymerization parameters; (ii) specificity and reliability of the adopted characterization technique. A method could be efficient for one type of polymer and not for another depending on the interactions of the labeling molecule with the polymer surface, and two different methods could provide different results on the same polymer sample;^[53] and (iii) the thickness of the analyzed layer. The last parameter can be limited either by the thickness of the deposited film or by the analysis depth of the characterization technique (e.g., typically 10 nm for XPS). The last parameter will be investigated in a forthcoming paper.

Conclusion

Plasma polymerized allylamine thin films have been deposited in CW RFGD reactor. The UV light-Ozone treatment of the substrate surface prior to deposition seems to improve the adhesion and provide stable coating in aqueous media. The films were investigated using a large panel of spectroscopic, microscopic, and derivatization techniques, following the applied RF power. The results show a high dependence of the surface properties and layer composition on the plasma wattage, with a transition power around 50 W . This suggests that the reactive functional groups density can be controlled by appropriate operational plasma parameters, especially input power. Hence, films with the desired amine concentration can be produced. The films presenting the best features for biomedical applications are those deposited between 50 and 75 W , which represents the transition power distinguishing two deposition modes. In fact, these films display four important properties: (i) they are deposited at a high growth rate ($26\text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$), which allows the preparation of film thickness up to 800 nm ; (ii) present a high primary amine content ($5.5\text{ NH}_2 \cdot \text{nm}^{-2}$ or 15 NH_2 per 100 carbon atoms); (iii) show improved stability under water environment; and (iv) exhibit a good adhesion on different substrates and a good stability over time, with a constant water contact angle of around 60° . In addition, AFM analysis shows a highly smooth and continuous film composed of nanometric hill-type clusters ($\sim 1\text{--}2\text{ nm}$). All over this work, the influence of the film thickness on the obtained results remains a recurring question. Further work will clarify the contribution of the bulk structure on the measured parameters, especially the primary amine density.

Acknowledgements: This work is supported by the *National Research Agency Funds* (contract ANR-05-NT05-2_46562) and the *Inter-disciplinary Research Program* of Lille University (PPF BioMEMS 2006 N° 1803).

Received: January 27, 2009; Revised: May 23, 2009; Accepted: July 6, 2009; DOI: 10.1002/ppap.200900016

Keywords: allylamine; plasma polymerization; primary amine groups; radio-frequency glow discharges (RFGD); thin film

- [1] C. O. Kima, S.-Y. Hong, M. Kim, S.-M. Park, J. W. Park, *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *277*, 499.
- [2] Y. Martin, D. Boutin, P. Vermette, *Thin Solid Films* **2007**, *515*, 6844.
- [3] X. Feng, J. Zhang, H. Xie, Q. Hu, Q. Huang, W. Liu, *Surf. Coat. Technol.* **2002**, *171*, 96.
- [4] J. Kim, D. Jung, Y. Park, Y. Kim, W. M. Dae, G. L. Tae, *Appl. Surf. Sci.* **2007**, *253*, 4112.
- [5] I. Gancarz, J. Bryjak, G. Pozniak, W. Tylus, *Eur. Polym. J.* **2003**, *39*, 2217.
- [6] P. A. Tamirisa, K. C. Liddell, P. D. Pedrow, M. A. Osman, *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *93*, 1317.
- [7] C.-G. Gölander, M. W. Rutland, D. L. Cho, A. Johansson, H. Ringblom, S. Jönsson, H. K. Yasuda, *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *49*, 39.
- [8] T. R. Gengenbach, H. J. Griesser, *J. Polym. Sci., Part A. Polym. Chem.* **1999**, *37*, 2191.
- [9] W. Besch, R. Foest, K. Schroder, A. Ohl, *Plasma Process. Polym.* **2008**, *5*, 105.
- [10] M. Tatoulian, F. Bretagnol, F. Arefi-Khonsari, J. Amouroux, O. Bouloussa, F. Rondelez, A. John Paul, R. Mitchell, *Plasma Process. Polym.* **2005**, *2*, 38.
- [11] P. Hamerli, Th. Weigel, Th. Groth, D. Paul, *Biomaterials* **2003**, *24*, 3989.
- [12] S. Swaraj, U. Oran, A. Lippitz, W. E. S. Unger, *Plasma Process. Polym.* **2008**, *5*, 92.
- [13] E. Sardella, P. Favia, E. Dilonardo, L. Petrone, R. d'Agostino, *Plasma Process. Polym.* **2007**, *4*, S781.
- [14] A. J. Beck, J. D. Whittle, N. A. Bullett, P. Eves, S. Mac Neil, S. L. McArthur, A. G. Shard, *Plasma Process. Polym.* **2005**, *2*, 641.
- [15] I. Gancarz, J. Bryjak, M. Bryjak, W. Tylus, G. Pozniak, *Eur. Polym. J.* **2006**, *42*, 2430.
- [16] F. Basarir, N. Cuong, W.-K. Song, T.-H. Yoon, *Macromol. Symp.* **2007**, *249*, 61.
- [17] Z. Zhang, Q. Chen, W. Knoll, R. Förch, R. Holcomb, D. Roitman, *Macromolecules* **2003**, *36*, 7689.
- [18] C. Dehili, P. Lee, K. M. Shakesheff, M. R. Alexander, *Plasma Process. Polym.* **2006**, *3*, 474.
- [19] A. Harsch, J. Calderon, R. B. Timmons, G. W. Gross, *J. Neurosci. Methods* **2000**, *98*, 135.
- [20] Q. Chen, R. Förch, W. Knoll, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 614.
- [21] Y. Xu, P. R. Berger, J. Cho, R. B. Timmons, *J. Electron. Mater.* **2004**, *33*, 1240.
- [22] H. Yatsuda, M. Nara, T. Kogai, H. Aizawa, S. Kurosawa, *Thin Solid Films* **2007**, *515*, 4105.
- [23] E. Szili, H. Thissen, J. P. Hayes, N. Voelcker, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1395.

- [24] D. K. Owens, R. C. Wendt, *J. Appl. Polym. Sci.* **1969**, *13*, 1741.
- [25] C.J. van Oss, „*Interfacial Forces in Aqueous Media*” Marcel Dekker New York 1994.
- [26] J. H. Moon, J. W. Shin, S. Y. Kim, J. W. Park, *Langmuir* **1996**, *12*, 4621.
- [27] A. Abbas, A. Treizebre, P. Supiot, N.-E. Bourzgui, D. Guillochon, D. Vercaigne-Marko, B. Bocquet, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 154.
- [28] P. K. Chu, J. Y. Chen, L. P. Wang, N. Huang, *Mater. Sci. Eng. R: Rep.* **2002**, *36*, 143.
- [29] H. K. Yasuda, „*Plasma Polymerization*”, Academic Press, New York 1985.
- [30] A. J. Beck, S. Candan, R. D. Short, A. Goodyear, N. St. J. Braithwaite, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5730.
- [31] F. Basarir, N. Cuong, W.-K. Song, T.-H. Yoon, *Macromol. Symp.* **2007**, *249–250*, 61.
- [32] A. J. Beck, S. Candan, R. M. France, F. R. Jones, R. D. Short, *Plasmas Polym.* **1998**, *3*, 97.
- [33] M. Lejeune, F. Brétagne, G. Ceccone, P. Colpo, F. Rossi, *Surf. Coat. Technol.* **2006**, *200*, 5902.
- [34] A. Choukorouv, H. Biederman, D. Slavinska, L. Hanley, A. Grinevich, H. Boldyryeva, A. Mackova, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23086.
- [35] V. Krishnamurthy, I. L. Kamel, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1989**, *27*, 1211.
- [36] B. A. Miller-Chou, J. L. Koenig, *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 1223.
- [37] Z. Zhang, Q. Chen, W. Knoll, R. Förch, *Surf. Coat. Technol.* **2003**, *174–175*, 588.
- [38] L.-Q. Chu, W. Knoll, R. Förch, *Langmuir* **2006**, *22*, 5548.
- [39] S. Kurosawa, K. Kobayashi, H. Aizawah, Y. Yoshimi, M. Yoshimoto, *J. Photopolym. Sci. Technol.* **1999**, *12*, 63.
- [40] V. B. Ivanov, J. Behnisch, A. Hollander, F. Mehdorn, H. Zimmermann, *Surf. Interface Anal.* **1996**, *24*, 251.
- [41] L. Locascio Brown, *Anal. Chem. Acta* **1990**, *228*, 107.
- [42] S. de Bernardo, *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *163*, 390.
- [43] W. M. Riggs, L. E. Davis, J. F. Moulder, G. E. Muilenberg, „*Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*”, C. D. Wagner, (Ed., Physical Electronics Eden Prairie, MN 1979.
- [44] M. R. Alexander, F. R. Jones, *Carbon* **1996**, *34*, 1093.
- [45] S. Souto, M. Pickholz, M. C. dos Santos, F. Alvarez, *Phys. Rev. B* **1998**, *57*, 2536.
- [46] C. Ronning, H. Feldermann, R. Merk, H. Hofsass, P. Reinke, J.-U. Thiele, *Phys. Rev. B* **1998**, *58*, 2207.
- [47] Y. Taki, T. Kitagawa, O. Takai, *Thin Solid Films* **1997**, *304*, 183.
- [48] L. W. Jenneskens, J. W. G. Mahy, E. J. Vliestra, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, *90*, 327.
- [49] A. Snis, S. F. Matar, *Phys. Rev. B* **1999**, *60*, 10855.
- [50] G. J. Papa, I. Bertotib, T. Szorenyic, P. Heszlenc, *Surf. Coat. Technol.* **2004**, *180*, 271.
- [51] D. A. Puleo, R. A. Kissling, M.-S. Sheu, *Biomaterials* **2002**, *23*, 2079.
- [52] J. G. Calderon, A. Harsch, G. W. Gross, R. B. Timmons, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42*, 597.
- [53] M. Ghasemi, M. Minier, M. Tatoulia, F. Arefi-Khonsari, *Langmuir* **2007**, *23*, 11554.

3.2 Polymère plasma d'allylamine: une matrice fonctionnelle tridimensionnelle

3.2.1 Rappel des conditions optimales de dépôt de ppAA

Dans toutes les manipulations qui suivent et dans les chapitres suivants, le film de ppAA utilisé est celui déposé dans les conditions optimales définies dans l'article précédent (Article 1). Ces conditions sont rappelées ici au regard de leur importance pour la compréhension de certains résultats de cette thèse. L'étude du comportement du film ppAA dans un milieu aqueux a permis de mettre en évidence un gonflement du polymère associé à une perte de matière (Figure 27). Ces deux phénomènes sont très dépendants des paramètres du plasma. Cette étude, ainsi que celle relative à l'analyse de la densité des fonctions amines ont permis d'identifier les conditions optimales suivantes du dépôt (puissance: 50-75 W, pression: 165 Pa, pression partielle du monomère: 25 Pa, débit d'argon: 250 sccm, température du monomère: 45 °C). Ces paramètres permettent d'obtenir un film présentant à la fois une bonne stabilité dans les milieux aqueux et une densité de fonctions amines primaires suffisante (Figure 28). Une telle stabilité est nécessaire pour pouvoir mener des analyses longues et répétées sur un même échantillon en milieu aqueux. C'est notamment le cas de la quantification des amines primaires en fonction de l'épaisseur du film que nous allons voir plus loin.

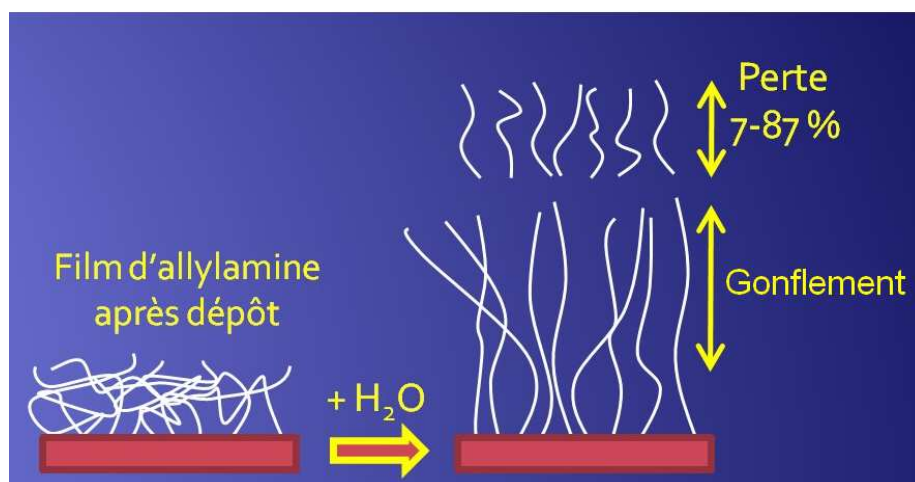


Figure 27. Schéma représentant le comportement du film d'allylamine en milieu aqueux.

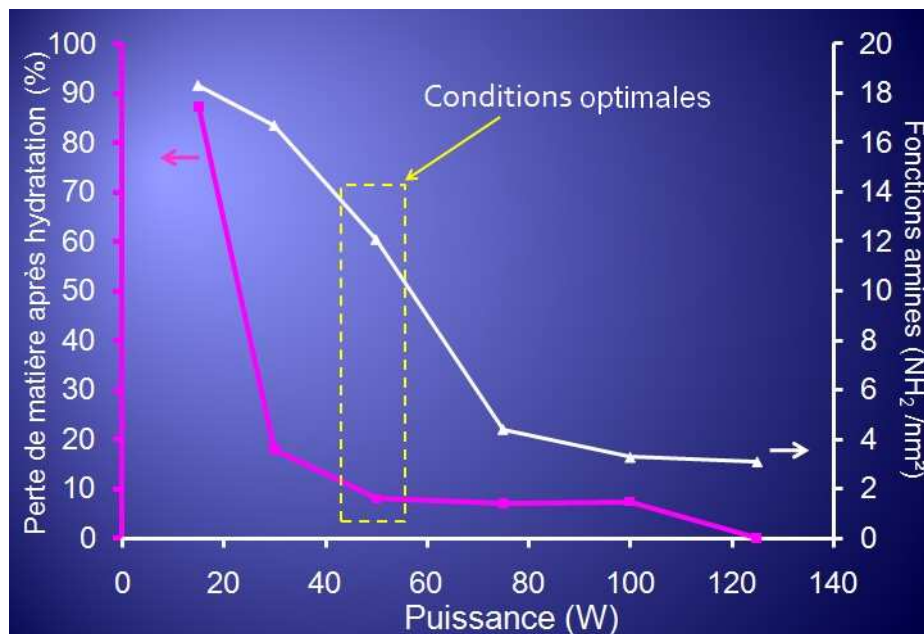


Figure 28. Graphe de l'évolution de la perte de matière après hydratation du ppAA ainsi que la densité des fonctions amines en fonction de la puissance RF injectée dans le réacteur plasma.

3.2.2 Fonctionnalisation de nanostructures par un polymère plasma d'allylamine

En plus de l'adhésion aux surfaces plus ou moins planes rapportée dans l'article 1, nous montrons ici que la fonctionnalisation de surface par plasma d'allylamine peut se faire aussi sur des surfaces micro- ou nanostructurées. Un premier test a été réalisé avec succès sur des nanofils de silicium (SiNW pour *silicon nanowires*), tel que montré par les figures 29 et 30. Nous pouvons observer que le film ppAA épouse parfaitement la forme des nanofils, avec la formation légère de nodules à leurs sommets. Ces nodules seraient principalement dus à une vitesse de croissance relativement plus importante aux sommets des nanofils, favorisée par une meilleure accessibilité de cette région aux molécules du plasma. La fonctionnalisation de nanostructures est particulièrement intéressante car elle offre une surface active beaucoup plus importante, et donc une capacité de charge et d'immobilisation de biomolécules largement supérieure à une surface non structurée. L'étude de l'activité des protéines immobilisées sur ces nanofils fonctionnalisés permettra probablement d'ouvrir plus de perspectives pour ce type de supports.

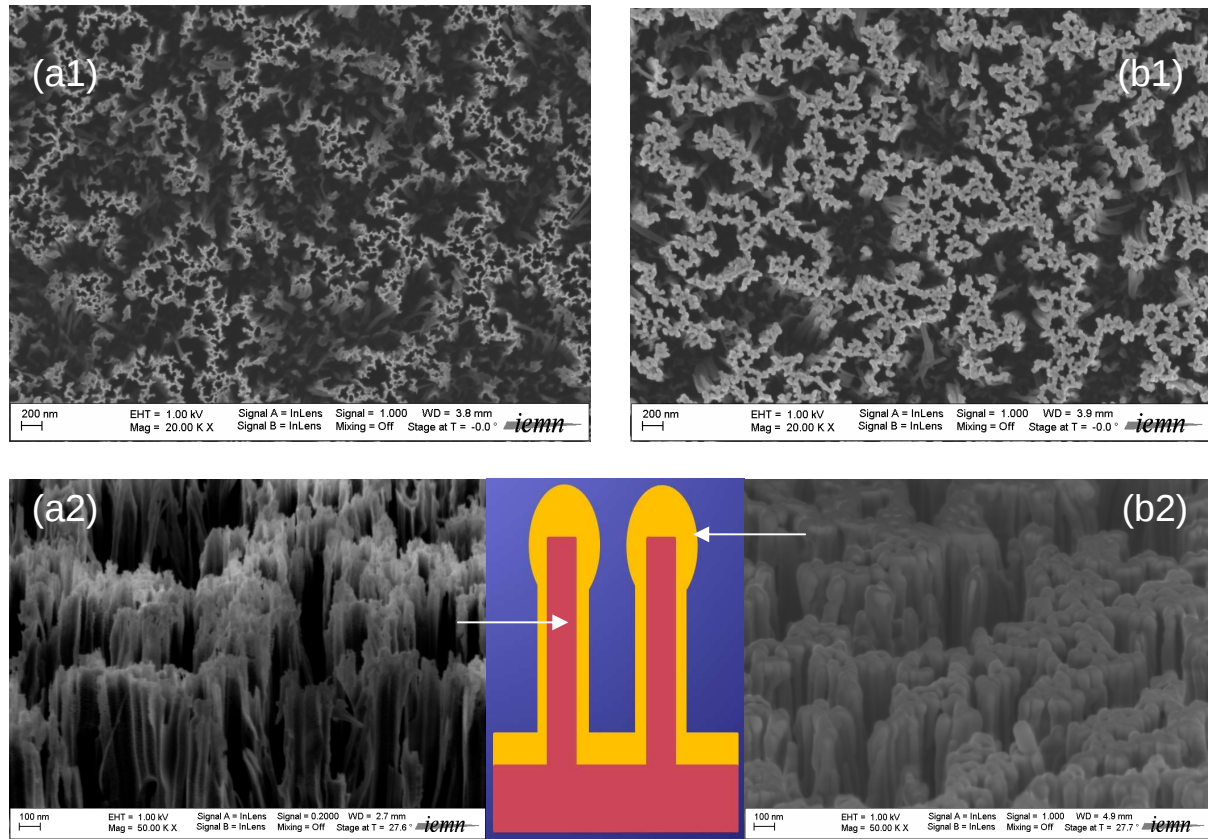


Figure 29. Images en microscopie électronique à balayage de nanofils de silicium avant (a1, a2) et après (b1, b2) fonctionnalisation par le polymère plasma d'allylamine (Coll. Gaëlle Piret, IRI).

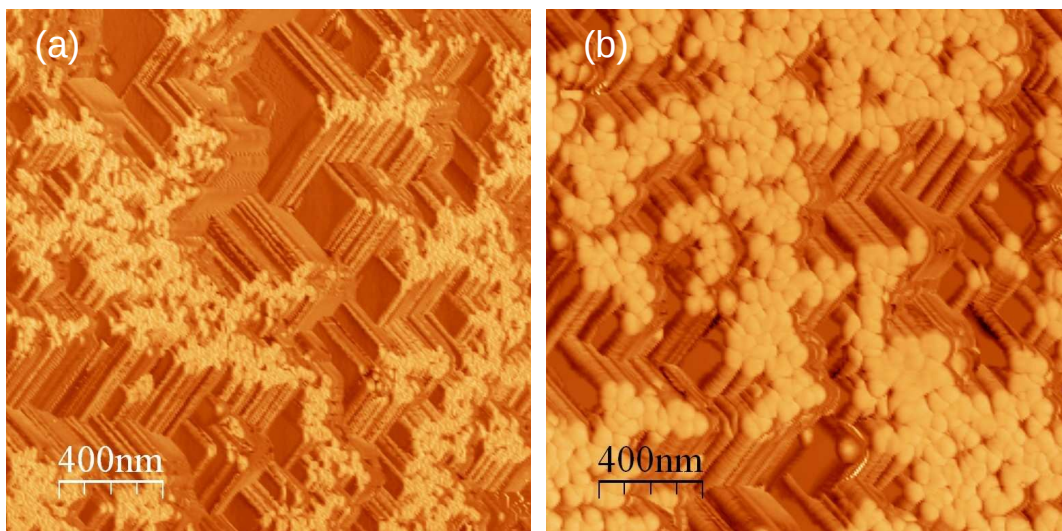


Figure 30. Images AFM en phase de nanofils de silicium avant (a) et après (b) fonctionnalisation par une couche mince de 25 nm du polymère plasma d'allylamine (Coll. Gaëlle Piret, IRI).

3.2.3 Réactivité de l'intérieur du film polymère d'allylamine

A la fin de l'article précédent (Article 1), nous avons conclu par la nécessité de répondre à la question suivante: Quelle est l'influence de l'épaisseur du film d'allylamine sur la densité des fonctions amines mesurée? Cette question peut-être formulée de plusieurs façons: durant le dosage des groupements fonctionnels dans un film polymère, jusqu'à quelle profondeur pénètrent les marqueurs utilisés?. Par conséquent, la densité calculée est-elle surfacique ou volumique?

La majorité des auteurs qui ont étudié la concentration des groupements fonctionnels amines sur des polymères plasma ne mentionnent généralement pas l'épaisseur des films analysés [1-8]. A notre connaissance, seules trois études ont mentionné cette problématique sans toutefois s'y atteler profondément. La première a été réalisée sur un polymère plasma d'acide acrylique, en utilisant un marquage à la théonine acétate. L'étude a conclu que la concentration des fonctions carboxyles (-COOH) est proportionnelle à l'épaisseur du film [9]. La seconde concerne l'accrochage d'ADN sur un polymère plasma d'allylamine [10]. Cette étude a montré que la concentration d'ADN détectée par fluorescence varie en fonction de l'épaisseur. La troisième étude suggère quant à elle que l'épaisseur du film ppAA n'aurait pas d'influence significative sur la densité amine mesurée par une dérivatisation au NBA [5]. Il est à noter que cette dernière étude a été conduite sur des épaisseurs allant de 16 à 50 nm, ce qui est à notre avis insuffisant pour confirmer l'absence d'une corrélation. Nous avons donc conduit des expériences pour tenter d'apporter quelques éléments de réponse à cette problématique. Les paragraphes suivants décrivent les tests effectués les résultats préliminaires obtenus.

Nous avons tout d'abord réalisés des dépôts de film de ppAA dans les conditions optimales décrites précédemment, et avec une large gamme d'épaisseurs, allant de 60 nm à 800 nm. Pour estimer la densité des fonctions amines, les films ont été analysés avec deux méthodes décrites dans l'article 1: la première est le marquage à la fluorescamine pour l'observation au microscope à fluorescence avec cette fois-ci une estimation du taux de fluorescence, et la seconde est la dérivatisation chimique au NBA pour la détection en spectroscopie d'absorption UV-visible.

La première technique a permis d'enregistrer le taux de fluorescence de tous les échantillons (Figure 31a) et de représenter les valeurs obtenues en fonction des épaisseurs des films utilisés (Figure 31b). Une fonction puissance avec $0 < \text{exposant} < 1$ est observée entre l'épaisseur du film et l'intensité de la fluorescence enregistrée.

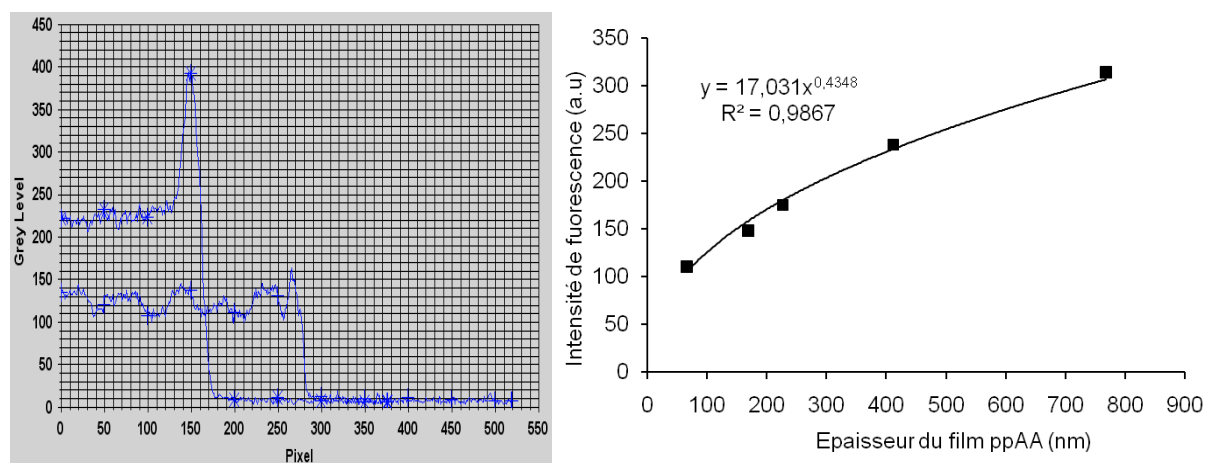


Figure 31. Détection des amines par microscopie à fluorescence. (a) spectres brut du niveau de fluorescence de deux échantillons d'épaisseurs différentes. (b) Evolution de la fluorescence en fonction de l'épaisseur du film analysé.

La deuxième méthode a permis d'enregistrer les absorbances des solutions de NBZ issues de la réaction de dérivation chimique (voir Chapitre 2 et article 1). Les résultats présentés dans la figure 32 confirment clairement les résultats obtenus en fluorescence. Cela permet d'exprimer la relation entre l'épaisseur du film d'allylamine et la densité des fonctions amines par:

$$N_{(NH_2)} = \gamma \cdot T^\beta$$

Où : N est le nombre de fonctions $-NH_2$, T est l'épaisseur du film, $0 < \beta < 1$.

Le facteur γ serait une variable définie par plusieurs contributions notamment les paramètres du plasma et la technique de détection utilisée. L'affinement de cette relation nécessite des expériences supplémentaires.

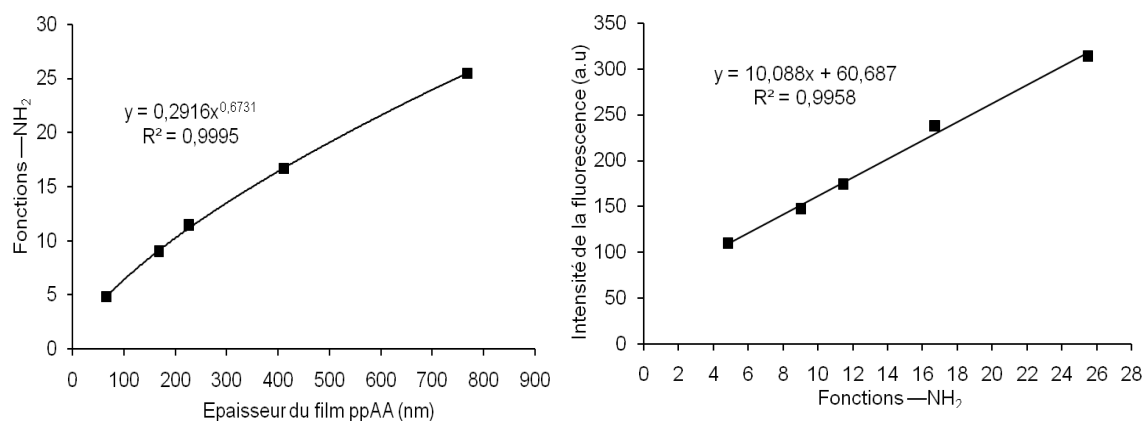


Figure 32. (a) Evolution de la densité des fonctions —NH₂ en fonction de l'épaisseur des films analysées. (b) Courbe d'étalonnage de la densité des groupements —NH₂ en fonction de l'intensité de fluorescence.

Ces résultats montrent que la densité des amines primaires mesurée est dépendante de l'épaisseur du film analysé. C'est donc une densité volumique et non surfacique. Cette dépendance est déterminée notamment par la réticulation du polymère, la capacité de pénétration du marqueur utilisé, et le temps de réaction. La réactivité du polymère en profondeur fait de lui une matrice tridimensionnelle avec une importante capacité de charge pour les petites molécules (ADN, ARN, marqueurs). Cela ouvre de nouvelles perspectives pour la fonctionnalisation des puces à ADN.

Enfin, il est à noter que la représentation de la fluorescence enregistrée (Figure 31b) en fonction de la densité des amines (Figure 32a) permet d'obtenir une courbe d'étalonnage pour la mesure de la densité des amines par la microscopie à fluorescence. Cette dernière est une méthode plus rapide et beaucoup plus simple que la dérivation chimique par le NBA.

Références

- [1] Finke B., Schroder K., Ohl A., "Structure Retention and Water Stability of Microwave Plasma Polymerized Films From Allylamine and Acrylic Acid", *Plasma Process. Polym.*, in press, doi: 10.1002/ppap.200930305.
- [2] Yang Z., Wang X., Wang J., Yao Y., Sun H., Huang N., "Pulsed-Plasma Polymeric Allylamine Thin Films", *Plasma Process. Polym.*, **6**, 2009, 498-505.
- [3] Lucas S., Genard G., Michiels C., Masereel B., Feron O., Gallez B., Vander Borgh T., Moreau N., "Production and preliminary characterization of DC plasma polymerized allylamine film (PPAA) by NRA, ERD and XPS", *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B*, **266**, 2008, 2494-2497.
- [4] Gancarz J., Bryjak M., Bryjak W., Tylus G., Pozniak, "Poly(phenylene oxide) films modified with allylamine plasma as a support for invertase immobilization", *Eur. Polym. J.*, **42**, 2006, 2430-2440.
- [5] Basarir F., Cuong N., Song W.-K., Yoon T.-H., "Surface Modification via Plasma Polymerization of Allylamine for Antibody Immobilization", *Macromol. Symp.*, **249**, 2007, 61-66.
- [6] Choukourov A., Biederman H., Slavinska D., Hanley L., Grinevich A., Boldyryeva H., Mackova A., "Mechanistic studies of plasma polymerization of allylamine", *J. Phys. Chem. B*, **109**, 2005, 23086-23095.
- [7] Puleo D. A., Kissling R. A., Sheu M.-S., "A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy", *Biomaterials*, **23**, 2002, 2079-2087.
- [8] Calderon J. G., Harsch A., Gross G. W., Timmons R. B., "Stability of plasma-polymerized allylamine films with sterilization by autoclaving", *J. Biomed. Mater. Res.* **42**, 1998, 597-603.
- [9] Ivanov V. B., Behnisch J., Holländer A., Mehdorn F., Zimmermann H., "Determination of Functional Groups on Polymer Surfaces Using Fluorescence Labelling", *Surf. Interf. Anal.*, **24**, 1996, 257-262.
- [10] Zhang Z., Knoll W., Förch R., "Amino-functionalized plasma polymer films for DNA immobilization and hybridization", *Surf. Coat. Technol.*, **200**, 2005, 993-995.

Chapitre 4 _____

Immobilisation covalente de biomolécules

Chapitre 4

Immobilisation covalente de biomolécules

Ce chapitre est composé de deux parties: la première se présente sous la forme d'un article déjà publié décrivant l'utilisation des films polymères d'allylamine déposés précédemment pour le greffage d'une enzyme protéolytique, i.e. la trypsine. La seconde partie décrit la disposition des enzymes à la surface du polymère. Elle fait ensuite un bref rappel des principes de la cinétique enzymatique avant d'analyser les effets de l'immobilisation de la trypsine sur ses paramètres cinétiques. Ce travail vise à vérifier l'activité et la stabilité de l'enzyme immobilisée avant de procéder à une intégration dans un BioMEMS.

4.1. Immobilisation de la trypsine sur le polymère plasma d'allylamine

Après le développement et la caractérisation d'une surface riche en fonctions amines par un dépôt plasma d'allylamine, l'étape suivante a consisté à maîtriser une méthode efficace d'immobilisation de la trypsine à la surface de ce polymère. Le procédé de greffage a été optimisé et les effets de cette immobilisation sur les paramètres cinétiques de l'enzyme étudiés.

L'article suivant, noté article 2, a été publié dans la revue internationale à comité de lecteurs *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, sous le titre: «Greffage covalent de la trypsine sur un polymère plasma d'allylamine». Il décrit l'immobilisation de la trypsine sur la surface du film ppAA, par l'intermédiaire d'un bras espaceur, i.e. le glutaraldehyde. Cette étape est suivie d'une réaction de réduction des fonctions imines par un traitement au cyanoborohydrure de sodium. L'influence de chaque étape sur le rendement d'immobilisation et l'activité enzymatique a été analysée par plusieurs méthodes expérimentales (spectrofluorométrie, AFM, XPS). La maîtrise du procédé d'immobilisation devrait permettre une fonctionnalisation optimale d'un BioMEMS et une meilleure intégration dans le procédé de microfabrication. L'étude de l'activité des enzymes immobilisées par spectrofluorométrie permettra quant à elle d'avoir des valeurs de référence lors de l'analyse de cette même réaction par la spectroscopie TeraHertz.



Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine

Abdenmour Abbas^{a,b,c,*}, Dominique Vercaigne-Marko^a, Philippe Supiot^b, Bertrand Bocquet^c, Céline Vivien^b, Didier Guillochon^{a,**}

^a Laboratory of Biological Processes, Enzymatic and Microbial Engineering (EA 1026), Lille1 University, F59655 Villeneuve d'Ascq, France

^b Laboratory of Process Engineering of Reactive Fluids-to-Materials Interactions (EA 3571), Lille1 University, F59655 Villeneuve d'Ascq, France

^c Institute of Electronics, Microelectronics and Nanotechnology (UMR-CNRS 8520), Lille1 University, F59655 Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2009

Received in revised form 27 May 2009

Accepted 2 June 2009

Available online 10 June 2009

Keywords:

Covalent immobilization
Immobilized enzyme activity
Plasma polymerized allylamine
Trypsin adsorption

ABSTRACT

This paper focuses on the immobilization of a proteolytic enzyme, trypsin, on plasma polymerized allylamine (ppAA) films. The later have been deposited onto silicon substrate by means of radiofrequency glow discharge. The covalent attachment of the enzyme was achieved in three steps: (i) activation of the polymer surface with glutaraldehyde (GA) as a linker, (ii) immobilization of trypsin and (iii) imino groups reduction treatment. The effects and efficiency of each step were investigated by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and atomic force microscopy (AFM). Fluorescent spectroscopy was used to evaluate the change of the biological activity following the immobilization steps. The results showed that enzyme immobilization on GA-modified substrate increases the enzyme activity by 50% comparing to adsorbed enzymes, while the imino reduction treatment improves the enzyme retention by about 30% comparing to untreated samples. In agreement with XPS and AFM data, UV–vis absorption spectroscopy, used to quantify the amount of immobilized enzyme, showed that allylamine plasma polymer presents a high adsorption yield of trypsin. Although the adsorbed enzymes exhibit a lower activity than that measured for enzymes grafted through GA linkers, the highest catalytic activity obtained was for the enzymes that underwent the three steps of the immobilization process.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The first use of enzyme immobilization was proposed in 1916 by Nelson and Griffin [1]. Many years later, the immobilization of bioactive molecules onto solid supports gave rise to a wide range of academic and industrial applications, like immobilized enzyme reactors for proteomics [2], proteolysis [3], and chromatography systems [4–6]. In addition, the recent development of microfluidic and nanotechnology has opened up new fields of applications including biosensors and BioMEMS [7–9]. Immobilized biocatalysts are attractive for several reasons. Besides the easy separation of the product from the enzyme and the ability to recycle the catalyst for multiple uses, enzyme grafting reduces the autodigestion of proteolytic enzymes [10,11]. Another interesting benefit is the possible processing in organic solvents and under extreme conditions of pH and temperature [12]. Furthermore, enzyme immobilization is a

promising approach to obtain a continuous biocatalysis reactors and consequently less time consuming and cost-reduced protocols.

As a consequence, there is growing interest in understanding and controlling the immobilization strategies. Several immobilization techniques are reported (e.g. ionic binding, adsorption, covalent binding, entrapment, membrane confinement) [13–15]. Among all these methods, covalent coupling is the most used one to obtain highly stable enzymes. It is based on the use of various chemical functionalities including carboxyl, hydroxyl, epoxy, thiols and amines groups. These latter are particularly attractive because of their presence in biomolecules and their high reactivity with aldehyde groups. Therefore, they can react easily with some cross-linking agents like glutaraldehyde.

The efficiency of immobilized enzyme depends strongly on both the attachment strategy and the material used as a carrier matrix. Over the last few years, plasma polymerized materials have been successfully used as supports for immobilization of biologically active species. Examples of these polymers are ethylene-diamine [16], acrylic acid [17], di(ethylene glycol) monovinyl ether [18] and maleic anhydride [19]. Siow et al. provide reviews of this theme [20]. The increasing use of plasma polymers is mainly due to their biocompatibility and easy chemical activation. Additional advantages rise from their high thermal stability, good mechanical properties, and resistance against organic solvents [21]. Allylamine based

* Corresponding author at: Laboratory of Biological Processes, Enzymatic and Microbial Engineering (EA 1026), Lille1 University, F59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: +33 32876 7392; fax: +33 32876 7381.

** Corresponding author. Tel.: +33 32876 7392; fax: +33 32876 7381.

E-mail addresses: dinor.abbas@gmail.com (A. Abbas), didier.guillochon@univ-lille1.fr (D. Guillochon).

plasma coatings are among the most interesting aminated polymers as support for various bioactive materials [22–24]. This is principally due to their highly aminated surface that can exhibit generally from 1 to 12 amine groups per nm² [25]. However, the interface biomolecule/plasma polymerized allylamine (ppAA) is not well explored and such data are not systematized in the literature. The purposes of this work are (i) to immobilize a proteolytic enzyme, trypsin, on ppAA films, and (ii) to investigate the influence of adsorption, glutaraldehyde (GA) activation and imino reduction reaction on the retention and catalytic activity of the grafted enzymes. The prepared samples from each step are compared to identify an efficient enzyme immobilization protocol. This is the first interface study of the effects of GA and imino reduction treatments on the enzyme immobilization and activity on aminated plasma polymer. Four techniques are used to monitor the immobilization steps. Atomic force microscopy (AFM) is used to analyze film surface morphologies, surface coverage and the thickness of the deposited protein layer [26], while X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) is used for quantitative studies of chemical bonding and atomic composition of the material surface [27]. Finally, fluorescent spectroscopy permits a real time monitoring of catalytic activities of the enzyme preparations. The immobilized trypsin quantification was performed by UV–vis absorption spectroscopy. This complementary information is necessary to evaluate the relative enzyme efficiency.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Experiments were carried out using single side polished silicon wafers ((100) oriented, p-doped, resistivity <1 Ω cm), obtained from Siltronix (France). They were firstly cut with dimensions of (3 cm $\times$ 1 cm) and degreased by ultrasonication in acetone and isopropanol for 5 min each, then dried under nitrogen stream. Prior to use, Si wafers were exposed to UV light–Ozone treatment (UVO cleaner, *Jelight Company Inc.*) for 30 min to eliminate any organic contaminant and improve adhesion.

Allylamine solution (MW: 57.09 g/mol, >99% purity) was obtained from Fluka Analytical. The monomer was used as received without further purification. Trypsin lyophilized powder, from bovine pancreas (EC 3.4.21.4, 23 500 Da, 13 500 BAEE¹ units/mg), powdered *N* α -benzoyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (BA-AMC); a sensitive fluorogenic substrate for trypsin (MW: 471.9 g/mol, $\geq$ 99% purity), dimethyl sulfoxide, sodium cyanoborohydride² (NaBH₃CN, 94% pure) were acquired from Sigma–Aldrich Chemical Co. 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS) was purchased from Merck Eurolab. Sodium dihydrogenophosphate, disodium hydrogenophosphate and glutaraldehyde (25%, MW: 100.12 g/mol) were obtained from VWR Prolabo. All solutions were prepared with Milli-Q water (Millipore) with the resistivity of 18 m Ω cm.

2.2. Thin film coating

The deposition of allylamine thin films was carried out by plasma polymerization in a home built apparatus [28]. The later consists of a 13.56 MHz capacitively coupled RF plasma reactor. The deposition chamber, enclosed in a Faraday cage, is made of borosil-

icated glass and has a cylindrical shape (31 cm long, $\varnothing$ = 18 cm). This setup is equipped with two parallel plate aluminum electrodes ($\varnothing$ = 12 cm), separated by 3 cm. The RF power is applied on the upper electrode while the sample is placed on the lower grounded one. The plasma-discharge region is defined between the first and second plates. A rotary pump Alcatel CP-33 was used to evacuate the plasma chamber to a background pressure of 0.3 Pa. The pump was protected by a liquid nitrogen trap.

In the polymerization process, 3-aminopropene (i.e. allylamine) was used as organic precursor. Before being loaded into the reactor, the Si substrate underwent a cleaning step as described previously and a subsequent Ar plasma treatment (25 W input power, 67 Pa pressure). The plasma polymerization was performed under continuous wave, with argon as a carrier gas (250 sccm) at a working pressure of 165 Pa and 75 W input power. The allylamine monomer reservoir was heated to 45 °C for vaporization, and then allowed to flow through a needle valve to reach the plasma chamber, giving a total pressure of 190 Pa and a deposition rate of 26 nm/min. After 2 min deposition, the samples were immediately stored in a silica gel dessicator until use.

2.3. Trypsin immobilization

Trypsin as model enzyme and BA-AMC as fluorogenic substrate were employed in the present study. Trypsin has many industrial applications and is widely studied in the academic area, whereas BA-AMC is proved to be a very specific and sensitive fluorogenic substrate for trypsin [29]. The trypsin immobilization procedure consists of three steps as described on Scheme 1. First, allylamine coated substrates were immersed in phosphate buffer solution (0.02 M, pH 6.8) containing 5% (v/v) glutaraldehyde (GA). The activation of ppAA amine groups was performed under orbital shaking (40 rpm) for 2 h at room temperature. After GA linking to the aminated surface, the coated substrates were rinsed 5 min in phosphate buffer saline (PBS) to remove unbonded GA, then immersed in PBS containing 2 mg/mL trypsin, at 4 °C for 2 h. In aqueous solutions, glutaraldehyde molecules form oligomers of variable size with a free aldehyde group at each end of the oligomer molecules [30]. Hence, they may form a linkage with the aminated surface on one side and with some amine groups of the protein side chains on the other side. Finally, the bound enzyme samples were transferred, without washing, in 0.1 M sodium cyanoborohydride solution prepared in PBS, for 1 h at room temperature. This step allows the reduction of the imino groups involved in the enzyme immobilization and then renders the links more stable. More details will be given in the following section.

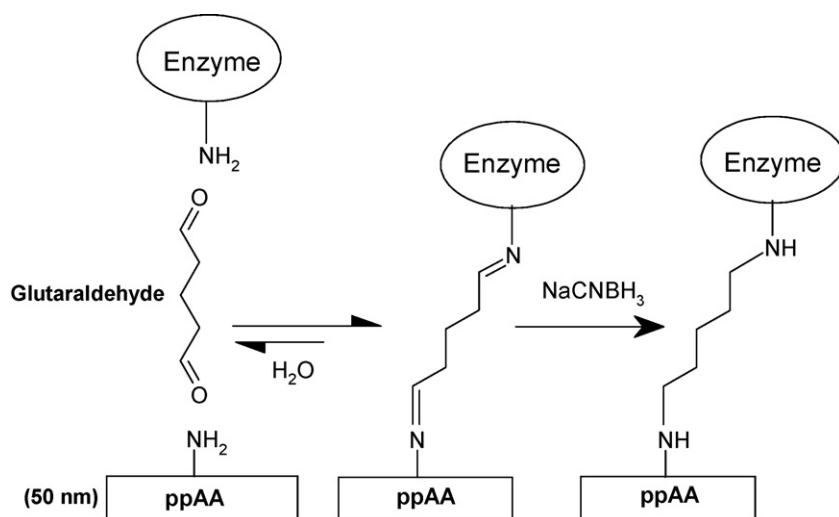
For comparison of the covalent binding with the adsorption effects, samples were prepared with Si substrates coated with allylamine polymer and by subsequent direct immersion in trypsin solution as described above. Those preparations are indicated as Si–P–E. The samples which were processed with only two steps and without the imino reduction are labeled as Si–P–G–E, and those that underwent the whole immobilization protocol are labeled as Si–P–E–G–R. As reference, allylamine-coated substrates (Si–P) were simultaneously treated with PBS. All samples were finally washed four times in PBS for 10 min each to remove the reductive agent and the unbound GA–trypsin composite, dried under a nitrogen stream and stored at 4 °C for further characterization process.

2.4. Immobilized trypsin quantification

Trypsin quantity on different samples was determined by measuring UV–vis light absorption of proteins at 280 nm. Absorption spectra were collected using a Perkin–Elmer Lambda 800 UV–VIS Spectrophotometer and data analysis was achieved by *UV Winlab* software. The immobilized enzyme quantity was evaluated by

¹ BAEE: *N* α -benzoyl-arginine ethyl ester. One BAEE unit of trypsin is the amount of enzyme causing an increase in absorbance of 0.0001 per minute at 233 nm at 25 °C.

² Caution: Sodium cyanoborohydride and glutaraldehyde are respectively corrosive and irritant, with a very unpleasant smell. They must be handled with care, using safety glasses, gloves and working in a well ventilated area.



Scheme 1. Covalent immobilization procedure of trypsin on ppAA. For simplification purposes, only a monomeric and linear glutaraldehyde is represented, while the most prevalent are likely non-linear dimeric and oligomeric glutaraldehyde molecules.

measuring the difference between protein absorbance of the supernatant before and after immobilization, and after subtraction of the absorbance of the rinsing solutions. Fig. 1 shows that four rinsing steps of 10 min each, in phosphate buffer (0.02 M, pH 6.8) under stirring, are sufficient to remove all the unbound trypsin molecules. The amount of immobilized trypsin is determined using the calculated molar absorption coefficient $\varepsilon_{280} = 37\,650\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [31]. The obtained value was checked by the XPS measurements of the amide bond concentrations and the AFM analysis of the surface topography.

2.5. Catalytic activity assay

Trypsin activity was monitored by measuring the amount of product formed using a continuous spectrofluorometric assay. Measurements of the fluorescence emission were performed by Perkin-Elmer Luminescence spectrometer LS 50B. This method is based on the hydrolysis of BA-AMC according to the following reaction:

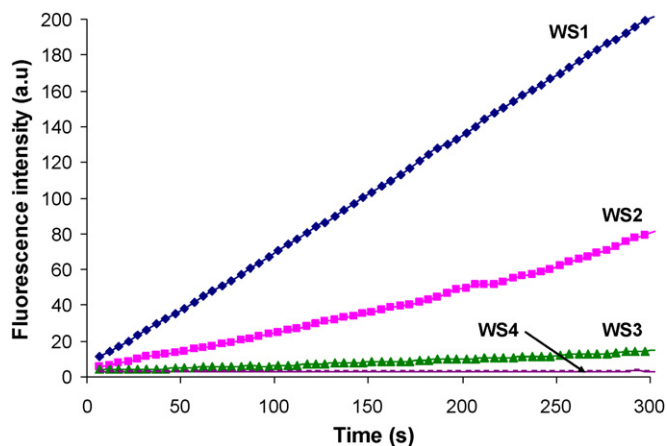
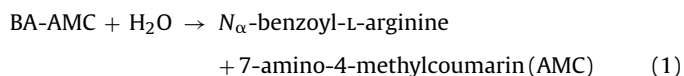


Fig. 1. Enzyme activity of the successive washing solutions (WS) after enzyme immobilization. Each washing step was carried out by phosphate buffer (0.02 M, pH 6.8) during 10 min under stirring, and monitored by fluorescent spectroscopy.

The fluorescence of the reaction product AMC is approximately 700-fold higher than that of the substrate BA-AMC at 380 nm [29]. Assays were conducted as follows: a 1 cm quartz cuvette is filled up with 2.97 mL Tris-HCl (0.1 M, pH 8.0), then trypsin-immobilized support (3 cm²) was mounted to one of the walls of the cuvette without hindering the excitation laser beam. The hydrolysis reaction was initiated by injection of 30 μL BA-AMC, dissolved in dimethyl sulfoxide, to obtain a final concentration of 10 μM substrate. The increase in emission at 440 nm (excitation at 380 nm) was recorded continuously for a period of 33 min at 22 °C. All the samples were assayed similarly, and the catalytic activity of enzyme preparations were compared in respect to the amount of immobilized trypsin in each sample. The linearity of the fluorescence intensity vs. the product concentration was determined by the monitoring of free trypsin activity with various substrate concentrations. When the fluorescence intensity reached a plateau, the product concentration would be equal to that of the substrate used. The measurements were carried out in a cuvette containing Si-P (50 nm thick coating) substrate to operate in the same experiment conditions.

2.6. Characterization techniques

The chemical bonding states of ppAA films were firstly investigated by a Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy using a Perkin-Elmer Spectrum One spectrometer. For FTIR measurements, ppAA films were deposited on aluminum tablets because of their high reflectivity in the IR region. Then the deposits were analyzed under specular reflection mode with an angle of 45° in the spectral range 4000–500 cm^{−1} with 4 cm^{−1} resolution. The transmission-absorption spectra were collected and processed by the manufacturer-supplied software. The film thickness is 220 nm for FTIR analysis and 45–55 nm for the following characterization techniques as measured by TENCOR P-10 surface profiler.

The quantitative measurements of the samples surface chemical composition was investigated using X-ray photoelectron spectroscopy (Physical Electronics Type 5600). The monochromatic Al K α X-ray source was operated at 350 W. The spectra were obtained at a photoelectron take-off angle of 45°. Survey scans (1400–0 eV) were recorded in 0.5 eV steps with a pass energy of 46.95 eV, and the narrow scans of the C 1s, N 1s and O 1s components were acquired in 0.05 eV steps with a pass energy of 11.75 eV. Binding energies of all the spectra were referenced to the aliphatic hydrocarbon C 1s peak set at 285 $\pm$ 0.2 eV. After the background and linear baseline sub-

tractions, the peak fitting was carried out using Peakfit application (Systat. Software Inc.) assuming a Gaussian peak shape. Elemental sensitivity factors were used to calculate the atomic concentration percentages.

A multimode/Nanoscope IIIA (Digital Instruments) was used to probe the surface topography, calculate the average root-mean-square (RMS) roughness and evaluate the protein coverage for each enzyme preparation. The AFM images were acquired in a tapping mode, in air at room temperature, using a commercially available Si_3N_4 tip with a 10–15 nm radius of curvature. For each sample, AFM scans ($1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ and $200\ \text{nm} \times 200\ \text{nm}$) were performed in various surface positions to check the surface uniformity. Data analysis was carried out using the freely available WsXM software.

3. Results and discussion

3.1. FTIR characterization of allylamine coating

FTIR spectrum of ppAA film is shown in Fig. 2. The expected vibrational absorption bands were found in the range $3100\text{--}3500\ \text{cm}^{-1}$ for the NH stretching mode and the deformation mode of primary amine, secondary amine or imine. Multiple absorption peaks located around 2962 , 2934 and $2875\ \text{cm}^{-1}$ can be assigned to the stretching mode of aliphatic C–H groups. The band around $1660\ \text{cm}^{-1}$ can be mainly assigned to the primary amine group bending and the imine stretching modes. A small contribution from amide vibrations around 1650 and $1550\ \text{cm}^{-1}$ is confirmed by XPS measurements as we can see in Section 3.4. C–O and C–N vibrations are also expected in the region $1100\text{--}1300\ \text{cm}^{-1}$.

The spectrum features indicate that the monomer underwent recombination during plasma polymerization. Instead of conventional polymers, plasma polymers rarely contain repeating monomer units. They are formed under energetic plasma, by the fragmentation, reorganization and cross-linking of the excited and broken monomer units, following a complex mechanism [32].

In this experiment, we used a high monomer flow rate-to-power ratio. This means that monomers were less fragmented and more double bonds of the allylamine units were involved in the polymerization mechanism. As a consequence, amine groups were preserved and the intensity of the CH_x bands (around $2900\ \text{cm}^{-1}$) is relatively lower than that of NH bands (around $3300\ \text{cm}^{-1}$). However, the appearance of bands at $2185\ \text{cm}^{-1}$ corresponding to nitrile compounds ($\text{C}\equiv\text{N}$) suggests a removal of hydrogen from carbon

and nitrogen atoms, leading to a partial transformation of amine functionalities into amide, imine, or nitrile groups [25,32].

3.2. AFM investigations of the immobilization steps

AFM analysis was carried out to determine the alteration of the surface topography and the RMS roughness created by each step of the immobilization process. Fig. 3 displays the AFM height images (on the left) and the 3D topography (on the right) of the different samples. The RMS roughness is the standard deviation of the heights (Z values in nm) in a three-dimensional AFM map. All images have an area of $200\ \text{nm} \times 200\ \text{nm}$. The height images have the same z-scale ($3.6\ \text{nm}$) for direct comparison purposes.

Trypsin is a globular protein with 223 amino acids. Its dimensions are approximately $4.9\ \text{nm} \times 3.9\ \text{nm} \times 3.3\ \text{nm}$, calculated from the X-ray crystallographic structure [33]. Hence, the size of bound trypsin should be in the range $3\text{--}5\ \text{nm}$. However, AFM 3D images in Fig. 3 show white clusters with a size ranging from 20 to $50\ \text{nm}$ and a height around $2\text{--}4\ \text{nm}$, which is expected for a single protein layer. This arrangement reveals a deposition of larger protein assemblies and suggests a clustering characteristic of trypsin. On the other hand, these images exhibit a uniformity of the peak-to-valley (P–V) distance throughout the polymer surface. In fact, in all the enzyme preparations, protein molecules are arranged laterally, rather than forming aggregates by horizontal accumulation, which confirms the formation of a continuous protein monolayer. These results suggest the crucial role of protein–protein and protein–surface interactions. Further investigations are needed to understand the arrangement mechanism of proteins on polymer surfaces.

The RMS measurements on Si substrate show a value of $0.24 \pm 0.02\ \text{nm}$ and a P–V distance around $1.78 \pm 0.04\ \text{nm}$, typical of silicon dioxide surfaces after UV– O_3 cleaning. The ppAA does not change significantly the RMS roughness (Table 1). This means that ppAA layer is highly smooth at small thicknesses. In contrast, P–V separation value increases by 19%, indicating a modification of the topographic aspect as shown by the 3D AFM images. The immobilization of trypsin either by direct adsorption (Si–P–E) or through GA cross-linking (Si–P–G–E) results in a large increase of RMS roughness by 46% and 65% respectively. It can be seen that the two samples mentioned above have relatively the same P–V separation values, while the RMS values are relatively different. This means that the difference in RMS values does not necessarily imply a difference in the amount of immobilized proteins, but

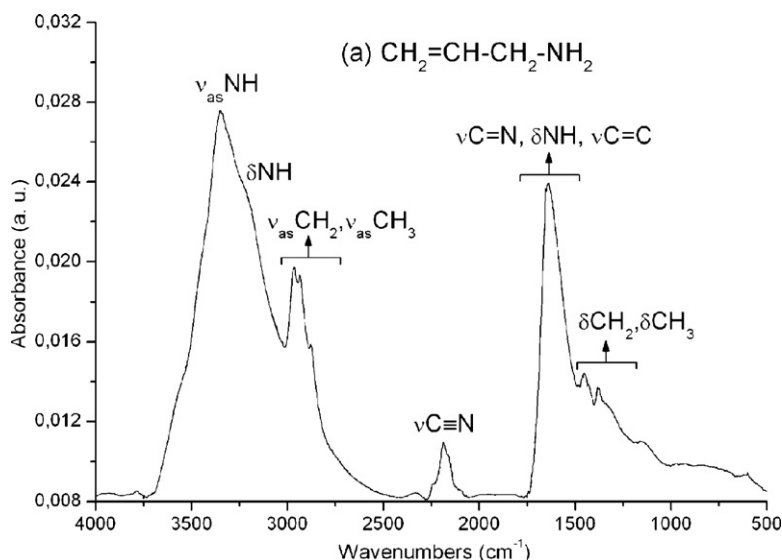


Fig. 2. Infrared spectrum of ppAA films. (a) Allylamine monomer formula.

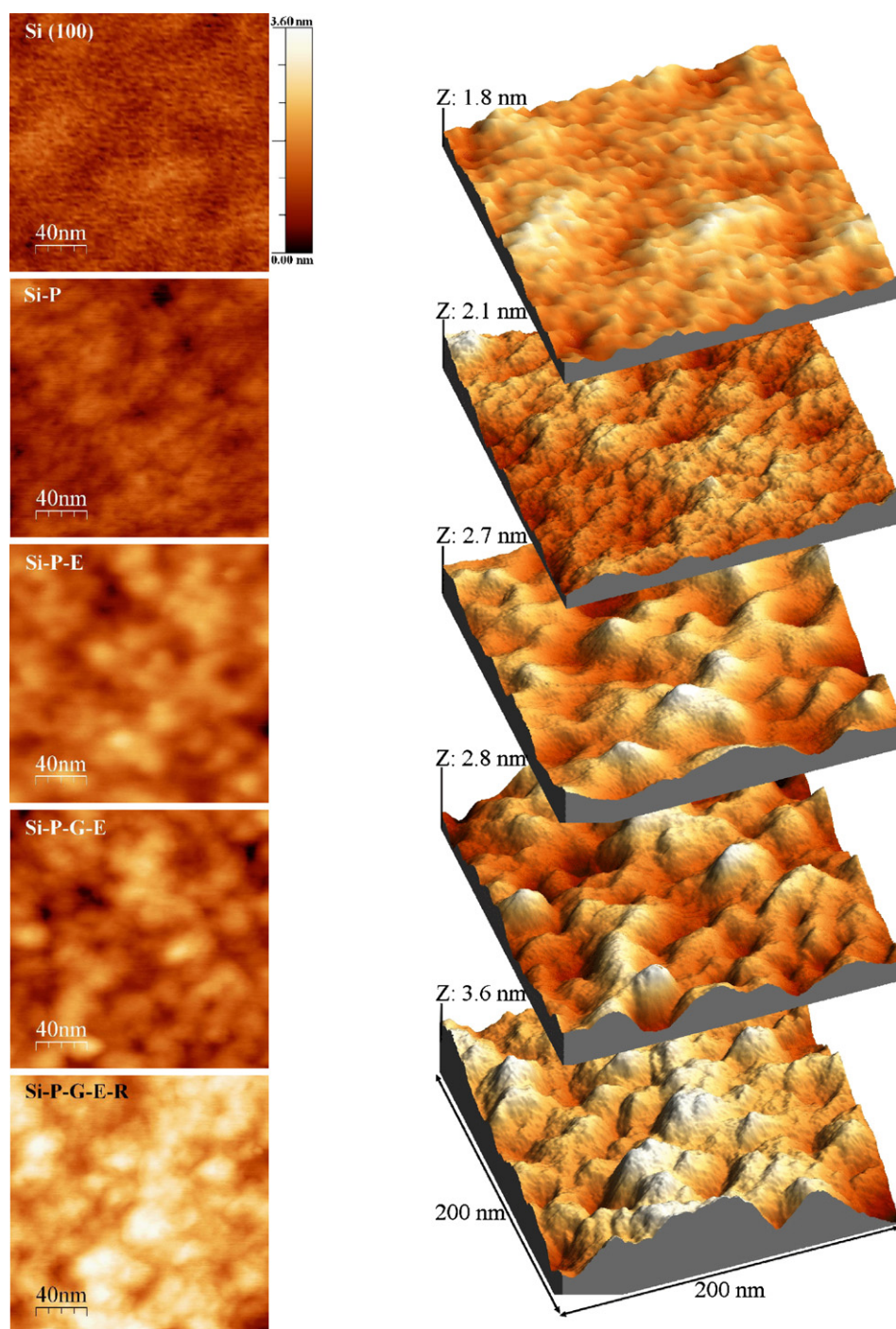


Fig. 3. AFM surface topography of ppAA films at each step of the immobilization process. High images at the left and 3D images at the right. Si: silicon wafer, P: ppAA, G: glutaraldehyde, E: trypsin enzyme, R: imino reduction treatment. All images have an area of 200 nm × 200 nm. The height images have the same z-scale (3.6 nm) for direct comparison purposes.

Table 1
Variation of some surface parameters following the enzyme immobilization steps.

	Si-P	Si-P-E	Si-P-G-E	Si-P-G-E-R
RMS roughness (nm)	0.26	0.38	0.43	0.49
P–V distance (nm)	2.12	2.74	2.76	3.64
C=O/N–C=O (%) ^a	5.6	10.7	11.4	14.9
Amount of immobilized enzyme ^b (mg/m ²)	0	2.1 ± 0.3	2.2 ± 0.2	2.8 ± 0.2

^a Obtained by XPS analysis.

^b Measured by UV–vis absorption spectroscopy ($n = 5$).

it can be explained by the different arrangement of proteins on the surface due GA treatment. It is interesting to see that the sample prepared by adsorption on ppAA and the sample prepared by covalent binding through GA linkers provide relatively a same topographic surface. These unexpected results are in agreement with the protein quantitative measurements described thereafter. The last image of Fig. 3, so labeled Si-P-G-E-R, shows the sample which underwent all the immobilization steps, including imino reduction. It clearly indicates the increase of both the RMS roughness and the P–V distance. This result suggests that there is more protein material immobilized on the surface, or more exactly, the imino

Table 2
XPS data for the different samples.

Sample	Atomic concentration (%)				Atomic ratio		Charge effect (eV)
	C	N	O	S	N/C	O/C	
Si-P	72.3	21.8	5.9	0	0.30	0.08	4.70
Si-P-E	69.7	13.4	12.8	0.2	0.25	0.18	3.51
Si-P-G	73.7	11.9	14.4	0	0.16	0.19	4.70
Si-P-G-E	71.8	13.6	14.5	0.2	0.19	0.20	4.36
Si-P-G-E-R	67.5	17.3	18.7	0.37	0.26	0.28	3.50
GA molecule ^a	71.4	0	28.6	0	0	0.40	
Trypsin ^a	62.1	17.1	19.9	0.9	0.27	0.32	

^a The atomic concentrations of GA and trypsin are calculated without considering the hydrogen atoms, because the later are not detected in XPS analysis.

reduction reduce significantly the protein leakage during rinsing or use.

3.3. Immobilized enzyme quantification

Based on the molecular dimensions of trypsin, the theoretical surface coverage of a compact monolayer is estimated to be between 2.05 and 3.05 mg/m², depending on the orientation and arrangement of the molecules on the surface. UV–vis absorption spectroscopy indicates that the Si–P–G–E–R presents the highest surface concentration as indicated in Table 1, whereas adsorption on ppAA (Si–P–E) provides a lowest surface concentration, similar to the value reached by the GA treated sample. These results are in agreement with the AFM images and are confirmed by the XPS measurements as we can see below.

3.4. XPS analysis of the immobilization steps

XPS measurements were conducted to confirm the previous conclusions and deeply investigate the chemical bonds involved in different steps. The survey spectrum analysis shows that all samples are composed of carbon, nitrogen, and oxygen (Table 2). Additionally, a weak signal of sulfur atoms (S 2p) was detected after protein immobilization, due to disulfide bonds of 12 cystein amino acids contained in trypsin. However, because of the sensitivity limits of the instrument, S 2p peaks could not be used accurately for quantification purposes but can give complementary information. Two additional remarks should also be pointed out: first, it can be noted that the allylamine monomer does not contain oxygen atoms, nevertheless it is well detected in the analysis. Oxygen is probably incorporated in the polymer from residual oxygen in the plasma reactor and/or by oxidation reaction after contact with air. Second, the deposited plasma polymer forms a continuous pinhole-free film, and its thickness exceeds the analysis depth of XPS, so that the Si 2p peak of the substrate was not observed.

The first feature that can be observed in Table 2 is that the adsorption of trypsin on ppAA appears to reduce the N/C value. The same ratio seems to increase when proteins are deposited after GA treatment. For accurate interpretation of XPS results, particularly those related to atomic concentration trends, three important remarks should be considered. First, charging effects are usually observed in XPS spectra of non-conducting samples, such as ppAA used here. This leads to a shift of all spectra to higher binding energies. Samples analyzed here present a charging potential of 3.50–4.70 eV (Table 2). Data were corrected by calibrating the spectra to the standard binding energy of C 1s (285 eV). Secondly, the XPS analysis depth is limited to the uppermost 10 nm. This means that any surface modification could have important influence on the atomic concentrations. Glutaraldehyde molecules exhibit high O/C value (0.4) and no nitrogen atom, while ppAA exhibits a lower ratio (0.08) and high amine content. Therefore, GA treatment of

ppAA should lead to a high enhancement of O/C value and a decrease in N/C. In the same manner, trypsin presents lower carbon and nitrogen concentrations and more important oxygen content. Hence, the trypsin adsorption onto the surface would induce relatively the same O/C and C/N trends. Finally, XPS signal intensity is dependent on the photoelectron emission depth. In trypsin treated samples, a photoelectron escaping the ppAA film would have travelled 3–5 nm of protein layer to escape from the surface and in doing so would be highly attenuated [34,35]. This is obviously observed when a relatively nitrogen-poor layer (GA, protein) is deposited on a nitrogen-rich layer (ppAA). In this case, the N 1s signal intensity would decrease with increasing thickness of the uppermost layer. Because of the different surface and thickness effects on XPS signals and the various chemical contributions, changes of the atomic concentrations should be interpreted with caution. The atomic ratio could provide information on the effects of the different layers, but the most useful data are those related to C 1s curve-fitting and the shift of O 1s/N 1s peaks.

High-resolution XPS spectra of C 1s peaks were recorded to obtain detailed and quantitative information about the chemical environment of treated surfaces (Fig. 4). The resolution of C 1s spectra of ppAA films could be realized by a three-peaks fitting configuration [24,36,37,39] or by a four-peaks configuration allowing the separation of C–N from C–O/C=N groups [40–43]. The last configuration could be controversial because of the small shift between C–N, C–O and C=N binding energies. In this work, C 1s is fitted with three chemical components (Fig. 4): hydrocarbon peak (C–C, C–H) set at 285 eV (peak 1), C–N, C–O and C=N groups at 286.4 eV (peak 2), and carbonyl (C=O) and/or amide (O=C–NH) at 288.1 eV (peak 3). It is to note that GA and/or trypsin treatments induce small binding energy shifts of the C 1s components, within the 0–0.3 eV range. These values are within experimental error (± 0.2 eV), so they could not be used for reliable interpretation.

However, to demonstrate the interaction of GA with the aminated surface and/or with proteins amine groups, it is important to separate the contributions of C–N and C–O moieties. Likewise, it would be necessary to discriminate between C=N and C–N contributions to demonstrate the covalent bonding of the proteins after imino reduction. O 1s and N 1s are investigated to get some insight on the trends of these different groups.

In fact, O 1s could provide helpful information by tracking the GA aldehyde groups. The spectrum could be curve-fitted with two regions attributed to ether-type (C–O) at 530–532.3 eV and carbonyl-type oxygen chemical environments at 533–534 eV (Fig. 4). Chemical assignments for these regions were based on binding energies quoted in the literature [24,44,45]. The N 1s region is particularly useful for characterizing the chemical changes of the primary amines at the ppAA surface and the imino/amino bonds of GA with the surrounding molecules. High-resolution N 1s spectrum is fitted by three main components (Fig. 4): the low energy component at 398.2 eV is generally assigned to C–N=C groups [39,46–49], while the peak at a binding energy 399.3 eV corresponds to aliphatic (unprotonated) amines. The region around 400.3 eV is mostly due to amide (O=C–N) [36,38,39,48].

Following the immobilization steps, the chemical composition and structure of the surface were altered. The reference sample (Si–P) shows the surface of ppAA film without any treatment. It is composed of C–C/C–H (66.9%), C–N/C–O/C=N (27.5%), and C=O/amide (5.6%). Because of oxygen concentration represents less than 6% in ppAA films; peak 2 is mainly composed of amine/imine groups, in agreement with the FTIR spectrum results. Clear differences in the different peaks were observed following the immobilization steps. After ppAA deposition, the first step is the GA activation. Glutaraldehyde oligomers can react easily with aminated surface using one aldehyde group, while the other reacts with the amine functions of the proteins (trypsin can react either

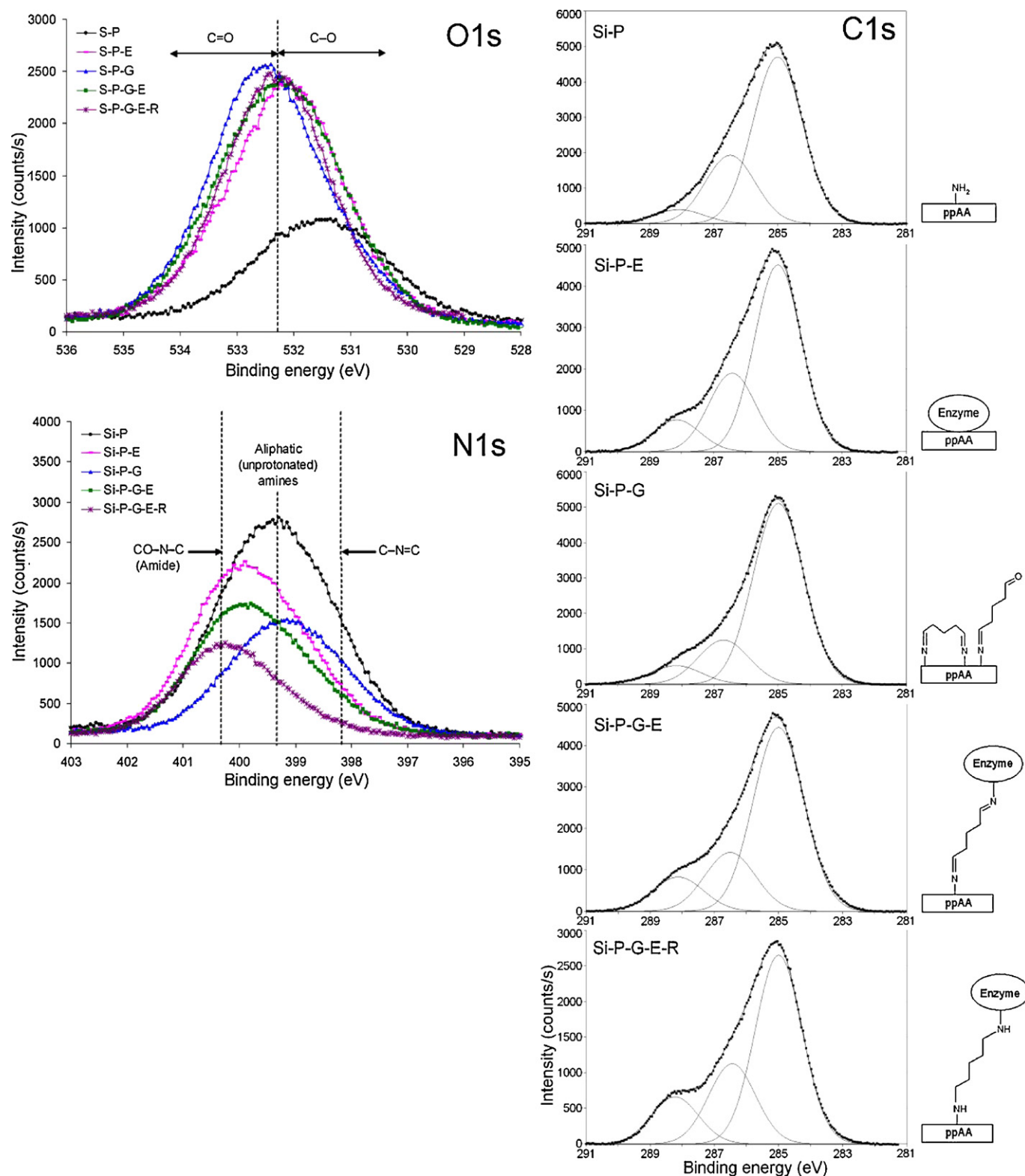


Fig. 4. High-resolution C 1s, O 1s and N 1s XPS spectra of the polymer surface after successive chemical treatments. The full width at half maximum (FWHM) used for C 1s curve-fitting is 1.83 eV for Si-P, 1.86 for Si-P-G, Si-P-G-E and 1.72 eV for Si-P-E, Si-P-G-E-R.

with its N-terminal group or by the amine functions of its 12 lysine units), thus forming in the two cases unstable imine bonds. To display the effect of GA treatment, Si-P-G-E and Si-P-E samples were compared (Fig. 4). The first has been treated with GA and the second was used as a reference for adsorption effect. The XPS detailed scans show the decrease of peak 2 area by 33.9% after GA treatment.

This is likely due to the decrease in primary amine functionalities as shown by N 1s peak of the Si-P-G sample (Fig. 4). Meanwhile, the treatment seems to improve the amount of imine bonds (C=N) as proposed by the shift of N 1s to lower binding energies. These results are consistent with the reaction described above between NH_2 -terminated surface and GA molecules. Additionally, GA treat-

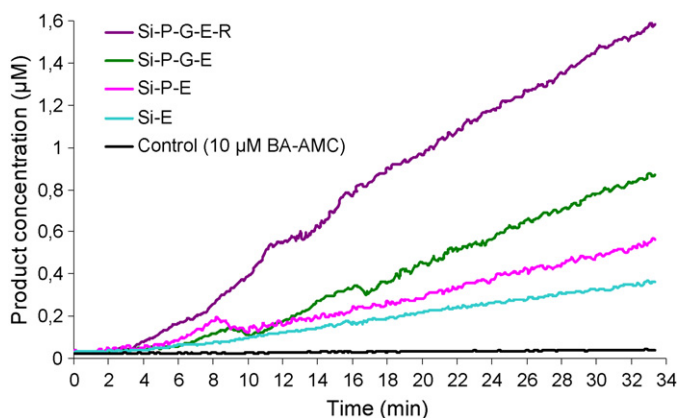


Fig. 5. Fluorescence spectra of the biocatalysis activity for different enzyme preparations.

ment induces an increase of O 1s intensity and a shift of the peak to higher binding energy, giving thus an evidence for the presence of free aldehyde groups on the treated surface.

The second step is the protein deposition. By comparing the samples prior to and after immersion in protein solution, XPS spectra reveal the increase of peak 3 area by 89.8% and 62.4% for Si-P-E and Si-P-G-E samples respectively. For the two samples, this increase reveals the appearance of specific components of protein related moieties, *i.e.* the amide groups ($\text{O}=\text{C}-\text{NH}$). Contribution from other carbonyl-type groups could not be excluded, but it is expected to be very low since the majority of oxygen atoms in a protein are involved in amide linkages between amino acids units. The same trend could be observed for O/C values. In contrast, N/C decreases rather than increasing because of the attenuation effect described above. The same explanation is valid for O 1s and N 1s peaks. O 1s intensity increases after the first surface modification and remains relatively constant during the following steps. This is due to the fact that O 1s signal belongs mainly to the uppermost protein layer. In contrast, N 1s signal rises mostly from the nitrogen-rich ppAA underneath, so it is highly affected by the deposited overlayer. This feature could provide useful information about the change of the protein layer thickness. Furthermore, the C=O/amide concentration in Si-P-G-E sample (10.7%) and that of Si-P-E substrate (11.4%) are not significantly different, consistent with the previous trypsin quantification data and AFM images. Unlike several research works which reported that GA cross-linking improves the immobilization yield [50], our results show relatively the same amount of bound

proteins for the treated (Si-P-G-E) and untreated (Si-P-E) surface. This allows us to assume that allylamine plasma polymer improves greatly the adsorption effect, making useless the GA treatment. However, GA cross-linking remains crucial for other purposes as we can see below.

As described previously, the protein immobilization by GA cross-linking involves the reaction of amine functions with aldehyde groups, in a reversible manner, to form imine bonds. These intermediate imines ($\text{C}=\text{N}$) are reduced to form stable secondary amino bonds ($\text{C}-\text{N}$), using the reducing agent NaBH_3CN . The comparison of the untreated surfaces (Si-P-G-E) with the samples subjected to imino reduction shows clear modifications on the surface features. The most important one is the increase by 20.5% of the peak 3 area, corresponding to the increasing amount of immobilized enzymes as shown by other techniques. In addition, peak 2 area ($\text{C}-\text{N}/\text{C}=\text{N}/\text{C}-\text{O}$) shows an increase of 19.4%, due mainly to both the side-chain amine functions of the protein and the reduction reaction of imine moieties. This statement is confirmed by the trends of nitrogen peaks. The N 1s peak belonging to Si-P-G-E sample exhibits the most important shift (+1 eV) to higher binding energies, while the asymmetric shape of the peak shows a significant decrease of the $\text{C}-\text{N}=\text{C}$ region, comparing to the Si-P-G-E sample. This is consistent with the conversion of imino bonds to more stable amino linkages. Furthermore, it is interesting to note that the N/C value obtained for Si-P-G-E-R sample is similar to that of a trypsin molecule. This suggests that the increased overlayer thickness (GA/trypsin) attenuates completely the N 1s signal rising from ppAA film, and the obtained N/C value is almost entirely due to proteins.

These results, combined with the previously reported observations (Table 1), permit to conclude that imino reduction treatment plays a crucial role in reducing the protein leakage after immobilization. Hence, it increases strongly the amount of bound proteins. However, it is to note that damaging effects of sodium borohydride on protein structures have been reported [51]. So, it appears more cautious to limit the duration of imino reduction treatment and work at moderate concentrations.

3.5. Fluorometric assay of enzyme activity

To evaluate the effect of different immobilization steps on enzyme activity, the fluorogenic specific substrate (BA-AMC) was added to the samples and the hydrolysis reaction was monitored using a spectrofluorometric assay. First, the spectrum of the time vs. fluorescence intensity at 440 nm was recorded, and then a linear correlation between fluorescence intensity and product concentration was determined (as described in the previous section). Finally,

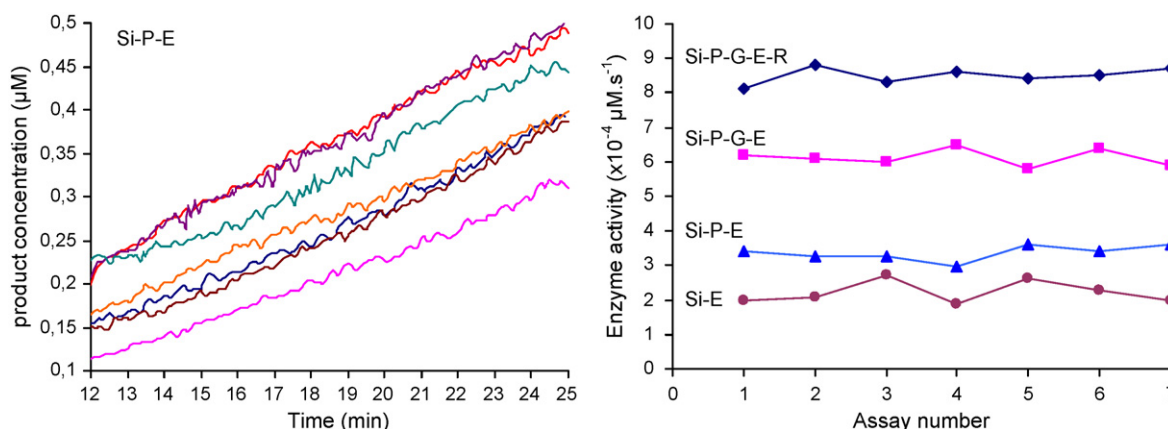


Fig. 6. Stability and reproducibility of the enzyme activity. The left graphic shows the fluorescence spectra obtained with the same Si-P-E sample at 30 μM BA-AMC. The slopes of these spectra and those of the other enzyme preparations are shown in the right graphic. The bioactivity is stable for at least seven use cycles, with a standard deviation of $\pm 0.2 \times 10^{-4}$ to $\pm 0.3 \times 10^{-4}$ $\mu\text{M}/\text{s}$.

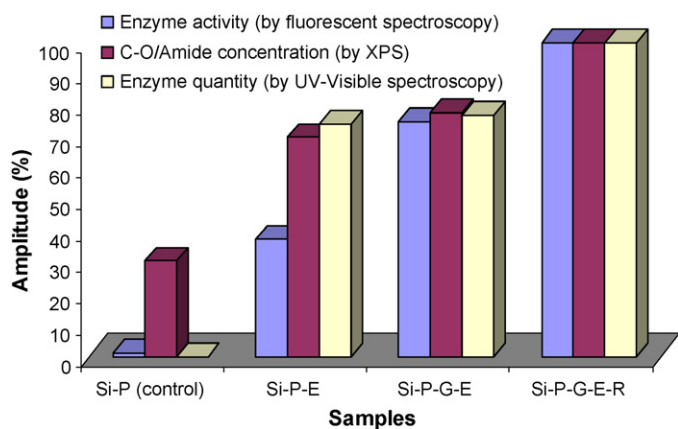


Fig. 7. Comparative representation of the enzyme activity, amide concentration and enzyme quantity following the immobilization steps. Si-P samples show a relatively important C-O/amide groups concentration, due to the polymer structure. This concentration increases after enzyme adsorption because of the protein amide bonds. The GA treatment (Si-P-G-E) leads to the increase of enzyme activity without changing the enzyme concentration, indicating a positive effect on enzyme catalysis reaction. Unlike GA, the enhancement of the bioactivity after imino reduction treatment (Si-P-G-E-R) is likely due to the increase in enzyme concentration, denoting a positive effect on enzyme retention.

the specific activity was calculated as the slope of the straight line drawn for the time dependence of product concentration, defined as number of μmol of BA-AMC hydrolyzed per unit of time.

The catalytic activity of different samples is shown in Fig. 5. The spectra were recorded without stirring, so that the molecular diffusion effect can be observed in all the spectra between 0 and 16 min. This means that after being injected, the substrate diffuses slowly in the solution to reach the enzymes active sites [52]. After approximately 16 min, the concentration of BA-AMC around the immobilized enzymes becomes optimal and homogenous, and then we can observe the characteristic linear evolution of the enzyme catalysis. For this reason, only the part of spectra, going from 16 to 33 min, was used for the enzyme activity calculations. The enzymatic activity of the sample that underwent the full immobilization process (Si-P-G-E-R) is determined to be $8 \times 10^{-4} \mu\text{mol/s}$. For comparison purposes, this value was taken as 100%. When the substrate was added to the reference sample “Si-P”, a very weak fluorescence was observed. It is due to the substrate self-hydrolysis in aqueous media. However, the rate of this phenomenon remains very low ($1.2 \pm 0.5\%$) comparing with the enzyme activity.

To check the stability and reproducibility of the measured activities, the hydrolysis reaction was performed and monitored many times for each enzyme preparation and with the same substrate concentration ($30 \mu\text{M}$ BA-AMC). The results displayed in Fig. 6 show a good stability of the enzyme activity. In fact, the immobilized enzymes provide relatively the same performance for at least seven consecutive use cycles. This feature is very important for further comparison studies or kinetics analysis.

To investigate the effect of GA treatment on biocatalysis, the activities of adsorbed (Si-P-E) and covalently immobilized trypsin (Si-P-G-E) were compared. Less than 40% activity was observed for the adsorbed enzymes, whereas the sample treated with GA shows 75% activity (Fig. 7). Although the amounts of bound proteins in those two samples are relatively equivalent (as indicated by several techniques), higher activity is observed in the Si-P-G-E samples, indicating that GA cross-linking provides a more suitable environment for enzyme activity. This can be explained by more conformational flexibility of the enzymes and more accessibility of their active sites for the substrate. The enhancement of enzyme activity by GA activation has already been reported by other authors [14]. In the case of adsorbed enzymes, the attachment

principle is widely different. Several protein-surface interactions may be involved in the adsorption mechanism, including hydrogen bonding, van-der-Waals forces, or acid-base interactions [53]. In addition, when the aminated polymer surface is subjected to aqueous solutions at $\text{pH} \sim 6.8$, the amino groups form ammonium functionalities ($-\text{NH}_3^+$) making the polymer surface more reactive. Attractive electrostatic interactions can then occur between the positively charged surface and the acidic amino acids of trypsin molecule. These various interactions could explain not only the high immobilization yield obtained with this procedure but also the observed weak activity as well. In fact, the enzyme activity is strongly affected by the steric hindrance and inappropriate arrangement on the polymer surface [54].

Likewise, the fluorometric analysis of the bioactivity before and after imino reduction was achieved. The bioactivity of Si-P-G-E-R sample was observed to be higher by approximately $25 \pm 1\%$ than the untreated sample (Si-P-G-E). Meanwhile, it is interesting to note that the amount of immobilized trypsin is higher by around 23% as well. This means that the observed bioactivity enhancement is likely due to the increase of the enzyme concentration. In other words, imino reduction treatment increases the enzyme retention but has no significant effect on enzyme performance. Fig. 7 summarizes clearly the conclusions of this work.

4. Conclusion

In this work, we report a successful immobilization protocol of trypsin on plasma polymerized allylamine films. In particular, we conduct an interface analysis following the immobilization steps. All the characterization techniques used in this work (AFM, XPS, absorption spectroscopy) combined with the enzyme activity measurements by fluorescent spectroscopy converge to give conclusive proof of three main results: first, all the treated samples, without or with a GA linker display a complete surface coverage with a protein monolayer. This suggests that ppAA represents an interesting carrier for biomolecules immobilization, either by simple adsorption or through covalent attachment. Secondly, the glutaraldehyde cross-linking does not change significantly the amount of bound proteins on the polymer surface. Meanwhile it improves clearly the enzyme performance. Conversely, imino reduction treatment has no significant effect on enzyme activity, while it improves strongly the immobilization efficiency of the enzymes.

Finally, it appears obvious that the most efficient immobilization protocol on plasma aminated films has to combine three crucial factors; *i.e.* the biocompatibility of the carrier, the accessibility and flexibility provided by GA cross-linking, with the stability rising from imino reduction. Such a process could generate immobilized biocatalysts surfaces with a high operational stability, enabling thus the accurate monitoring of the kinetic features. The kinetic parameters of trypsin and the influence of the covalent immobilization on these parameters will be reported in forthcoming papers.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the support of the Agence Nationale de la Recherche under contract ANR-05-NT05-2.46562 and the Interdisciplinary Research Program of Lille1 University (PPF BioMEMS 2006, no. 1803). The authors would like to thank Sylvie Godet and Dominique Deresmes for their technical assistance and comments.

References

- [1] J.M. Nelson, E.G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* 38 (1916) 1109.
- [2] H. Wu, J. Zhai, Y. Tian, H. Lu, X. Wang, W. Jia, B. Liu, P. Yang, Y. Xu, H. Wang, *Lab Chip* 4 (2004) 588.

- [3] R. Nicoli, N. Gaud, C. Stella, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 398.
- [4] J.M. Serrat, G. Caminal, F. Godia, C. Sola, J. Lopez-santin, Biotechnol. Tech. 6 (1992) 451.
- [5] A.M. Girelli, E. Mattei, J. Chromatogr. B 819 (2005) 3.
- [6] G. Massolini, E. Calleri, E. De Lorenzi, M. Pregnotato, M. Terreni, G. Félix, C. Gandini, J. Chromatogr. A 921 (2001) 147.
- [7] M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, O.A. Biloivan, C. Martelet, P. Temple, N. Jaffrezic-Renault, Mater. Sci. Eng. C 26 (2006) 369.
- [8] Y. Lu, M. Yang, F. Qu, G. Shen, R. Yu, Bioelectrochemistry 71 (2007) 211.
- [9] P.V. Iyer, L. Ananthanarayan, Process. Biochem. 43 (2008) 1019.
- [10] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Enzyme Microb. Technol. 40 (2007) 1451.
- [11] M. Joshi, N. Kale, R. Lal, V. Ramgopal Rao, S. Mukheiji, Biosens. Bioelectron. 22 (2007) 2429.
- [12] L. Cao, Curr. Opin. Chem. Biol. 9 (2005) 217.
- [13] D.S. Rodrigues, A.A. Mendes, W.S. Adriano, L.R.B. Gonçalves, L.C. Giordano, J. Mol. Catal. B: Enzym. 51 (2008) 100.
- [14] M. Bolivar, L. Wilson, S.A. Ferrarotti, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, C. Mateo, Enzyme Microb. Technol. 40 (2007) 540.
- [15] S. Fukui, K. Sonomoto, A. Tanaka, Methods Enzymol. 135 (1987) 230.
- [16] J. Kim, H. Park, D. Jung, S. Kim, Anal. Biochem. 313 (2003) 41.
- [17] L.C. Lopez, R. Gristina, G. Ceccone, F. Rossi, P. Favia, R. d'Agostino, Surf. Coat. Technol. 200 (2005) 1000.
- [18] Z. Zhang, B. Menges, R.B. Timmons, W. Knoll, R. Forch, Langmuir 19 (2003) 4765.
- [19] A.T.A. Jenkins, J. Hu, Y.Z. Wang, S. Schiller, R. Foerch, W. Knoll, Langmuir 16 (2000) 6381.
- [20] K.S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, H.J. Griesser, Plasma Process. Polym. 3 (2006) 392.
- [21] P.K. Chu, J.Y. Chen, L.P. Wang, N. Huang, Mater. Sci. Eng. R: Rep. 36 (2002) 143.
- [22] I. Gancarz, J. Bryjak, G. Pożniak, W. Tylus, Eur. Polym. J. 39 (2003) 2217.
- [23] Z. Zhang, W. Knoll, R. Foerch, R. Holcomb, D. Roitman, Macromolecules 38 (2005) 1271.
- [24] P. Hamerli, Th. Weigel, Th. Groth, D. Paul, Biomaterials 24 (2003) 3989.
- [25] A. Choukourov, H. Biederman, D. Slavinska, L. Hanley, A. Grinevich, H. Boldryeva, A. Mackova, J. Phys. Chem. B 109 (2005) 23086.
- [26] C. Moller, M. Allen, V. Elings, A. Engel, D.J. Muller, Biophys. J. 77 (1999) 1150.
- [27] S.L. McArthur, Surf. Coat. Technol. 38 (2006) 1380.
- [28] A. Abbas, C. Vivien, B. Bocquet, D. Guillochon, P. Supiot, Plasma Process. Polym., in press.
- [29] K. Yuichi, T. Tetsuo, N. Hitoshi, T. Terutoshi, S. Shumpei, Chem. Pharm. Bull. 25 (1977) 3126.
- [30] P. Monsan, G. Puzo, H. Mazarguil, Biochimie 57 (1975) 1281.
- [31] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, Protein Sci. 4 (1995) 2411.
- [32] V. Krishnamurthy, I.L. Kamel, J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 27 (1989) 1211.
- [33] J. Walter, W. Steigemann, T.P. Singh, H. Bartunik, R. Huber, Acta Crystallogr. B 38 (1982) 1462.
- [34] I.S. Tilinin, A. Jablonski, S. Tougaard, Surf. Interface Anal. 25 (1997) 119.
- [35] A. Jablonski, S. Tougaard, Surf. Sci. 432 (1999) 211.
- [36] A. Tarasova, P. Hamilton-Brown, T. Gengenbach, H.J. Griesser, L. Meagher, Plasma Process. Polym. 5 (2008) 175.
- [37] I. Gancarz, G. Pozniak, M. Bryjak, W. Tylus, Eur. Polym. J. 38 (2002) 1937.
- [38] M. Kaba, N. Raklaoui, M.-F. Guimon, A. Mas, J. Appl. Polym. Sci. 97 (2005) 2088.
- [39] S. Swaraj, U. Oran, A. Lippitz, W.E.S. Unger, Plasma Process. Polym. 5 (2008) 92.
- [40] I. Gancarz, J. Bryjak, M. Bryjak, W. Tylus, G. Pozniak, Eur. Polym. J. 42 (2006) 2430.
- [41] A.J. Beck, S. Candan, R.D. Short, A. Goodyear, N.St.J. Braithwaite, J. Phys. Chem. B 105 (2001) 5730.
- [42] A. Mas, H. Jaaba, F. Schue, Macromol. Chem. Phys. 198 (1997) 3737.
- [43] C. Dehili, P. Lee, K.M. Shakesheff, M.R. Alexander, Plasma Process. Polym. 3 (2006) 474.
- [44] S. Monge, A. Mas, A. Hamzaoui, C.M. Kassiss, F. Schu, J. Appl. Polym. Sci. 87 (2003) 1794.
- [45] U. Schulz, P. Munzert, N. Kaiser, Surf. Coat. Technol. 142 (2001) 507.
- [46] G.J. Pap, I. Bertotib, T. Szorenyic, P. Heszler, Surf. Coat. Technol. 180 (2004) 271.
- [47] M.R. Alexander, F.R. Jones, Carbon 34 (1996) 1093.
- [48] A.J. Beck, J.D. Whittle, N.A. Bullett, P. Eves, S.M. Neil, S.L. McArthur, A.G. Shard, Plasma Process. Polym. 2 (2005) 641.
- [49] M.G. Han, S.S. Im, Polymer 41 (2000) 3253.
- [50] L. Betancor, F. Lopez-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G.D.C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, Enzyme Microb. Technol. 39 (2006) 877.
- [51] R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, S. Ali, D. Cowan, Enzyme Microb. Technol. 26 (2000) 568.
- [52] P. Richter, B.L. Ruiz, M. Sanchez-Cabezudo, H.A. Mottola, Anal. Chem. 68 (1996) 1701.
- [53] T.S. Tsapikouni, Y.F. Missirlis, Mater. Sci. Eng. 152 (2008) 2.
- [54] D.A. Estell, T.P. Graycar, J.V. Miller, D.B. Powers, J.A. Wells, J.P. Burnier, P.G. Ng, Science 233 (1986) 659.

4.2 Effets de l'immobilisation sur l'activité enzymatique.

4.2.1 Disposition des enzymes sur les films de ppAA

Nous avons vu précédemment que la procédure d'immobilisation de la trypsine influe significativement sur son activité. La trypsine est une protéine qui contient plusieurs résidus lysines répartis autour de la molécule (Figure 33). Cela implique que toute méthode d'immobilisation par l'intermédiaire des amines aboutirait à un résultat différent selon les résidus mis en jeu et la nature du point d'ancrage (simple ou multiple) [1, 2]. Pour connaître l'effet de cette immobilisation sur l'action de la trypsine, nous avons choisi d'étudier les échantillons définis précédemment par «Si-P-G-E-R». Dans ces derniers, les protéines ont été immobilisées d'une manière covalente par un traitement au glutaraldehyde suivi d'une réduction des imines formées. L'étude précédente montre que les enzymes immobilisées ainsi

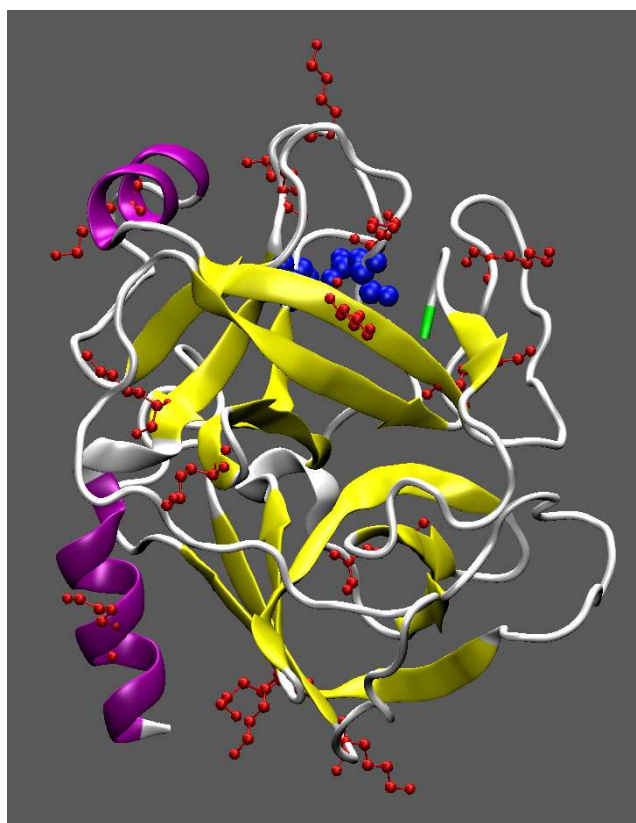


Figure 33. Représentation moléculaire de la trypsine. En rouge, les terminaisons amines des résidus lysines à travers lesquels l'enzyme est liée d'une manière covalente à la surface. En bleu, le site actif impliqué dans la réaction de biocatalyse. Cette représentation a été générée par le logiciel libre VMD (*Visual Molecular Dynamics*).

possèdent l'activité catalytique la plus importante. En plus de la flexibilité générée par le bras espaceur (GA) et la stabilité apportée par la réduction des fonctions imines, les performances des enzymes sont également facilitées par leur positionnement à la surface du support comme montré par l'imagerie AFM. La figure 34 montre que les enzymes ont tendance à s'organiser en «motifs de pétales florales» de 6 à 10 protéines, tout en formant un film monocouche. Ces motifs sont probablement causés par les forces de répulsion des parties hydrophobes de la protéine vis-à-vis du milieu aqueux (comme le feraient les tensioactifs ou les molécules amphiphiles pour former des micelles) [3]. Une telle organisation spatiale réduirait l'encombrement stérique et améliorerait l'accessibilité des sites actifs enzymatiques.

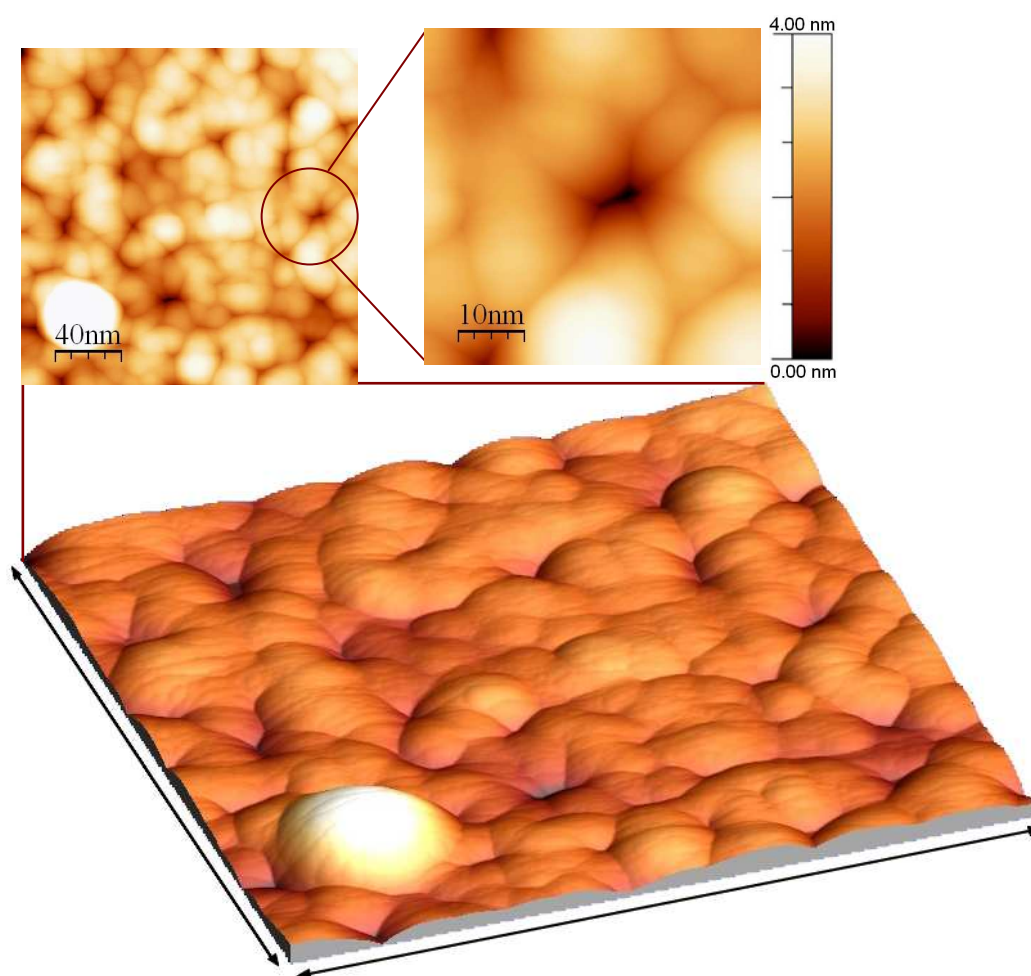


Figure 34. Images AFM (200x200 nm) d'une monocouche de trypsines immobilisées sur un support de silicium fonctionnalisé par un polymère plasma d'allylamine. Les molécules de trypsine (4,9nm×3,9nm×3,3 nm) semblent se stabiliser en formant des motifs en "pétales florales". La bosse blanche sur le côté inférieur-gauche de l'image est une superposition rare d'une vingtaine de protéines au même endroit.

L'étude des effets de cette immobilisation sur les paramètres cinétiques de la trypsine sera réalisée en trois étapes: la première est la caractérisation du spectrophotomètre utilisé (limite de détection, signal/bruit, conditions de référence, étalonnage). La seconde phase est la détermination des paramètres cinétiques (constante de Michaelis, vitesse maximale) de la trypsine en solution, et la dernière phase consistera à déterminer les mêmes paramètres cinétiques après immobilisation de l'enzyme sur un support solide Si/ppAA.

4.2.2 Rappel théorique

4.2.2.1 Les paramètres cinétiques d'une enzyme

La première fonction d'une enzyme est l'accélération de réactions chimiques ($\times 10^7$ - 10^8). Dans sa forme la plus simple, une réaction enzymatique peut être formulée par :



Un substrat S réagit avec une enzyme E pour former un complexe enzyme-substrat ES. Le substrat est ensuite converti en produit P d'une manière irréversible avant d'être libéré. L'enzyme libre peut alors rentrer dans un nouveau cycle de réaction dit cycle catalytique. Chaque étape de ce cycle est caractérisée par une constante de vitesse k , marqué d'un signe positif pour le sens de la réaction ($k_1, k_2, k_3 \dots$), ou d'un signe négatif pour la réaction inverse ($k_{-1}, k_{-2}, k_{-3} \dots$). Cette réaction d'apparence simple est constituée en pratique de plusieurs étapes intermédiaires, avec la formation d'un complexe E-S lié ou non d'une manière covalente et la génération d'un ou de plusieurs produits. Les constantes de vitesse sus-citées ne sont pas accessibles expérimentalement, d'où leur conversion en constantes cinétiques. L'expression $k_{-1} + k_2/k_1$ correspond à la constante de Michaelis, notée K_m (Eq. 18), alors que la quantité $k_2[E]_0$ sera remplacée par la vitesse maximum V_m ($[E]_0$ étant la concentration totale d'enzyme qui est supposée rester stable au cours de la réaction) [4].

Physiquement, V_m est la vitesse atteinte par la réaction pour de grandes concentrations en substrat, et la constante de Michaelis est la concentration en substrat qui permet d'obtenir la moitié de la vitesse maximale. C'est aussi une bonne approximation de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Elle est définie par l'équation de Michaelis-Menten :

$$Km = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (18)$$

La vitesse initiale V_i de l'activité enzymatique est quant à elle exprimée par :

$$V_i = \frac{V_m \cdot [S]_0}{Km + [S]_0} \quad (19)$$

Le rapport $V_m/[E_0]$ représente la constante catalytique k_{cat} ($k_{cat}=k_2=V_m/[E_0]$). C'est une constante de vitesse du premier ordre exprimée en s^{-1} . Elle représente la fréquence à laquelle l'enzyme accomplit l'acte catalytique (*turn over*) lorsque l'enzyme est saturée en substrat. $1/k_{cat}$ est la durée d'un cycle catalytique (en secondes) lorsque l'enzyme est saturée en substrat. La valeur de k_{cat} donne de ce fait la mesure de l'efficacité de la catalyse par l'enzyme sur le substrat. Enfin, une enzyme peut avoir une grande affinité (faible Km) pour un substrat mais une faible efficacité (faible K_{cat}) ou inversement. L'un des deux paramètres ne suffit donc pas à caractériser le couple enzyme/substrat. C'est le rapport K_{cat}/Km , appelé constante de spécificité r_{sp} , qui reflète la spécificité globale d'une enzyme vis à vis d'un substrat.

4.2.2.2 Représentation graphique des résultats

En pratique, Km et V_m sont déterminés en représentant les formules précédentes sous forme de courbes $V_i = f([S]_0)$, dite courbe de saturation ou encore représentation de Michaelis-Menten (Figure 35a). C'est un graphique qui montre la variation de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration initiale en substrat. La première partie de la courbe peut être assimilée à une droite, car la vitesse augmente proportionnellement avec la concentration en substrat, ce qui n'est plus le cas par la suite. La courbe se stabilise finalement à une vitesse maximale (plateau) quelque soit la concentration en substrat. Au niveau de ce plateau, l'enzyme est saturée en substrat. Cette représentation demande un nombre élevé de mesures pour être utilisée avec précision (il faut utiliser une large gamme de concentration de substrat jusqu'à atteindre le plateau pour déterminer la vitesse maximale).

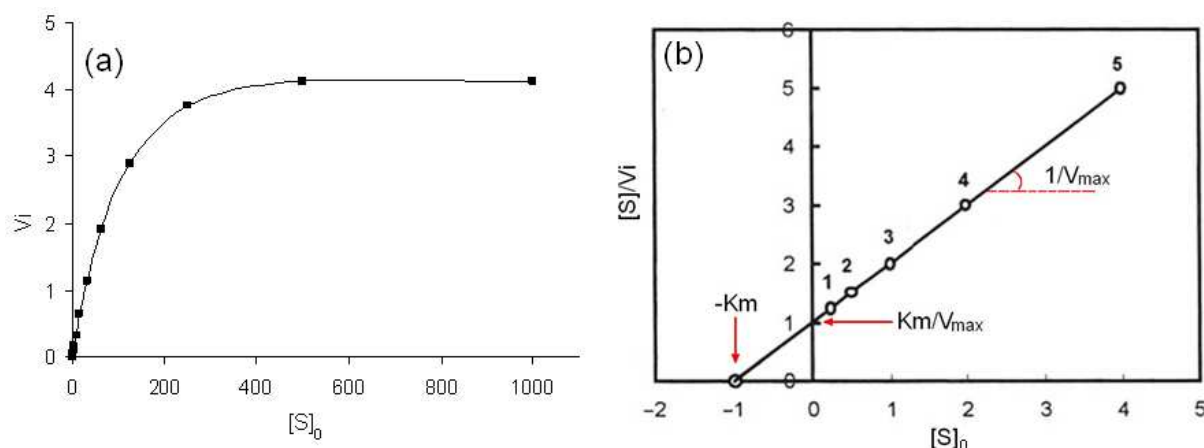


Figure 35. Exemples d'une représentation de Michaelis-Menten (a) et d'une représentation de Hanes-Woolf. Cette dernière permet de déterminer graphiquement les paramètres cinétiques (K_m et V_m).

Cependant, l'équation de Michaelis-Menten est un segment d'une hyperbole rectangulaire, montrant une cinétique de saturation. Dans ces conditions, il n'est pas très simple d'obtenir graphiquement les paramètres cinétiques avec précision. Des transformations linéaires de l'équation permettent une analyse graphique plus simple. En effet la transformation de l'hyperbole rectangulaire permet de calculer avec précision les asymptotes (V_m , K_m) par régression linéaire. Les transformations les plus célèbres sont celles de :

$$\text{Lineweaver-Burk (1935)} \quad \frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_m} + \left(\frac{K_m}{V_m} \right) \frac{1}{[S]_0} \quad (20)$$

$$\text{Hanes et Woolf (1932)} \quad \frac{[S]_0}{V_i} = \frac{K_m}{V_m} + \left(\frac{1}{V_m} \right) [S]_0 \quad (21)$$

$$\text{Eadie (1942) et Hofstee} \quad V_i = V_m - K_m \left(\frac{V_i}{[S]_0} \right) \quad (22)$$

Bien que la représentation de Lineweaver et Burk (en double inverse) soit la plus couramment utilisée dans les laboratoires de biochimie, l'analyse statistique montre que c'est la moins fiable. La plus satisfaisante serait celle de Hanes et Woolf (Figure 35b) [5]. La représentation de Lineweaver-Burk et celle de Eadie-Hofstee ont une coordonnée en $1/[S]_0$, cela signifie que les mesures les plus précises seront concentrées dans la même région (voisine de l'axe vertical). Peu de mesures avec une erreur relativement grande existeront pour des faibles valeurs de concentration de substrat, alors que ces dernières présentent

normalement les erreurs expérimentales les plus grandes. Le tracé de la "meilleure" droite sera donc entaché d'erreur. La représentation de Hanes-Woolf améliorera la détermination des valeurs expérimentales par une distribution plus équilibrée des points expérimentaux, autrement dit, les concentrations les plus petites en substrat seront représentées par beaucoup plus de points expérimentaux, ce qui réduira statistiquement l'erreur sur les valeurs mesurées [5, 6]. Nous allons donc adopter cette représentation dans toutes les analyses qui vont suivre.

4.2.3 Caractérisation du spectrophotomètre

La réaction qui va servir à cette étude est celle décrite précédemment. Elle consiste à hydrolyser le substrat BA-AMC par la trypsine pour produire du N $^{\alpha}$ -benzoyl-L-arginine (BA) et le produit fluorescent 7-amino-4-méthylcoumarin (AMC) (Annexe 1a,b). Cette réaction a été conduite à température ambiante (24 °C), avec une excitation à 380 nm et émission à 440 nm. Avant de procéder à l'étude des réactions enzymatiques, le spectrofluoromètre *Perkin-Elmer Luminescence spectrometer LS 50B* a été caractérisé pour définir ses limites de détection et les conditions de référence. Nous avons d'abord procédé à l'analyse de l'influence et la contribution des différentes solutions et solvants utilisés dans la fluorescence enregistrée. Les résultats représentés dans la figure 36, permettent de faire trois observations principales :

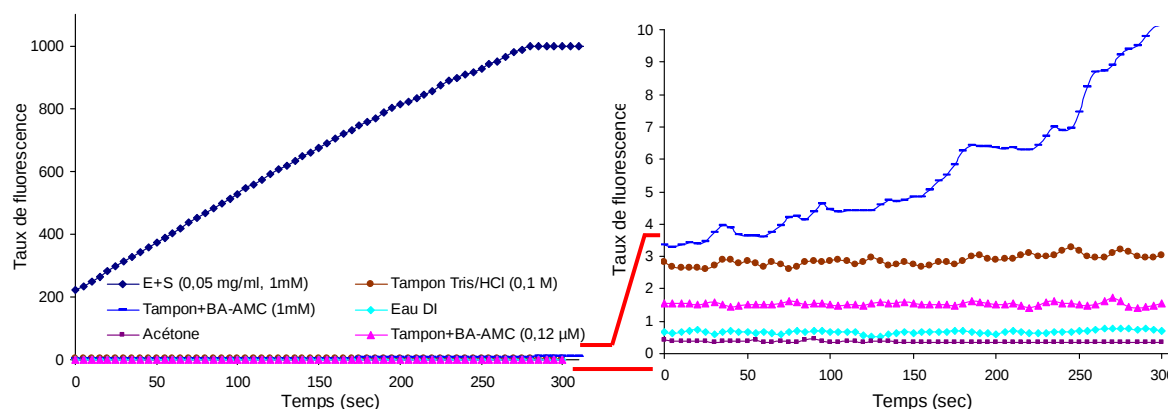


Figure 36. Influence des différentes solutions et tampons utilisés sur la fluorescence enregistrée. Conditions de mesure : [BA-AMC]=1mM, [Trypsine]= 60 µg/ml, Tampon à pH 8, T°=22 °C.

- ✓ La fluorescence est détectable sur une échelle de 0 à 1000;
- ✓ Toutes les solutions utilisées ne participent que de 0,04-0,3 % à la fluorescence détectée;
- ✓ Le substrat BA-AMC s'hydrolyse seul en l'absence d'enzyme, mais avec une vitesse très faible. Cette hydrolyse spontanée participe de 1% à la fluorescence globale d'une réaction enzymatique après 300 secondes. Ce taux augmente légèrement avec la concentration du substrat, mais il est probablement plus faible lors de la réaction enzymatique à cause de la compétition.

Le second test concerne les limites de détection du spectrofluoromètre. Ces limites ont été estimées par une courbe de régression linéaire basée sur 15 mesures de l'évolution de l'intensité de la fluorescence en fonction de la concentration d'enzyme ($[E] = 0,05\text{--}400\ \mu\text{g/ml}$ pour $[S] = 1\text{mM}$), mais aussi en fonction de la concentration du substrat ($[S] = 10\text{ nM--}2\text{ mM}$ pour $[E] = 60\ \mu\text{g/ml}$) (Annexe 3a,b). Les résultats montrent que dans les conditions de saturation en substrat, la plus basse concentration d'enzyme qui peut être utilisée est de $0,1\ \mu\text{g/ml}$. Dans le cas d'une saturation en enzyme, le maximum de produit mesurable est de $4\ \mu\text{M}$ (le produit étant très fluorescent), et le minimum détectable est de 4 nM . Ces limites sont évidemment dépendantes de $[E]$ et sont spécifiques au substrat utilisé. Plus celui-ci est fluorescent, plus les deux valeurs baissent et inversement. A la lumière de toutes ces mesures, nous avons choisi d'effectuer l'étude enzymologique avec $[E] = 3\ \mu\text{g/ml}$ et $[S] = 60\text{ nM--}1\text{ mM}$, bien que seules les valeurs entre $2\ \mu\text{M}$ et $270\ \mu\text{M}$ seront exploitées pour le calcul des paramètres cinétiques.

4.2.4 Etude de la réaction enzymatique en solution

La détermination des caractéristiques cinétiques de la trypsine commence par la réalisation d'un étalonnage. Il est à noter qu'une courbe d'étalonnage avec le produit (AMC) pur, obtenu dans le commerce, a été réalisée mais n'a pas été adoptée dans les analyses. Ceci est dû au fait que la fluorescence du produit commercial est très supérieure à celle du produit issu de la réaction enzymatique, probablement à cause de la différence dans la composition du milieu réactionnel. Une autre courbe d'étalonnage a donc été réalisée en suivant la réaction enzymatique jusqu'à la saturation (stade plateau) pour différentes concentrations de substrat. L'intensité de fluorescence enregistrée au niveau du plateau correspondrait à la concentration

du substrat utilisée. Une courbe de régression a alors été tracée pour les différentes concentrations (Figure 37). Quinze mesures différentes ont été réalisées en variant les concentrations du substrat, chaque mesure dure environ 6 min, temps suffisant pour avoir une droite de la vitesse initiale. Les résultats des mesures sont présentés dans les figures 38 et 39, et dans le tableau II. Ils seront discutés dans la section suivante.

4.2.5 Etude de la réaction enzymatique sur support solide

Des supports Si-P-G-E-R avec une concentration d'enzyme estimée à $2,8 \pm 0,2$ mg/m² (voir Article 2) ont été utilisés dans les mesures qui suivent. Afin de pouvoir étudier l'activité des enzymes immobilisées, le support Si-P-G-E-R a été disposé sur le bord interne de la cuvette d'analyse tel que montré dans la figure 21 (chapitre 2, page 36). Cette disposition implique la réalisation d'une autre courbe d'étalonnage qui prend en considération les effets du support solide sur l'intensité de la fluorescence enregistrée. Nous avons donc réalisé différents étalonnages avec l'enzyme libre dans une cuvette sans support solide, avec le support Si, puis avec le support Si-ppAA. Nous pouvons voir clairement à partir de la figure 37 que la présence des supports de Si ou de Si-ppAA a un effet considérable mais différent sur l'intensité de la fluorescence enregistrée. La courbe d'étalonnage avec Si-ppAA a été alors adoptée pour l'analyse de tous les résultats concernant l'enzyme immobilisée.

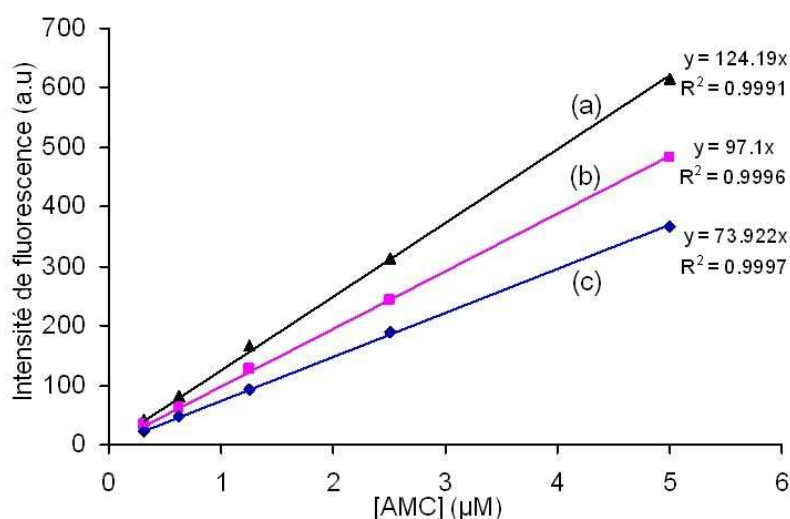


Figure 37. Courbe d'étalonnage de l'hydrolyse de BA-AMC par la trypsine sans support Si (a), avec un support Si (b) ou Si-ppAA (c) dans la cuvette d'analyse.

L'analyse de la réaction catalytique de l'enzyme immobilisée a suivi les mêmes procédures et conditions que l'analyse concernant l'enzyme libre. Une courbe de saturation a été réalisée pour les deux analyses (Figure 38), puis transformée par la représentation de Hanes et Woolf (figure 39). Pour un objectif de comparaison, les paramètres cinétiques obtenus ont été représentés ensemble dans le tableau II.

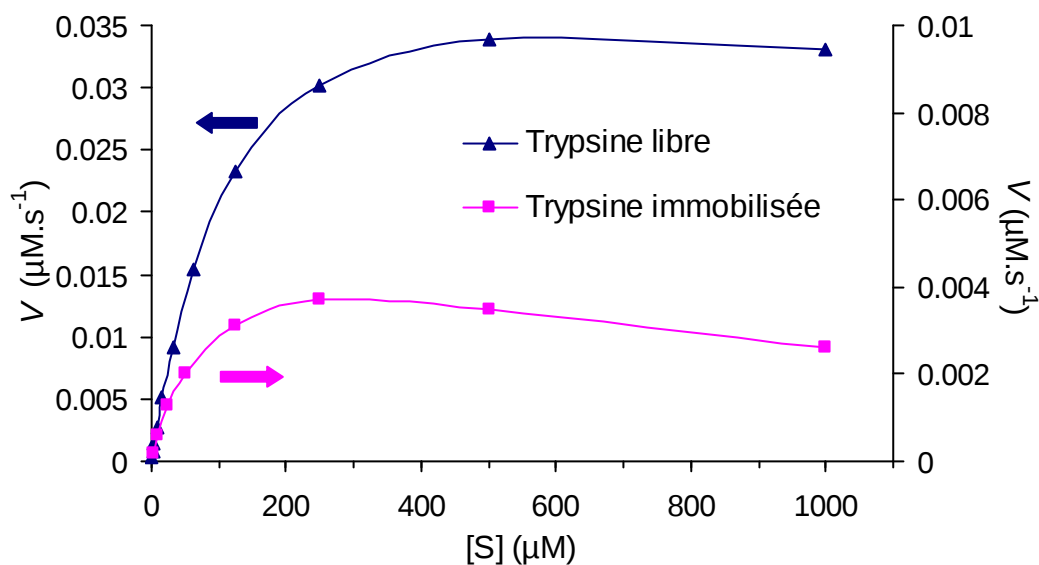


Figure 38. Représentation de Michaelis-Menten pour la trypsine libre vs. Trypsine immobilisée.

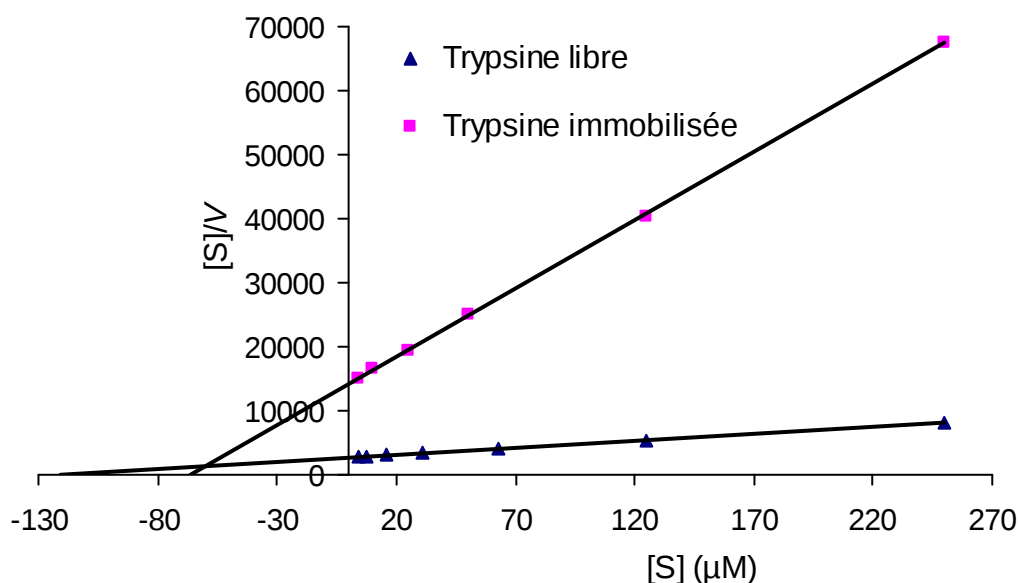


Figure 39. Représentation d'Hanes-Woolf pour la trypsine libre vs. trypsine immobilisée.

Tableau II. Paramètres cinétiques apparents de la trypsine libre vs. trypsine immobilisée.

	V_m ($\mu\text{M.s}^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
Trypsine libre	$(4,5 \pm 0,3) \times 10^{-2}$	$(35 \pm 5) \times 10^{-2}$	$(12 \pm 0,6) \times 10^{-2}$	$2,9 \pm 0,5$
Trypsine immobilisée	$(0,47 \pm 0,02) \times 10^{-2}$	$(3,5 \pm 0,4) \times 10^{-2}$	$(6,7 \pm 0,5) \times 10^{-2}$	$0,6 \pm 0,1$

Ces résultats nous permettent de conclure que:

- ✓ Les paramètres cinétiques obtenus pour l'enzyme libre sont similaires à ceux rapportés par Yuichi et *al* ($K_m = 0,11$ mM et $K_{cat} = 0,42$ s^{-1}) [7].
- ✓ L'immobilisation de l'enzyme sur le Si-ppAA en première approximation améliore son affinité (K_m) pour l'enzyme d'environ deux fois, mais réduit l'efficacité de l'enzyme d'environ 10 fois.
- ✓ Considérant le rapport K_{cat}/K_m , l'activité apparente de l'enzyme immobilisée est environ 5 fois plus faible que celle de l'enzyme libre.
- ✓ Enfin, il est important de souligner que ces paramètres cinétiques apparents ont été enregistrés sans agitation du milieu réactionnel et donc avec des contraintes diffusionnelles probablement importantes [8].

Bien que les paramètres cinétiques de l'enzyme paraissent relativement affectés par l'immobilisation, les valeurs enregistrées restent de même ordre de grandeur que celles de l'enzyme libre, ce qui signifie que les enzymes immobilisées restent très actives. Une compréhension plus approfondie de l'évolution exacte des paramètres cinétiques après immobilisation devrait se faire par une étude de la cinétique diffusion-réaction. Une utilisation des BioMEMS permettrait sans doute un meilleur confinement du milieu réactionnel et donc une plus grande maîtrise des phénomènes diffusionnels.

Références

- [1] Monsan P., “Influence of the conditions of trypsin immobilization onto Spherosil on coupling efficiency”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 1978, 1-11
- [2] Rodrigues D. S., Mendes A. A., Adriano W. S., Goncalves L. R. B., Giordno R. L. C., “Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods”, *J. mol. catal. B: Enzymatic*, **51**, 2008, 100-109.
- [3] Tsapikouni T. S., Missirlis Y. F., “Protein–material interactions: From micro-to-nano scale”, *Mat. Sci. Eng: B*, **152**, 2008, 2-7.
- [4] Illanes A., “Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications”, Springer Science + Business Media B.V., 2008, 398 pages.
- [5] Leskovac V., “Comprehensive Enzyme Kinetics”, Kluwer Academic Publishers, 2004, New York, 451 pages.
- [6] Bisswanger H., “Enzyme Kinetics: Principles and Methods”, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, Weinheim Germany, 322 pages.
- [7] Yuichi K., Tetsuo T., Hitoshi N., Terutoshi T., Shumpei S., “Synthesis of a Key Fluorogenic Amide, L-Arginine-4-methylcoumaryl-7-amide (L-Arg-MCA) and Its Derivatives. Fluorescence Assays for Trypsin and Papain”, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1977, 3126-3128.
- [8] Richter P., Ruiz B.L., Sanchez-Cabezudo M., Mottola H.A., “Immobilized enzyme reactors. Diffusion/convection, kinetics, and a comparison of packed-column and rotating bioreactors for use in continuous-flow systems”, *Anal. Chem.*, **68**, 1996, 1701-1705.

Chapitre 5 ---

*Microfabrication et application du BioMEMS
TeraHertz.*

Chapitre 5

Microfabrication et application du BioMEMS TeraHertz.

Ce chapitre représente l'aboutissement final de ce travail de thèse et le point de convergence des différents procédés développés. Il est structuré par deux parties: la première se présente sous la forme d'un article publié, décrivant la bio-fonctionnalisation d'un BioMEMS THz par les procédés décrits dans les chapitres 3 et 4 et la première utilisation de ce dernier pour l'analyse de la biocatalyse. La seconde partie résume les perspectives de l'analyse TeraHertz dans le domaine biomédical et les développements nécessaires pour un large déploiement d'une telle méthode.

5.1. BioMEMS TeraHertz: fabrication, fonctionnalisation et étude de faisabilité

Dans les chapitres précédents, le dépôt plasma d'un polymère d'allylamine et le procédé d'immobilisation covalente de la trypsine sur ce polymère ont été évalués et optimisés. Ces développements ont été intégrés dans un procédé de microfabrication d'un BioMEMS THz dans le but d'immobiliser la composante biologique (enzymes) dans le microsystème, et le rendre ainsi fonctionnel pour une mesure en ligne de la réaction de biocatalyse. Cette étape est l'objet de l'article 3 publié dans la revue internationale à comité de lecture *Biosensors and Bioelectronics*. L'article est intitulé: «BioMEMS TeraHertz fonctionnalisé par plasma froid pour l'analyse de réactions enzymatiques». Il décrit les étapes de fabrication des différents niveaux du BioMEMS, avec sa partie électromagnétique (capteurs THz), microfluidique, et la fonctionnalisation biologique. Des mesures préliminaires de la réaction d'hydrolyse du substrat BA-AMC par la trypsine immobilisée ont été effectuées pour démontrer la faisabilité d'une telle approche à l'échelle micrométrique.



Cold plasma functionalized TeraHertz BioMEMS for enzyme reaction analysis

Abdenmour Abbas^{a,b,c}, Anthony Treizebre^a, Philippe Supiot^b, Nour-Eddine Bourzgui^a,
Didier Guillochon^c, Dominique Vercaigne-Marko^c, Bertrand Bocquet^{a,*}

^a Institute of Electronics, Microelectronics and Nanotechnology (UMR-CNRS 8520), University of Lille1, F59655 Villeneuve d'Ascq, France

^b Laboratory of Process Engineering of Reactive Fluids-to-Materials Interactions (EA 3571), University of Lille1, F59655 Villeneuve d'Ascq, France

^c Laboratory of Biological Processes, Enzymatic and Microbial Engineering (EA 1026), University of Lille1, F59655 Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2009

Received in revised form 14 June 2009

Accepted 16 June 2009

Available online 24 June 2009

Keywords:

Biocatalysis

BioMEMS

Cold plasma

Sub-TeraHertz spectroscopy

Thin films

ABSTRACT

In this paper, we describe the development, functionalization and functionality testing of a TeraHertz (THz) Bio-MicroElectroMechanical System (BioMEMS) dedicated to enzyme reaction analysis. The microdevice was fabricated by mixing clean room microfabrication with cold plasma deposition. The first is used to build the microfluidic circuits and the THz sensor, while the later serves for the polymerization of allylamine using a homemade glow discharge plasma reactor for a subsequent immobilization of enzymatic biocatalysts. Thermal stability of the deposited plasma polymer has been investigated by infrared spectroscopy. Fluorescent detection confirmed the efficiency of the immobilization and the enzyme hydrolysis into the BioMEMS microchannels. For the first time, the progression of the hydrolysis reaction over time was monitored by the THz sensor connected to a vectorial network analyzer. Preliminary results showed that sub-THz transmission measurements are able to discriminate different solid films, various aqueous media and exhibit specific transmission behavior for the enzyme hydrolysis reaction in the spectral range 0.06–0.11 THz.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

TeraHertz (THz) radiations are the bridging region between the microwave and the infrared spectrum, from 0.1 to 10 THz. The extended notion includes some millimeter and submillimeter-waves, i.e. sub-THz frequencies. The use of THz spectroscopy in analytical biochemistry is becoming an exciting challenge since theoretical predictions showed that biomolecules should present multiple and specific resonances in the picosecond timescale, i.e. THz frequency range (Bykhovskaia et al., 2001; Lawrence et al., 1987; Van Zandt and Saxena, 1989). These specific features rely in low frequency collective vibrational and rotational modes involving weak hydrogen bonds and other weak intramolecular and/or intermolecular interactions. Additionally, because of their low energies (0.4–40 meV), THz waves are non-ionizing radiations, and thus represent a non-destructive analysis approach. Many experimental results confirmed the potential of THz waves for biosensing (Choi et al., 2002; Globus et al., 2006; Markelz et al., 2000; Nagel et al., 2002). Most of these studies have been conducted in the solid state, rather than in an aqueous media. The reason is that water exhibits a strong absorbance in the THz domain. To overcome this problem and enable the monitoring of biomolecules dynamics and reactions,

efforts have been focused on the use of microsystems to reduce the transmission path length. Microfluidic systems and BioMEMS have been used to draw microvolume of fluids until the THz sensor (Facer et al., 2001; Hefti et al., 1999; Nagel et al., 2006; Treizebré et al., 2005; Treizebré and Bocquet, 2008).

Among the biological entities studied with THz radiations, the enzyme biocatalysis is one of the less explored topics. The enzyme activity can be investigated by THz since this activity is associated with conformational changes that occur during the conversion of the substrate to the product, such as the protein hydrolysis into peptides after binding to a specific enzyme. To enable these measurements, one of the most crucial challenges is the development of a suitable interface with biological materials in order to immobilize the biocatalyst inside the BioMEMS microchannel and onto the THz probe. Many processes have been developed, that are principally related to wet chemistry. The drawback is that solution-based surface treatments usually need solvents, are costly and time-consuming and consequently unsuit for further industrial scale development.

Plasma thin film deposition represents a promising alternative for microdevices bio-functionalization, which could be easily integrated in the microfabrication process. Plasma-polymerized coatings have already been used in microsystems field, as a support for electronic or electromagnetic sensors (Hiratsuka et al., 2004), as a stationary phase on chromatography microcolumns (Lima et al., 2008) and as a structural material for microfluidic network

* Corresponding author. Tel.: +33 320 19 79 37; fax: +33 320 19 78 92.
E-mail address: bertrand.bocquet@univ-lille1.fr (B. Bocquet).

fabrication (Abbas et al., 2009). Moreover, they have been widely used for electrochemical sensors (Liu et al., 2005; Muguruma et al., 2008), surface plasmon resonance devices (Muguruma et al., 2000), and DNA microarrays (Hook et al., 2006). The growing use of plasma polymers in BioMEMS and biosensors technologies lies in the characteristics of these films: (i) homogenous and pinhole-free deposition on the surface, (ii) good biocompatibility, (iii) strong adhesion to different substrates and (iv) the thickness could easily be controlled in a relatively wide range, going from few nanometers to several hundreds micrometers. Additionally, they are generally deposited in a low temperature process ($<70^{\circ}\text{C}$), which ensure the preservation of the substrate surface and the integrated components.

This work is dedicated to the fabrication of a THz BioMEMS by combining the microfabrication technology with the cold plasma functionalization. The goal is to obtain a functional microdevice with integrated THz sensor and immobilized biocatalysts to allow further real time THz monitoring of enzyme reaction kinetics.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The BioMEMS was fabricated using quartz substrates and high resistivity silicon wafers (100 oriented, p-doped, resistivity $>2000\ \Omega\text{cm}$), obtained from Siltronic (France). All the substrates were degreased by ultrasonication in acetone and isopropanol for 5 min each, then dried under nitrogen stream prior to use. Benzocyclobutene (BCB) used for wafer bonding was from Dow Chemical Co. Allylamine solution ($>99\%$ purity) was acquired from Fluka Analytical. Sodium dihydrogenophosphate, disodium hydrogenophosphate and glutaraldehyde (25%) were from VWR Prolabo. Trypsin lyophilized powder from bovine pancreas (EC 3.4.21.4, 23 500 Da, 13 500 U/mg), $N\alpha$ -benzoyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (BA-AMC, 99% purity), sodium cyanoborohydride (NaBH_3CN , 94% purity) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) was obtained from Merck Eurolab.

All reagents are of analytical grade and were used without further purification. Deionized Milli-Q water (Millipore) with the resistivity of $18\ \text{m}\Omega\text{cm}$ was used for the preparation of 20 mM phosphate buffer solution (PBS) with pH 6.8, and 100 mM Tris buffer (pH 8.0).

2.2. BioMEMS microfabrication

The BioMEMS was fabricated using three materials commonly used in microelectronics, i.e. BCB polymer, silicon and quartz substrates. These materials have been selected for their good mechanical and dielectric properties. In addition, BCB and quartz are transparent, which enable further microscopic observation. The microfabrication process consist in three main steps: (i) processing of the microchannels on the Si substrate, (ii) deposition of the THz waveguide on the quartz substrate, and (iii) the bonding step of the different levels. The detailed steps and process parameters could be found in Supplemental Data (Table S1). The first step begins with the deposition of a silicon nitride (Si_3N_4) layer, used here as a hard mask for the etching steps. After traditional photolithography and Si_3N_4 layer etching, the silicon substrate was etched on both sides to form microchannels measuring $50\ \mu\text{m}$ width for the thinner part and $150\ \mu\text{m}$ depth.

The gold THz waveguide with $2\ \mu\text{m}$ thickness was realized on a quartz substrate using a lift-off technique. The obtained THz probe consists of two coplanar waveguide–Goubau transitions which will be in contact with the vectorial network analyzer (VNA), and a

$5\ \mu\text{m}$ width transmission wire (Goubau line) which crosses the microchannel and senses its content. More details on the obtained transmission line can be found elsewhere (Treizebré et al., 2005; Treizebré and Bocquet, 2008). The last step of the BioMEMS fabrication is the bonding of the silicon substrate that forms the microchannels (level 2) onto the quartz substrate supporting the THz waveguide (level 1). The two substrates were aligned and assembled in a way to have the transmission line under the thinner part of the microchannel (Fig. 1). The obtained structure will subsequently undergo an aminofunctionalization to introduce amine groups on the surface by the means of plasma polymerization as we can see below. Finally, the structure (levels 1 + 2) was covered by a BCB coated glass substrate (level 3 in Fig. 1a) to obtain buried microchannels.

2.3. Plasma aminofunctionalization

Plasma deposition used a 13.56 MHz homemade radio-frequency (RF) glow discharge plasma reactor described previously (Abbas et al., in press-a). First, level 1 of the BioMEMS supporting both open microchannels and the THz probe underwent a UV light–ozone treatment in a UVO cleaner (Jelight Company Inc.) for 20 min. This treatment cleans the substrate surface from organic contaminants and renders it more hydrophilic and then more suitable for further material deposition. Immediately after treatment, the substrate (level 1) was introduced into the reaction chamber of the RF plasma reactor. Prior to plasma polymerization, the chamber was evacuated to a background pressure 0.3 Pa. A non-polymerizable gas, i.e. argon (Ar) was introduced at a flow rate of 250 sccm and the pressure adjusted to approximately 165 Pa. The plasma was then ignited by the injection of 75 W RF power. The polymerization reaction was initiated after the introduction of the reactive allylamine monomer, giving additional partial pressure of 25 Pa. The reaction was carried out during 2 min to give a plasma polymerized allylamine (ppAA) film thickness of approximately 50 nm, according to the deposition rate of 26 nm/min described in previous works (Abbas et al., in press-a).

2.4. Enzyme immobilization

The enzyme immobilization was performed after bonding of the two microsystem levels and connecting the microfluidic circuit to inlet and outlet capillaries. A proteolytic enzyme, i.e. trypsin was used as model biocatalyst. The enzyme immobilization procedure was achieved as follows. First, a glutaraldehyde solution (5% (v/v) in PBS) was injected into the microchannel with a flow rate of $20\ \mu\text{L}/\text{h}$ for 3 h and let to react with the aminated polymer surface. This activation was followed by a washing step using PBS to remove unbonded glutaraldehyde. Then, a solution of 2 mg/mL trypsin was introduced into the microchannels with the same flow rate and duration mentioned above. Finally, a 0.1 M sodium cyanoborohydride solution prepared in PBS was injected into the microchannels and let to react for 30 min. A last washing step was performed to remove all the unbonded molecules. The functionalized BioMEMS was dried and stored at 4°C until use.

2.5. Characterization techniques

Because the ppAA coated level 1 will be thermally bonded to the other levels of the BioMEMS, the deposited polymer should have adequate thermal stability to withstand the bonding temperatures ($\sim 150^{\circ}\text{C}$), and retain sufficient amine functionalities for further immobilization purposes. The thermal stability of ppAA films was studied by annealing process at 150 and 300°C with exposition time going from 2 to 30 min. The chemical structure of these films was investigated by Fourier transform infrared (FT-

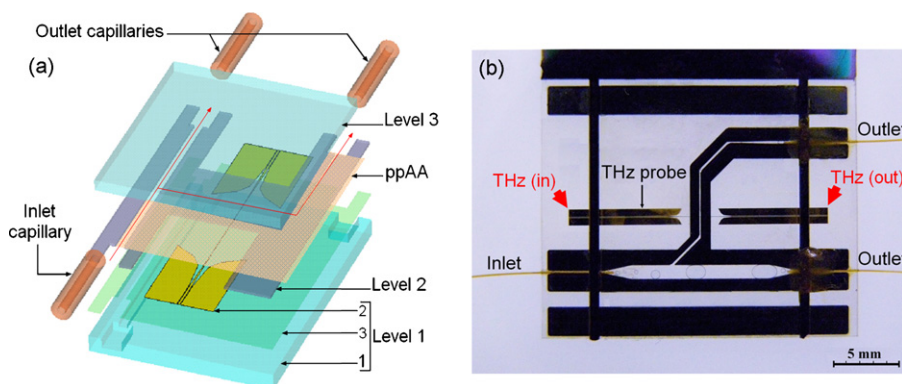
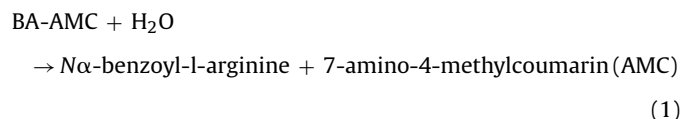


Fig. 1. The THz BioMEMS. (a) Fabrication process. Level 1: quartz substrate (1) supporting the gold THz waveguide (2). This level is coated with BCB (3) to allow the bonding of the microfluidic circuit (red lines) etched on a silicon substrate (level 2). The obtained structure (levels 1 + 2) is exposed to plasma polymerization of allylamine (ppAA) before being covered by a glass substrate (level 3). (b) Overview photograph of the THz BioMEMS. The red arrows show the position of the VNA tips. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

IR) spectroscopy using a PerkinElmer spectrometer. Polymer films were deposited on aluminum disks because of their high reflectivity in the IR region. The deposits were analyzed in the spectral range $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ under specular reflection mode with an incident angle of 45° . Thirty interferograms were averaged per spectrum at a resolution of 4 cm^{-1} . Ratios of the spectra areas were calculated after a linear baseline correction.

Surface topography of the substrates prior to and after plasma polymer deposition and enzyme immobilization was determined using atomic force microscopy (AFM) (Digital Instrument Nanoscope IIIa). AFM scans were conducted in the air by tapping mode at an average scanning rate of 1 Hz, and using a Si_3N_4 cantilever with a tip curvature radius of 10–15 nm. For each sample, scans of $1\text{ }\mu\text{m} \times 1\text{ }\mu\text{m}$ were performed at several randomly selected locations to check the surface uniformity.

To control the efficiency of the immobilized biocatalyst, trypsin activity was monitored by fluorescent microscopy according to the hydrolysis reaction of the substrate *N* α -benzoyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin (BA-AMC):



A 1 mM BA-AMC solution was prepared in Tris buffer to allow an optimum pH for the enzyme reaction, and then injected into the functionalized microsystem. The substrate biocatalysis affords a highly fluorescent product, i.e. AMC at around 380 nm (Yuichi et al., 1977). Fluorescence emission was detected with a Microscope Leica DM IRE2, equipped with A4 filter and Leica DFC 300FX camera.

2.6. Sensor functionality testing

The sensing experiments were performed by connecting the waveguide of the BioMEMS to the VNA. The latter works as a source and a detector of THz waves. It sends a signal via the THz probe through the BioMEMS and detects the reflected and transmitted signal. The VNA can calculate the change in phase, amplitude and the loss of transmission or reflection for each frequency. However, in the present work, only the transmission parameter is presented. Measurements were carried out with 8510XF VNA (Agilent technologies, USA), working in the bandwidth 0.045–110 GHz, and associated with V05VNA2-T/R extender modules (from Oleson Microwave Labs®). It is equipped with on-wafer probes (220-GSG-50-BTM from Picoprobe®) and LRM calibration. Sub-THz experiments were

reported for the frequency range 60–110 GHz because of the coplanar waveguide-Goubau transitions present a cutting frequency at 60 GHz. Firstly, measurements were performed in dry state to characterize the transmission of the THz probe before and after the deposition of ppAA and the immobilization of trypsin molecules. Analysis was then conducted on various aqueous media and a preliminary enzyme assay was realized. Enzyme biocatalysis was monitored at room temperature during 20 min and the transmission signals were recorded every 2 min for the same frequency range. As a control for the enzyme reaction assay, the immobilized trypsin molecules were irreversibly inhibited by the injection of 0.1 M PMSF solution for 30 min.

3. Results and discussion

3.1. Chemical structure and thermal stability of ppAA

Plasma polymerization of allylamine aims to introduce primary amine functionalities onto the microchannel and THz probe surfaces. These chemical reactive groups are widely used for biomolecule immobilization through crosslinking agents such as glutaraldehyde. The infrared spectrum of ppAA film is shown in Fig. 2. The vibrational absorption bands at $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ are assigned to stretching vibrations of the amine groups. The absorption peaks at around 2962, 2934 and 2875 cm^{-1} could be attributed to the stretching mode of aliphatic C–H groups. The band around 1660 cm^{-1} is mainly assigned to the primary amine group bending and the imine stretching modes. Bands at 2185 cm^{-1} correspond to nitrile compounds ($\text{C}\equiv\text{N}$) with a possible contribution from imine groups.

Instead of conventional polymers formed by repeating monomer units, plasma polymers result in plasma-assisted fragmentation, reorganization and crosslinking of broken monomer units. In this work, ppAA films were prepared at 75 W discharge power to ensure a high polymer crosslinking degree and consequently good mechanical properties. These films will be integrated in a relatively high temperature fabrication process. Therefore, their thermal resistance should be sufficient to maintain the reactivity of ppAA functional groups. Polymers thermal stability was studied by annealing process. Fig. 2 reports the changes in ppAA FTIR spectrum following the annealing temperature and duration. At 150°C , a decrease in –NH in respect to C–H groups is observed. However, the decrease in the –NH groups concentration remains relatively low (5–12%) even after 30 min of annealing. This result shows clearly that a temperature around 150°C could be used for ppAA processing without inducing major effects on the polymer

structure. At 300 °C, important changes appears abruptly after only 1 min of annealing. A broadening of the C=N peak (1660 cm^{-1}) and a decrease by 62.2% of the ratio CN/CH can be observed. These changes could be explained by the formation of polyimine ring structures by nitrile group reaction (Krishnamurthy et al., 1989). This chemical conversion is accompanied by a remarkable change in color from yellow to brownish red. Additionally, peaks in the region $2100\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ show a huge decrease in intensity comparing to films that underwent lower temperatures (150 °C). This suggests that temperatures around 300 °C are above the critical point over which the bulk structure and the polymer crosslinking seems to be highly and irreversibly affected.

3.2. Enzyme immobilization and bioactivity

Enzyme molecules are attached to the polymer surface through the reactive bifunctional agent, *i.e.* glutaraldehyde as described previously (Abbas et al., *in press-b*). Glutaraldehyde reaction with primary amine leads to the formation of instable imino bonds. To fix this linkage and prevent the molecule leakage during process, cyanoborohydride was used as a reducing agent of the imino groups, giving rise to more stable amino bonds (Abbas et al., *in press-b*). This treatment is highly important because of BioMEMS should be reusable.

Plasma functionalization of the microchannel (level 1) includes the THz waveguide surface, the bottom surface of the quartz substrate and the channel side walls formed by silicon (Supplementary Fig. S1). The later represents the largest area of the microchannel inner surface. To verify the efficiency of the immobilization step and the surface coverage by the enzymatic biocatalysts, ppAA coated Si substrates were used for enzyme immobilization and then analyzed by AFM. Fig. 3 displays the surface topography of the Si substrates prior to and after ppAA deposition and enzyme immobilization. The average root-mean-square (RMS) roughness and the peak-to-valley (P–V) distance were measured after each surface treatment. The Si substrate shows a 0.24 nm RMS roughness and a P–V distance of around 1.78 nm, typical of oxidized silicon after UV–O₃ cleaning. The ppAA deposition does not change significantly the RMS roughness (0.26) and slightly increases the P–V distance to 2.12 nm. This means that ppAA is highly smooth at the thicknesses used here. Additionally, the AFM images show a continuous pinhole-free film. After enzyme attachment, roughness values increase to 0.49 nm

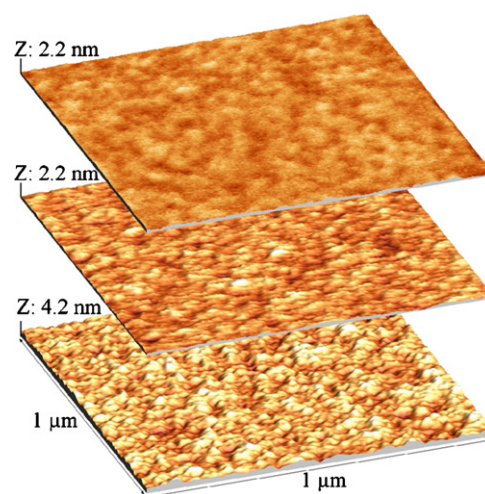


Fig. 3. AFM 3D images depicting the alteration of the surface topography following the surface treatment steps. From top to bottom: oxidized Si surface, ppAA coating on Si substrate, and a monolayer of trypsin molecules immobilized onto ppAA surface.

(+54%) and 3.64 (+58%) for RMS and P–V distance respectively. The 3D images show that protein molecules spread laterally forming a continuous enzyme monolayer of 2–4 nm thickness, which is in agreement with the calculated dimensions of trypsin (Walter et al., 1982).

To confirm the activity of the immobilized trypsin molecules inside the BioMEMS, the fluorogenic specific substrate BA-AMC was injected into the microchannels and the hydrolysis reaction observed using fluorescence microscopy. High fluorescence intensity can be seen in Fig. 4 immediately after injection, confirming both the efficiency of the immobilization process and the preserved activity reported previously (Abbas et al., *in press-b*). This reaction was observed for at least 3 h of continuous process with a renewal of the substrate solution, showing the good stability of the microreactor.

3.3. Sub-THz transmission analysis

Before discussing the different sub-THz spectra, three observations should be pointed out. First, dimensions of the BioMEMS components and the thickness of deposited layers are much smaller than the free-space wavelengths of radiation in the THz range used here (2.6–5 mm). This feature not only enables the monitoring of small volumes of liquids (the analyzed volume is less than 1 nL), but also allows a considerable reduction in interference effects. However, the transmitted THz signals will be affected by absorptions, reflections and interferences rising from different material interfaces and microchannel contents. To obtain a better insight on the actual sample behavior, transmission spectra have been normalized with respect to water or the corresponding buffer. The relative transmission T_R was obtained by the ratio $T_{\text{sample}}/T_{\text{reference}}$. Second, the signal path length used here is approximately 50 μm corresponding to the microchannel width. Such a small path is useful for reducing signal attenuation. Previous measurements showed a low loss propagation of 2.5 dB at 180 GHz for a 2 mm length planar Goubau line (Treizebré et al., 2008b). Third, periodic peaks at approximately each 10 GHz are observed in almost all spectra. These peaks, such as those marked by arrows in Fig. 5a are caused by standing waves effects. The distance between two peaks is defined by the waveguide dimensions and microchannel architecture. Finally, the reproducibility of the device was checked by repeating each measurement at least five times. Measurements show a high reproducibility with a relative standard deviation of 4×10^{-4} W for the transmission power.

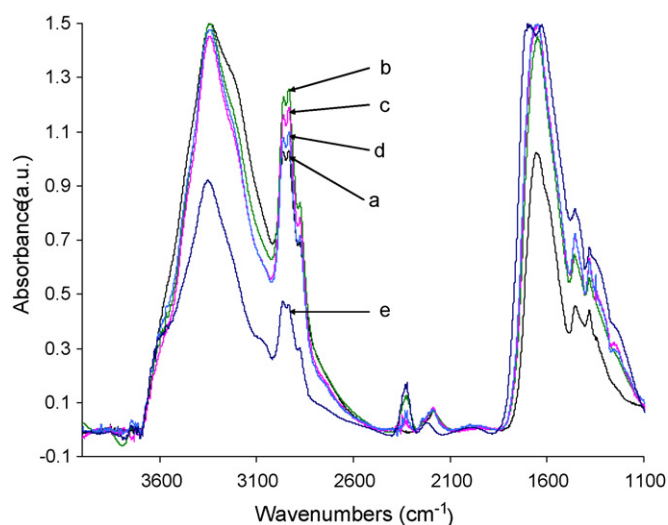


Fig. 2. FTIR spectra of ppAA films before (a) and after annealing at 150 °C during (b) 10 min, (c) 20 min and (d) 30 min. Spectrum (e) represents the film structure after annealing at 300 °C during 1 min.

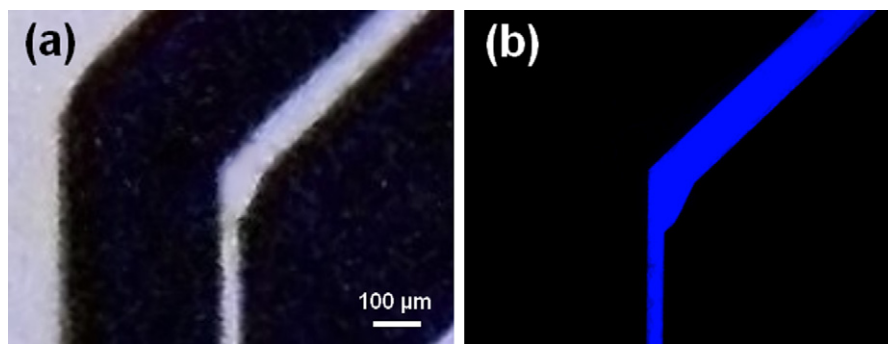


Fig. 4. The microchannel observed with fluorescence microscopy before (a) and after (b) the addition of the substrate BA-AMC. In blue, the fluorescent product (AMC) of the enzyme reaction. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

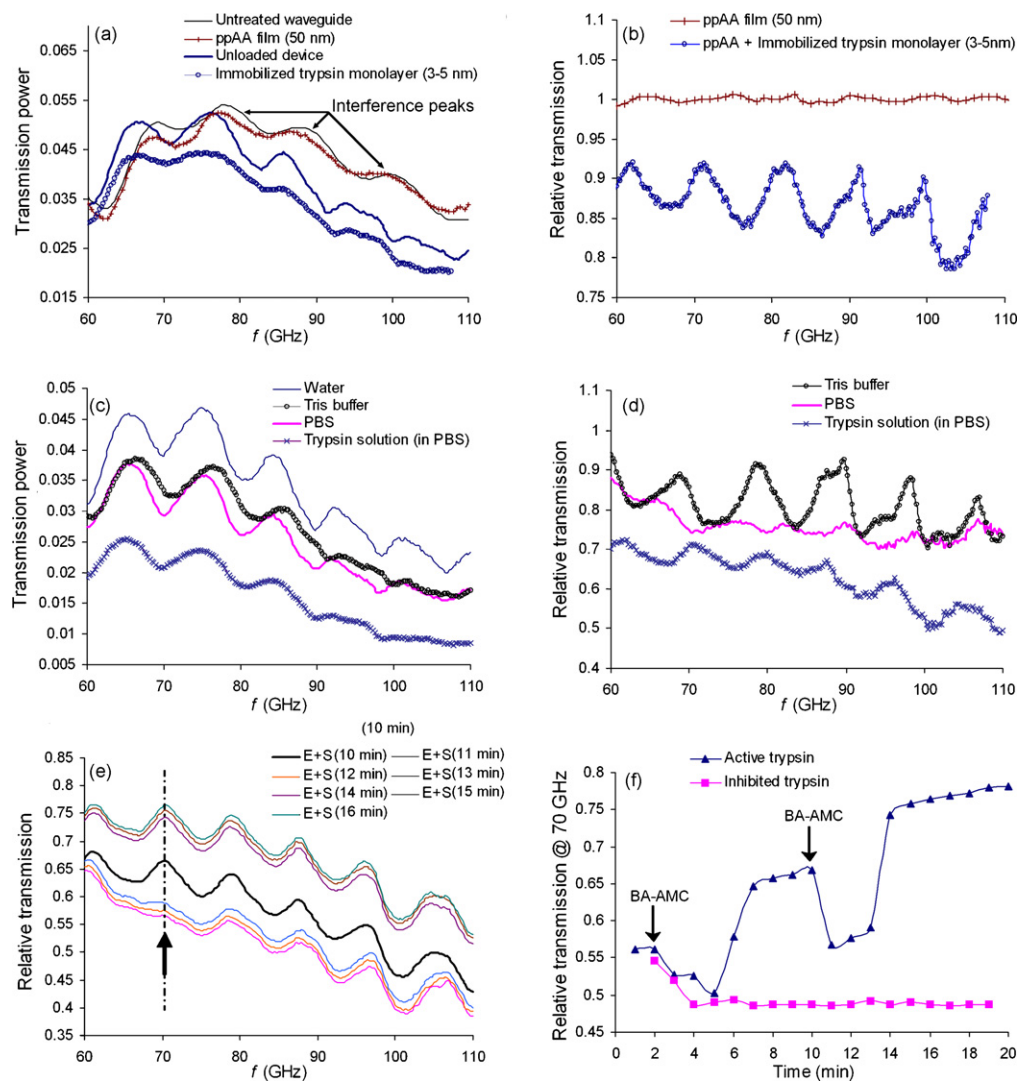


Fig. 5. Sub-THz transmission data. (a) Raw data for the transmission of the waveguide prior and after ppAA deposition, and the transmission of the BioMEMS before and after trypsin immobilization. (b) Normalized spectra for ppAA and trypsin monolayer using the untreated waveguide and the unloaded device respectively. (c) Raw spectra for different aqueous media. The normalized data (d) were realized in respect to deionized water (for buffers) and Tris buffer (for trypsin solution). (e and f) Relative transmissions after BA-AMC addition. For simplification purposes, two consecutive BA-AMC injections were represented in graphic (f) while graphic (e) represents only the second injection.

3.3.1. Sub-THz analysis of the immobilization steps

In a first demonstration, the THz BioMEMS was used to detect the effects of the functionalization process on the THz transmission features. Fig. 5a and b shows that 50 nm ppAA films present a structureless and flat transmission spectrum with no effect on the transmission power ($T_R \approx 1$). This unexpected result reveals

that ppAA film is a highly transparent material with a very low reflection and low absorption in the spectral range of interest. Several factors contribute to explain this result, including the pin-hole free structure of the polymer as indicated by AFM and a high crosslinking degree with important amount of CH_x species (Yang et al., 2006). Such a feature opens up new applications for

ppAA. In fact, unlike other THz transparent materials (polyethylene, polypropylene, polytetrafluoro-ethylene), ppAA exhibits good biocompatibility and amine functions that can be used for biomolecule immobilization or cell culture, enabling thus a real time THz monitoring of biochemical reactions.

In contrast, even at few nanometers thickness, the immobilized trypsin monolayer affects significantly the transmission, either by decreasing the amplitude or by shifting the interference peaks. Biological macromolecules present absorption due to low-frequency molecular internal motions involving primarily the internal hydrogen bonds (Globus et al., 2003). Hydrogen (H) bonds are the key factor in the THz spectroscopy of protein structure and interactions. This is explained by their involvement in water structure and dynamics, and their crucial role in the secondary and tertiary structure of biomolecules.

3.3.2. Sub-THz analysis of aqueous media

Water is a strong dielectric molecule with a high specific dipole moment ($\mu/M = 1.8/18 = 0.1D/Da$). When water-based solutions are analyzed in the THz regime, water molecules represent the most important contributor to the sample absorbance. The presence of biological material seems to decrease the transmission intensity and affect the interference peaks. Three important changes could be observed in Fig. 5b–d: (i) the amplitude can decrease or increase, (ii) peaks shape could broaden, shrink or simply deform, and (iii) the shift in peak frequency vary from 0 to 2 GHz (see peaks at around 70 and 98 GHz).

Changes described above are caused by a phase shift of the signal waveform. This shift is explained by a variation in the dielectric permittivity of the sample, including a change in both the refractive index and absorption within the medium. Furthermore, it is clearly seen in Fig. 5c and d that Tris buffer has more effects on transmission than PBS. This is likely due to orientational relaxations rising from the dipole moments of Tris and HCl molecules, while PBS exhibits no dipolar structures. Additionally, Tris buffer concentration is much higher than that of PBS, which represents a contributing factor to the observed changes. The lower transmission is observed for trypsin solution. Despite their low specific dipole moment ($\mu/M = 322/23\,364 = 0.014D/D$), trypsin molecules are more absorbent than salts due mainly to the structural and vibrational features described previously and the behavior of water molecules inside and around proteins. Three kinds of water molecules are distinguished: the bulk water, water at the protein periphery forming one or more hydration shells and internal water which fills the protein cavities. The H-bond rearrangement dynamics for water molecules in the first hydration shell is found to be slower than that in the bulk (Bandyopadhyay et al., 2005). An increase of the THz absorption of water in the hydration layer is already reported (Heugen et al., 2006). This could explain in part the decreased transmission after trypsin addition to the medium.

3.3.3. TeraHertz detection of the enzyme reaction

In addition to the effects of the biomolecule structure, enzyme biocatalysis reaction involves additional phenomena that are expected to have influence on the signal transmission in our spectral range. First, when a biomolecule (e.g. enzyme) interacts with other molecules (e.g. substrates), water molecules of the hydration shell must be pushed away from the surface of the two reacting molecules. This movement is associated with a breaking and formation of hydrogen bonds (Saenger, 1987). Secondly, the enzyme conformation changes after the substrate has fit into the binding or active site. This molecular rearrangement gives rise to protein side-chain vibrations. Finally, trypsin is a proteolytic enzyme that degrades the substrate BA-AMC into small molecules. Water molecules are consumed during this process and products with different absorption behavior are formed.

To evaluate the feasibility of enzyme reaction monitoring by THz analysis, 1 mM BA-AMC substrate was injected into the BioMEMS while recording the transmission changes of the THz sensor. As a control, the same experiment was repeated with the same device after irreversible inhibition of the immobilized enzymes. The raw data of the transmission analysis can be seen in Fig. 5e. To highlight the transmission changes, the results were plotted as a function of time at the frequency 70 GHz. As illustrated in Fig. 5f, BA-AMC addition into the functionalized microchannel induces a three stages response. It begins by a rapid and brief decrease in transmission, which could be explained by the same reasons than that of trypsin effect. Then T_R remains constant for around 2 min which is presumably the time needed for the substrate to diffuse until the immobilized enzymes. The transmission increases then linearly by approximately 30% before reaching a plateau after 1–2 min. This change corresponds to an enhancement in the transparency of the medium to millimeter-waves. In contrast, any increase is not observed after enzyme inhibition, supposing that the observed linear increase is associated with the hydrolysis reaction of the enzyme activity. The stabilization in a plateau following the transmission enhancement could be related to enzyme saturation with the substrate, reaching a maximum reaction rate. Such a behavior is generally observed in traditional Michaelis–Menten curve related to enzyme kinetics. Additionally, it is interesting to note that the peak at around 70 GHz disappears after BA-AMC addition, and reappears at the plateau stage (Fig. 5e), which supposes that this frequency is particularly sensitive to the change in medium content. To the best of our knowledge, this is the first time that sub-THz frequencies are used to detect enzymatic reactions in aqueous media. This would help to fill the lack of works and data on this topic. Moreover, the bio-functionalized THz BioMEMS could represent an interesting tool to monitor biointeractions at very small volumes, thus approaching the real values of the enzyme kinetic parameters.

4. Conclusion

Combining the cold plasma technique with microfabrication technology opens up new possibilities for the fabrication and application of biological microdevices. In this work, traditional lithographic and etching processes were used to fabricate the microfluidic and electronic components of a THz BioMEMS. Then, we successfully used glow discharge plasma polymerization of allylamine to introduce reactive amine functions onto the microdevice surface within few minutes. This dry method circumvents the usual problems that pertain to solution-based functionalization. FT-IR analysis clearly showed that deposited ppAA film exhibits a sufficient thermal stability to withstand the processing temperatures, while AFM and fluorescence microscopy observations confirmed the good surface coverage and efficiency of the immobilized enzyme monolayer.

Transmission experiments (60–110 GHz) reveal that our BioMEMS can be used to characterize biological materials in the form of solid thin films, as well as aqueous solution. Experimental results indicate that ppAA is a transparent material in the sub-THz range, which makes it as the suitable support for THz investigations of immobilized biomolecules. Preliminary measurements of the enzyme reaction were also conducted. A significant and specific effect has been observed on the signal transmission, indicating that our device could be an interesting tool for real time biocatalytic studies at the microscale. Additionally, it brings the advantages of small sample volume (~1 nL), non-invasive and free-labeling analysis. However, more investigations are yet needed for accurate assignments of the different spectral features, and overall for better understanding of biological materials/radiation interactions.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the following agencies for funding: Agence Nationale de la Recherche under grant ANR-05-NT05-2_46562, ANR-05-NANO-015-01 and Lille1 University through the Interdisciplinary Research Program (PPF BioMEMS 2006, no. 1803).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bios.2009.06.029](https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.06.029).

References

- Abbas, A., Supiot, P., Mille, V., Guillochon, D., Bocquet, B., 2009. *J. Micromech. Microeng.* 19, 045022.
- Abbas, A., Vivien, C., Bocquet, B., Guillochon, D., Supiot, P., in press-a. *Plasma Processes Polym.*
- Abbas, A., Vercaigne-Marko, D., Supiot, P., Bocquet, B., Vivien, C., Guillochon, D., in press-b. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, [doi:10.1016/j.colsurfb.2009.06.007](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.06.007).
- Bandyopadhyay, S., Chakraborty, S., Bagchi, B., 2005. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 16660–16667.
- Bykhovskaia, M., Belmont, B., Globus, T., Woolard, D.L., Samuels, A.C., Duong, T.H., Zakrzewska, K., 2001. *Theor. Chem. Acc.* 106, 22–27.
- Choi, M.K., Taylor, K., Bettermann, A., van derWeide, D.W., 2002. *Phys. Med. Biol.* 47, 3777–3787.
- Facer, G.R., Notterman, D.A., Sohn, L.L., 2001. *Appl. Phys. Lett.* 78, 996–998.
- Globus, T., Woolard, D., Crowe, T.W., Khromova, T., Belmont, B., Hesler, J., 2006. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 39, 3405–3413.
- Globus, T.R., Woolard, D.L., Khromova, T., Crowe, T.W., Bykhovskaia, M., Belmont, B.L., Hesler, J., Samuels, A.C., 2003. *J. Biol. Phys.* 29, 89–100.
- Hefti, J., Pan, A., Kumar, A., 1999. *Appl. Phys. Lett.* 75, 1802–1804.
- Heugen, U., Schwaab, G., Brundermann, E., Heyden, M., Yu, X., Leitner, D.M., Havenith, M., 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12301–12306.
- Hiratsuka, A., Muguruma, H., Lee, K.-H., Karube, I., 2004. *Biosens. Bioelectron.* 19, 1667–1672.
- Hook, A.L., Thissen, H., Voelcker, N.H., 2006. *Trends Biotechnol.* 24, 471–477.
- Krishnamurthy, V., Kamel, I.L., Wei, Y., 1989. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 27, 1211–1224.
- Lawrence, A.F., McDaniel, J.C., Chang, D.B., Birge, R.R., 1987. *Biophys. J.* 5, 785–793.
- Lima, R.R., Hernandez, L.F., Fachini, E., Demarquette, N.R., Silva, M.L.P., 2008. *Sens. Actuators B* 130, 110–119.
- Liu, B., Yang, Y.-H., Wu, Z.-Y., Wang, H., Shen, G.-L., Yu, R.-Q., 2005. *Sens. Actuators B: Chem.* 104, 186–190.
- Markelz, A.G., Roitberg, A., Heilweil, E.J., 2000. *Chem. Phys. Lett.* 320, 42–48.
- Muguruma, H., Nagata, R., Nakamura, R., Sato, K., Uchiyama, S., Karube, I., 2000. *Anal. Sci.* 16, 347–348.
- Muguruma, H., Shibayama, Y., Matsui, Y., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 827–832.
- Nagel, M., Bolivar, P.H., Brucherseifer, M., Kurz, H., Bosserhoff, A., Buttner, R., 2002. *Appl. Opt.* 41, 2074–2078.
- Nagel, M., Först, M., Kurz, H., 2006. *J. Phys.: Condens. Matter* 18, S601–S618.
- Saenger, W., 1987. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16, 93–114.
- Treizebré, A., Akalin, T., Bocquet, B., 2005. *IEEE Microw. Compon. Lett.* 15, 886–888.
- Treizebré, A., Bocquet, B., 2008. *Int. J. Nanotechnol.* 5 (6/7/8), 784–795.
- Treizebré, A., Bocquet, B., Xu, Y., Bosisio, R.G., 2008b. *Microw. Opt. Technol. Lett.* 50, 2998–3001.
- Van Zandt, L.L., Saxena, V.K., 1989. *Phys. Rev. A* 39, 2672–2674.
- Walter, J., Steigemann, W., Singh, T.P., Bartunik, H., Bode, W., Huber, R., 1982. *Acta Crystallogr. B* 38, 1462–1472.
- Yang, J., Lee, S., Park, H., Jung, D., Chae, H., 2006. *J. Vac. Sci. Technol. A* 24, 165–169.
- Yuichi, K., Tetsuo, T., Hitoshi, N., Terutoshi, T., Shumpei, S., 1977. *Chem. Pharm. Bull.* 25, 3126–31283.

N.B: "Table S1" et "Fig. S1" peuvent être retrouvés dans les annexes 4 et 5 de cette thèse.

5.2 Perspectives de la spectroscopie THz comme outil analytique en biologie

Nous allons traiter cette partie en termes de difficultés rencontrées actuellement par la spectroscopie THz comme méthode analytique, et les solutions envisagées ou en cours de développement par les équipes de recherche.

5.2.1 Le besoin de sensibilité

Le premier obstacle technique est la grande absorbance des THz par les milieux aqueux. Afin d'étudier les systèmes vivants dans leur milieu naturel, il est nécessaire de réduire l'influence de l'eau et donc le volume d'eau dans le milieu. L'approche qui se développe de plus en plus ces cinq dernières années et qui a fait l'objet de la première partie de ce chapitre est celle des microsystèmes microfluidiques. Cette technologie se base essentiellement sur la miniaturisation des circuits de contrôle des fluides, mais aussi des systèmes de propagation des radiations THz [1-5]. Ces bio-microsystèmes THz seront de plus en plus adoptés, améliorés et intégrés à d'autres types de miniaturisations que nous allons voir ci-dessous.

5.2.2 Le besoin de portabilité

De nos jours, plusieurs types de spectromètres THz sont disponibles dans le commerce [6-8], si bien qu'il ne faudrait presque plus parler de «gap» THz. Cependant, ces systèmes nécessitent une adaptation pour les analyses en solution et principalement pour l'analyse directe sur des BioMEMS. La taille et la complexité de certains systèmes représentent également un inconvénient pour leur portabilité et leur usage courant. A partir de ce constat, certaines équipes de recherche commencent à s'orienter vers la miniaturisation des sources et des détecteurs THz pour obtenir des dispositifs que nous pouvons appeler «Spectromètre sur puce» (*spectrometer on a chip*) [9, 10]. Cette technologie va permettre à l'avenir d'intégrer les sources, les détecteurs et le BioMEMS sur un même support portatif et compact (Figure 40).

Une autre technologie en cours de développement s'inspire du principe de fonctionnement des caméras THz. Elle consiste à miniaturiser les détecteurs et les intégrer sur une puce pour détecter les radiations THz émises par les objets (Figure 41). Cette méthode présente

l'avantage de ne pas nécessiter une source artificielle de radiation en utilisant les radiations THz émises naturellement par presque tous les objets [10, 11].

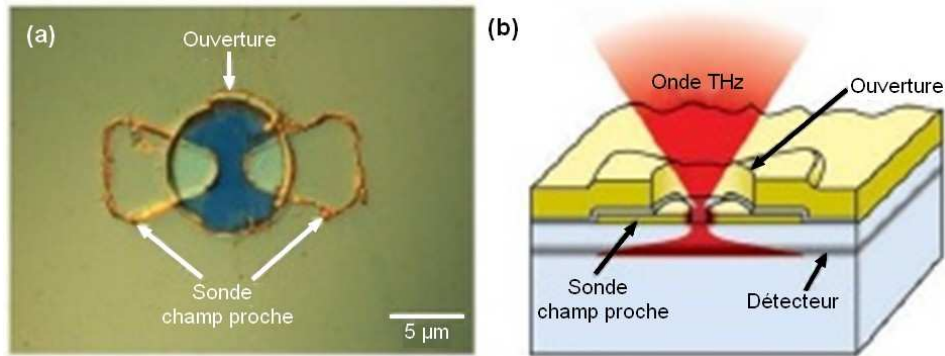


Figure 40. Détecteur THz sur puce. (a) Photographie du détecteur composé d'une ouverture, une couche jouant le rôle d'une sonde et un film mince jouant le rôle de détecteur. (b) Schéma de la propagation du champ électromagnétique à travers le dispositif [9].

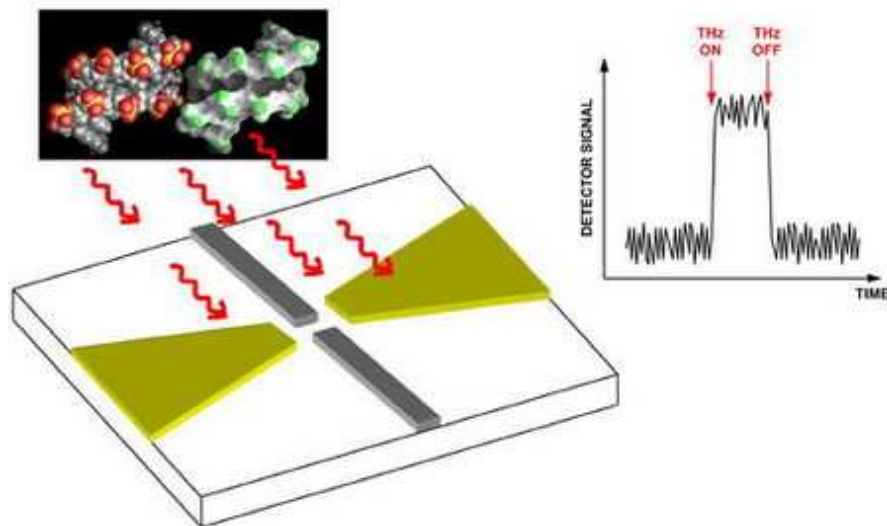


Figure 41. Schéma d'un nanodétecteur THz. Les parties grise et verte sont composées de nanofils capables de détecter les radiations THz émises par un objet cible [10].

5.2.3 Le besoin de modèles théoriques

La disponibilité des spectromètres THz et l'intégration sophistiquée des BioMEMS permettent aujourd'hui d'obtenir des spectres de plus en plus précis, et sur une plus large gamme de fréquences. Cependant, l'une des difficultés les plus sérieuses qui restent à résoudre est l'interprétation détaillée de ces spectres pour remonter aux multiples informations que peuvent sonder les teraHertz (conformation des biomolécules, couches d'hydratation, forces et structure des liaisons hydrogène intramoléculaires, phénomènes membranaires) [5, 12, 13]. En effet, les modèles théoriques actuels semblent incapables d'attribuer d'une manière précise les différents aspects des spectres THz aux différents phénomènes mis en jeu [13].

Dans ce cadre, le BioMEMS THz développé et dont la faisabilité a été testé au cours de cette thèse devrait servir à accumuler les mesures expérimentales afin de permettre l'investigation de deux points essentiels :

- ✓ La comparaison des mesures effectuées, notamment sur les réactions enzymatiques avec des résultats obtenus par d'autres méthodes classiques (ex. spectrofluorométrie, nanocalorimétrie). Ceci doit permettre d'observer d'éventuelles corrélations entre les différentes méthodes et de remonter ainsi aux paramètres du phénomène observé.
- ✓ Comparaison des résultats expérimentaux avec des modélisations de dynamique moléculaire (ex. CHARMM), ce qui permettra d'améliorer notre compréhension des interactions des radiations THz avec les molécules et les matériaux. Dans le domaine THz, les molécules présentent des mouvements collectifs impliquant des centaines d'atomes sur une échelle de temps allant du sub-picoseconde à la nanoseconde (Figure 42). Il faudrait donc des simulations sur des cellules très larges (1000 molécules ou plus) et sur une échelle de temps plus grande (100 ps). Actuellement, les études de dynamique moléculaire sont limitées par le nombre de molécules qui peuvent être analysées et la durée pendant laquelle leurs dynamiques peuvent être suivies [14]. De nouveaux développements informatiques devraient permettre d'atteindre l'objectif désiré.

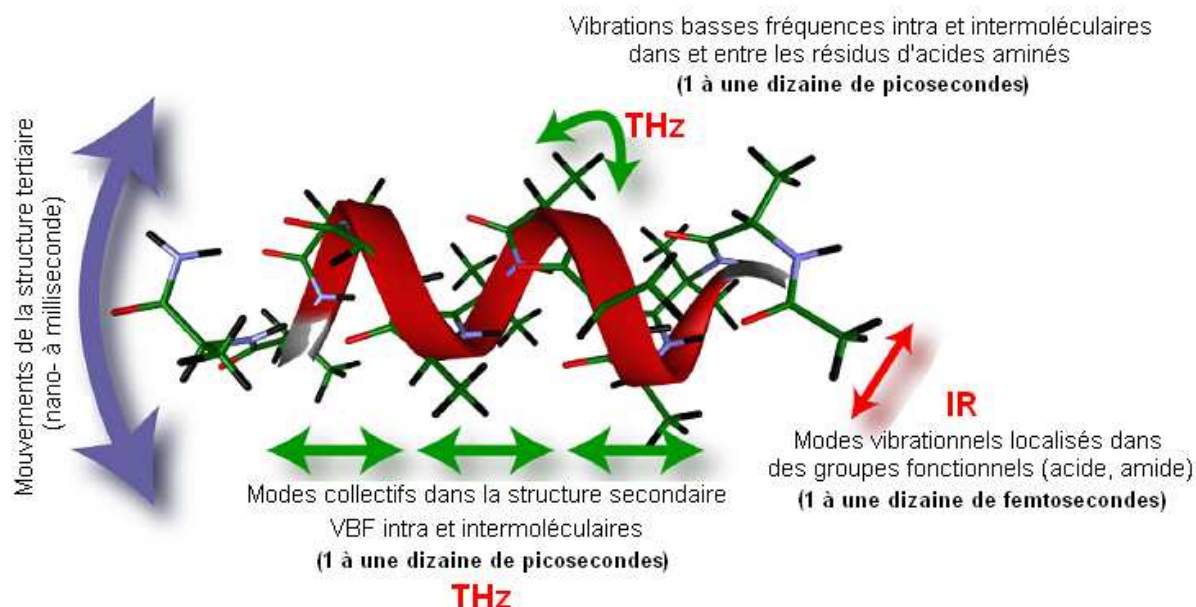


Figure 42. Schéma représentant les modes variés de la dynamique moléculaire et leurs échelles de temps dans une biomolécule [14] (modifié).

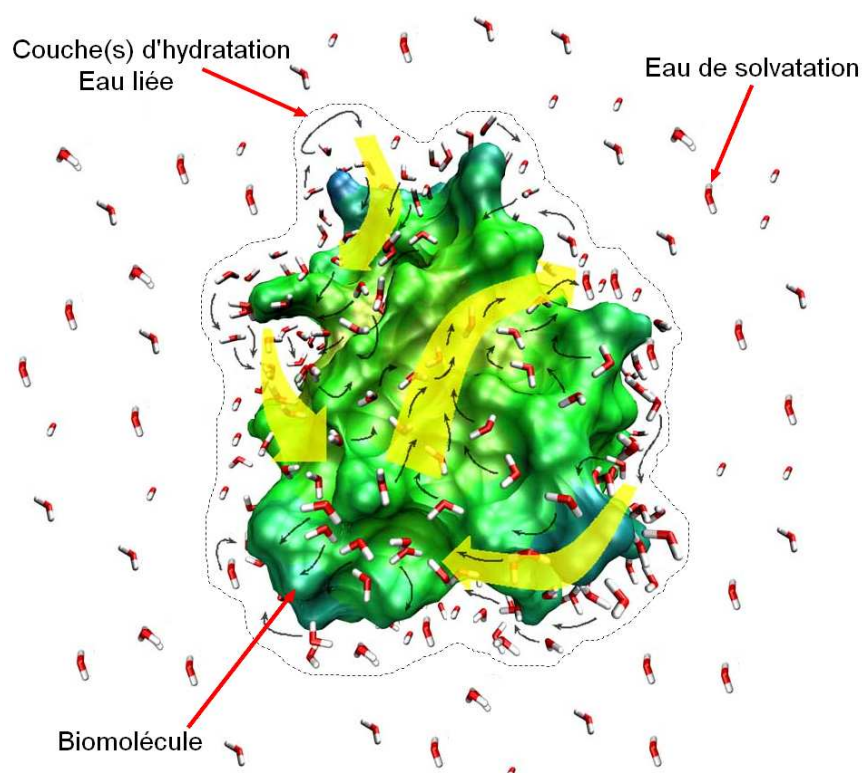


Figure 43. Couche(s) d'hydratation d'une biomolécule en milieu aqueux. Les flèches noires représentent la dynamique des molécules d'eau et des liaisons hydrogène de l'une des couches [21] (modifiée).

L'une des voies les plus prometteuses dans l'analyse THz en biologie est l'étude des couches d'hydratation (Figure 43) [15-20], principalement l'eau de structure qui est une eau fortement liée aux protéines et qui participe à leurs conformations. L'enthalpie de sorption de cette eau est de 4 à 6 kJ.mole⁻¹, ce qui correspond à l'échelle d'énergie des THz (0,04-4 kJ.mole⁻¹). Le plus intéressant est que le nombre de molécules de cette couche d'eau et le réseau dynamique qu'elles forment est absolument spécifique à chaque biomolécule, à chaque conformation moléculaire et est même sensible à une mutation au sein de la biomolécule [21, 22], ce qui théoriquement rend possible une détection spécifique sans équivalent. Une telle technique serait applicable à tout objet biologique en solution car elle n'est pas basée sur la reconnaissance d'un élément donné d'une protéine mais sur la détection de l'enveloppe dans laquelle se trouve cette protéine.

Références

- [1] Laman N., Sree Harsha S., Grischkowsky D., Melinger J. S., “High-Resolution Waveguide THz Spectroscopy of Biological Molecules”, *Biophys. J.*, **94**, 2008 1010-1020.
- [2] George P. A., Hui W., Rana F., Hawkins B. G., Smith A. E., Kirby B. J., “Microfluidic devices for terahertz spectroscopy of biomolecules”, *Optics Express*, **16**, 2008, 1577-1582.
- [3] Treizebré, A., Bocquet, B., “Nanometric metal wire as a guide for THz investigation of living cells”, *Int. J. Nanotechnol.*, **5**, 2008, 784-795.
- [4] Yoneyama H., Yamashita M., Kasai S., Kawase K., Ito H., Ouchi T., “Membrane device for holding biomolecule samples for terahertz spectroscopy”, *Optics communications*, **281**, 2008, 1909-1913.
- [5] Nagel M., Först M., Kurz H., “THz biosensing devices: fundamentals and technology”, *J. Phys.: Condens. Matter*, **18**, 2006, S601-S618.
- [6] TeraView, <http://www.teraview.com/>
- [7] Microtech Instruments, www.mtinstruments.com/
- [8] T-Ray Science Inc., www.t-rayscience.com/
- [9] Kawano Y., Ishibashi K., “An on-chip near-field terahertz probe and detector”, *Nature*, **2**, 2008, 618-621.
- [10] Song J. W., Kabir N. A., Kawano Y., Ishibashi K., Aizin G. R., Mourokh L., Reno J. L., Markelz A. G., Bird J. P., “Terahertz response of quantum point contacts”, *Appl. Phys. Lett.*, **92**, 2008, 223115.
- [11] Groma G. I., Hebling J., Kozma I. Z., Varo G., Hauer J., Kuhl J., Riedle E., “Terahertz radiation from bacteriorhodopsin reveals correlated primary electron and proton transfer processes”, *PNAS*, **105**, 2008, 6888-6893.
- [12] Arikawa T., Nagai M., Tanaka K., “Characterizing hydration state in solution using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy”, *Chem. Phys. Lett.*, **457**, 2008, 12-17.

- [13] Plusquellic D. F., Siegrist K., Heilweil E. J., Esenturk O., “Applications of Terahertz Spectroscopy in Biosystems”, *ChemPhysChem*, **8**, 2007, 2412-2431.
- [14] “Opportunities in THz Science”, Editeurs: Sherwin M. S., Schmuttenmaer C. A., Bucksbaum Arlington P. H., Rapport de *DOE-NSF-NIH Workshop*, Février 2004, 124 pages.
- [15] Kitagawa J., Ohkubo T., Onuma M., Kadoya Y., “THz spectroscopic characterization of biomolecule/water systems by compact sensor chips”, *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 2006, 041114.
- [16] Xu J., Plaxco K. W., Allen S. J., “Probing the collective vibrational dynamics of a protein in liquid water by terahertz absorption spectroscopy”, *Protein Sci.* **15**, 2006, 1175-1181.
- [17] Heugen U., Schwaab G., Bründermann E., Heyden M., Yu X., Leitner D. M., Havenith M., “Solute-induced retardation of water dynamics probed directly by terahertz spectroscopy”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 2006, 12301-12306.
- [18] Ebbinghaus S., Kim S. J., Heyden M., Yu X., Heugen U., Gruebele M., Leitner D. M., Havenith M., “An extended dynamical hydration shell around proteins”, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **104**, 2007, 20749-20752.
- [19] Leitner D. M., Gruebele M., Havenith M., “Solvation dynamics of biomolecules: modeling and terahertz experiments”, *HFSP J.*, **2**, 2008, 314-323.
- [20] Sinha S. K. , Chakraborty S. , Bandyopadhyay S. , “Thickness of the Hydration Layer of a Protein from Molecular Dynamics Simulation”, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 2008, 8203-8209.
- [21] Born B., Havenith M., “Terahertz Dance of Proteins and Sugars with Water”, *J Infrared Milli. Terahz Waves*, in press, doi: 10.1007/s10762-009-9514-6.
- [22] Ebbinghaus S., Kim S. J., Heyden M., Yu X., Gruebele M., Leitner D. M., Havenith M., “Protein Sequence- and pH-Dependent Hydration Probed by Terahertz Spectroscopy”, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 2008, 2374–2375.

Chapitre 6

*Nouvelles perspectives en microfabrication et
fonctionnalisation de BioMEMS par plasma froid*

Chapitre 6

Nouvelles perspectives en microfabrication et fonctionnalisation de BioMEMS par plasma froid

Ce dernier chapitre est composé de deux sections: la première met l'accent sur les perspectives des applications des plasmas non thermiques en bio-microtechnologie ainsi que sur l'évolution future de ce type de procédés. La seconde section se présente sous la forme d'un article publié, décrivant l'utilisation de la polymérisation plasma comme un outil de microfabrication tridimensionnelle.

6.1 Applications du plasma froid en bio-microtechnologies

L'industrie microélectronique est plus généralement microtechnologique est basée en grande partie sur des plasmas à température de gaz relativement élevée (>300 °C). Les procédés de microfabrication contiennent souvent une ou plusieurs étapes de gravure ou de dépôt par plasma [1-3]. La gravure plasma (dite sèche) est réalisée grâce à des ions accélérés à des énergies de 50 à 1000 eV. Les exemples les plus courants sont les procédés RIE (*reactive ion etching*), ICP (*inductive coupled plasma*) et l'usinage ionique. Les dépôts par plasma peuvent se faire selon différentes approches incluant l'épitaxie par jets moléculaires (MBE ; *molecular beam epitaxy*), l'épitaxie en phase liquide (LPE; *liquid phase epitaxy*), le dépôt chimique en phase vapeur (CVD; *chemical vapor deposition*), et le dépôt par pulvérisation cathodique ou magnétron. En plus de ces procédés automatisés, la fabrication de bioMEMS nécessite d'autres étapes pour la micro-structuration, le collage et la fonctionnalisation de surface. Autant d'étapes qui restent en grande partie manuelles et requièrent le plus souvent l'usage de solvants organiques et halogéniques.

Au cours de cette dernière décennie, les plasmas froids à température ambiante, particulièrement la polymérisation plasma ont rejoint les procédés de fabrication en salle blanche pour apporter de nouvelles alternatives à travers un procédé sec, rapide et facilement

maîtrisable [4]. La polymérisation plasma est actuellement utilisée pour déposer des films minces ou des polymères organiques, organométalliques ou organosiliciés à des fins très variées. Les films peuvent assurer une fonction de support pour des circuits électriques ou électromagnétiques [5, 6], de collage [7] ou de protection [8, 9]. D'autres applications plus élaborées sont également rapportées, telles que la fonctionnalisation chimique de surface discutée au chapitres 2 et 3 [10, 11], et l'usage des films polymères comme élément de détection. Cette dernière application est l'une des plus récentes et se base sur les différentes capacités de ces films: sensibilité spécifique [12], caractéristique redox ou réactivité électronique ou électromagnétique [13].

En perspective pour la décennie prochaine, nous estimons que l'évolution des applications du plasma froid en biomicrotechnologie va se faire sur trois axes importants et très dépendants :

- ✓ Le développement de nouvelles applications: le besoin de production à l'échelle industrielle pousse la recherche à trouver des moyens d'intégrer toutes les étapes de microfabrication dans un procédé automatisé avec le minimum d'intervention humaine. Après le traitement de surface et le dépôt de polymères par plasma, d'autres étapes commencent à intégrer les procédés plasma. L'une des deux applications les plus récentes concerne le dépôt d'entités biologiques (protéines, ADN) directement par plasma sur des surfaces préalablement activées [14, 15]. La première start-up technologique vient d'ailleurs d'être créée dans ce domaine [16]. La seconde application est la microfabrication de circuits microfluidiques par un dépôt plasma sur une surface micro-structurée. Ce dernier développement fera l'objet de la section suivante de ce chapitre.
- ✓ Le basculement vers les plasmas atmosphériques: le plus grand handicap de l'application des plasmas en industrie des BioMEMS est le travail sous vide. Ce dernier augmente le temps de fabrication, les coûts, et empêche un traitement de surfaces en chaine. Cette situation est en voie de changement grâce à l'orientation de plusieurs équipes de recherche vers les plasmas atmosphériques [17, 18, 19]. Cette orientation a commencé à partir des années 90, mais s'est accentuée à partir de l'année 2004 (Figure 44). A l'avenir, les plasmas sous vide ne seraient utilisés que lorsque les plasmas à pression atmosphérique s'avèrent incapable de réaliser les mêmes

performances. Plusieurs réalisations avec ce type de plasma sont déjà rapportées. Elles concernent généralement la microstructuration et le traitement de surface par polymérisation [20, 21, 22].

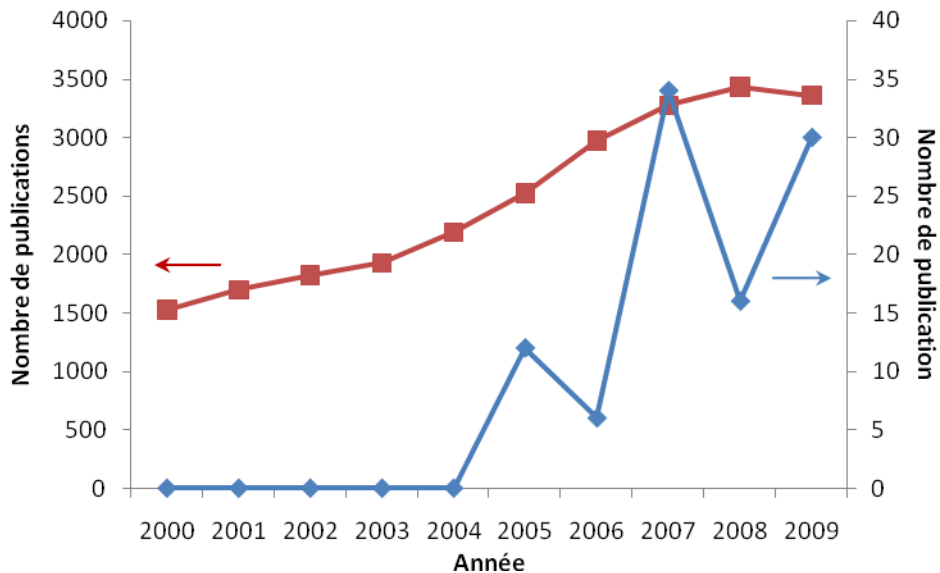


Figure 44. Evolution du nombre de publications scientifiques concernant les plasmas atmosphériques depuis l'année 2000. La recherche a été réalisée séparément sur la banque de données *Science Direct* (axe de gauche) et sur le journal *Plasma Processes and Polymers* (axe de droite), pour tous les articles dont le titre contient les mots «*atmospheric*» AND «*plasma*».

- ✓ L'exploration et la maîtrise des microplasmas: les microplasmas représentent le cas typique du mariage des microtechnologies avec la technologie des plasmas [23, 24]. Le procédé consiste à créer des plasmas dans des micro-environnements (microcanaux, microcavités) pour un objectif de gravure, de fonctionnalisation par polymérisation ou d'analyse chimique [25, 26, 27]. En termes anecdotiques, au lieu de mettre un bioMEMS dans un réacteur plasma pour un éventuel traitement, c'est le réacteur plasma miniaturisé qui serait intégré dans le BioMEMS. Le processus d'intégration des fonctions semble être sans limites!

6.2 Polymérisation plasma: un nouvel outil de microfabrication

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé la polymérisation plasma pour l'aminofonctionnalisation de la surface des BioMEMS. Ces derniers ont été cependant fabriqués par les procédés classiques disponibles en salle blanche (dépôt de résine par tournette «*spin coating*», photolithographie, gravure humide ou sèche, collage des différents substrats). Dans l'objectif de réaliser le maximum d'étapes avec les procédés plasma et éviter l'étape de collage très onéreuse, nous avons développé une nouvelle méthode de fabrication des systèmes microfluidiques appelée PPSL (*plasma polymerization on sacrificial layer*) ou PPMS (*plasma polymerization on micropatterned surfaces*). Cette méthode consiste à réaliser des microcanaux par une polymérisation plasma d'un monomère organosilicié directement sur une surface micro-structurée (par dépôt de couche sacrificielle ou par simple gravure).

La description détaillée de cette technique, de ses avantages et de ses limites sont présentés ci-dessous sous la forme d'un article publié dans la revue internationale à comité de lecture *Journal of Micromechanics and Microengineering*. L'article est intitulé: «Fabrication de microcanaux capillaires par polymérisation plasma de TMDS pour des applications en MEMS microfluidiques».

Capillary microchannel fabrication using plasma polymerized TMDS for fluidic MEMS technology

A Abbas^{1,2,3}, P Supiot², V Mille¹, D Guillochon³ and B Bocquet¹

¹ Institute of Electronics, Microelectronics and Nanotechnology (UMR CNRS 8520), University of Lille1, France

² Laboratory of Process Engineering of Reactive Fluids–Materials Interactions (EA 3571), University of Lille1, France

³ Laboratory of Biological Processes, Enzymatic and Microbial Engineering (EA 1026), University of Lille1, France

E-mail: bertrand.bocquet@univ-lille1.fr

Received 8 October 2008, in final form 28 November 2008

Published 20 March 2009

Online at stacks.iop.org/JMM/19/045022

Abstract

This paper reports the first use of cold plasma deposition of polymerizable monomers for the fast, cost-effective and easy fabrication of buried air microchannels. A new method named ‘plasma polymerization on sacrificial layer’ (PPSL) is presented. It consists in the direct polymerization of tetramethyldisiloxane (TMDS) on a photopatterned sacrificial layer. Channels are formed with only one lithographic mask and without any etching or bonding process. The use of polymerized TMDS allows rapid creation of capillarity-driven flow systems with the channel width ranging from 4 to 700 μm without pillars. Channels are characterized and successfully tested. Capillary forces draw water, as well as aqueous solution into the channel from the inlet reservoir to the outlet one, avoiding the need of microfluidic connectors with the surrounding environment. Filling of the capillaries is very fast. It reaches the initial velocity of 4.4 cm s^{-1} with the geometries and water used here. In addition, PPSL easily allows the building of transparent channel networks directly on processed electrochemical or electromagnetic components. An example of one such integrated fluidic microelectromechanical system (MEMS) is described.

 This article features online multimedia enhancements

(Some figures in this article are in colour only in the electronic version)

1. Introduction

Over the last decade, the need for rapid and low-cost channel microfabrication methods has become increasingly important. Microchannels found their utility in three main topics: integrated circuit technology, through the use of air gaps in interconnect structures for the reduction of the dielectric constant [1]; the microfluidic cooling of high-density integrated circuits [2]; the investigation of fluid mechanics on the microscale [3]; and their applications in microfluidic devices including bio- and chemical MEMS, biosensors and lab-on-chip [4, 5].

Many different techniques have been reported for the fabrication of microfluidic circuits. The most prevalent are the etching techniques [6, 7], replication methods based essentially on molding [8, 9] and the sacrificial material approach [10]. The main drawbacks common to both the etching methods and polymer molding techniques are the small flexibility for different substrate materials, the need of several photolithographic masks which multiply time-consuming steps and the need of an aligning and bounding process of different fabricated layers. This step usually requires thermal or chemical treatment and can lead to wafer-to-wafer misalignments [11]. A unique technology that permits

rapid and easy fabrication of microchannels on one side of the silicon wafer is the sacrificial material approach. In this method, microchannel fabrication begins with the deposition of the sacrificial layer and patterning into the desired shape. The structural material is then deposited over the micropatterned sacrificial layer, except in a small area which will provide access to the sacrificial material. The latter is then dissolved chemically or thermally or by plasma etching, leaving a covered channel. Several materials have been used as the sacrificial layer, including photosensitive materials such as electronic photoresists [12], thermally decomposable materials such as polycarbonates [13], polyoxymethylene [14], polynorbornene [15, 16], parylene [17] and water-soluble materials such as poly(acrylic acid) and polyvinylalcohol [18].

Different sacrificial materials were widely investigated in the literature, while the number of studies exploring new methods or materials for the overcoat layer remains relatively very low. Today, the most-used technique to fabricate the overcoat material is chemical vapor deposition (CVD) of silicon dioxide (SiO_2), silicon nitride (SiN_x) [19, 20], silicon carbide (SiC) or different metals such as aluminum (Al), nickel (Ni) and titanium (Ti) [21, 22]. These materials are deposited at relatively high temperatures ($\geq 200^\circ\text{C}$). This requires the use of materials with high thermal stability and high glass transition temperatures. It also implies the use of adhesion layers. These constraints limit dramatically the number of materials that can be used. Here, we describe the realization and characterization of a simple process for buried air-microchannel fabrication. An alternative technology called plasma polymerization on sacrificial layer (PPSL) is introduced. It refers to the use of plasma polymerization to deposit the overcoat material in a process at ambient temperature.

The plasma polymerization considered here is essentially a remote plasma enhanced chemical vapor deposition (RPECVD). It consists in the conversion of organic and/or organometallic monomers into highly cross-linked polymers through partial decomposition activated by energetic plasma species. This polymerization is accompanied by a subsequent deposition of thin films on the substrate. The primary advantage of the present plasma polymerization is that it can occur at moderate temperatures compared to conventional plasma deposition methods. This allows the use of a large panel of materials as sacrificial or encapsulating layers. The benefits of plasma polymerized films arise from their high biocompatibility, good adhesion on different substrates and very interesting surface properties either for microfluidic flows or for functionalization [23, 24].

2. Experimental procedure

2.1. Microchannel fabrication

The fabrication process starts with standard photolithography, with a two-step spin-coating process (figure 1). First, the sacrificial material consisting of a positive photoresist (AZ9260, Hoechst) is spun-coated in two steps on the p-doped silicon wafer (100). The spin parameters and the

Table 1. Process conditions of the photoresist AZ9260.

Process step	Conditions
Spin coating 1 (AZ 9260)	Speed: 2000 rpm, acceleration: 5000 rpm, 40 s Stabilization: 10 min Soft-bake: 100°C , 3 min Water reabsorption: 15 min at room temperature
Spin coating 2 (AZ 9260)	Speed: 2000 rpm, acceleration: 5000 rpm, 40 s Stabilization: 10 min Soft-bake 3 min at 100°C Water reabsorption: 15 min
UV exposure	10.48 mW cm^{-2} @ 365 nm (I-line), 45 s
Development	AZ 351 b (30%), 90 s
Soft-bake	1 min at 100°C
Film thickness	$\sim 25\text{ }\mu\text{m}$

Table 2. Process parameters of the plasma polymerization of TMDS.

Base pressure	0.028 mbar
Operating pressure	5.6 mbar
Power	200 W
Plasmagenic gas	N_2 : 1.8 slpm ^a
Carrier gas	O_2 : 25 sccm ^b
Pre-treatment	Plasma N_2 duration 4 min, followed by
Pre-treatment	plasma N_2/O_2 duration 3 min
Treatment	Plasma TMDSO: 5 sccm

^a slpm: standard liter per minute.

^b sccm: standard cubic centimeter per minute.

viscosity of the polymer solution control the thickness of the deposited layer which determines the height of the air channel (table 1). The deposited photoresist is then cured to evaporate the solvent. This step is followed by UV exposure at 365 nm for a dose of 10 mJ cm^{-2} , through a high-resolution photomask featuring the microchannels. Areas not exposed to UV light are dissolved by immersion of the wafer in a basic solution, such as AZ 351B, leaving only a patterned sacrificial layer on the substrate. The microchannels were designed as 10 to $700\text{ }\mu\text{m}$ wide, 10 to $25\text{ }\mu\text{m}$ high and 3 mm long.

The following step is the deposition of the overcoat layer over the micropatterned surface. First, a plasma polymerization technology was integrated to a microelectronic fabrication process for the deposition of the encapsulating material. The wafer with desired structures was introduced into the reaction chamber of a home-built microwave (2.45 GHz) plasma reactor [25]. Then, the organosilicon monomer 1,1,3,3-tetramethyldisiloxane (TMDS) was used as the precursor to synthesize and deposit a polymer organosilicon film by a remote afterglow PECVD. The deposited polymer, so-called plasma polymerized TMDS (ppTMDS), is used as the structural material of the microchannel. Figure 2 shows the principal species composing the polymer. It was deposited at room temperature at a rate of 14 nm s^{-1} . This technique is described in more detail elsewhere [26], and the optimized conditions are summarized in table 2.

In the last step, the sacrificial layer is removed by immersion of the substrates into AZ351B developer (1:4) prepared with deionized water. The sacrificial photoresist decomposes into volatile and soluble products leaving behind

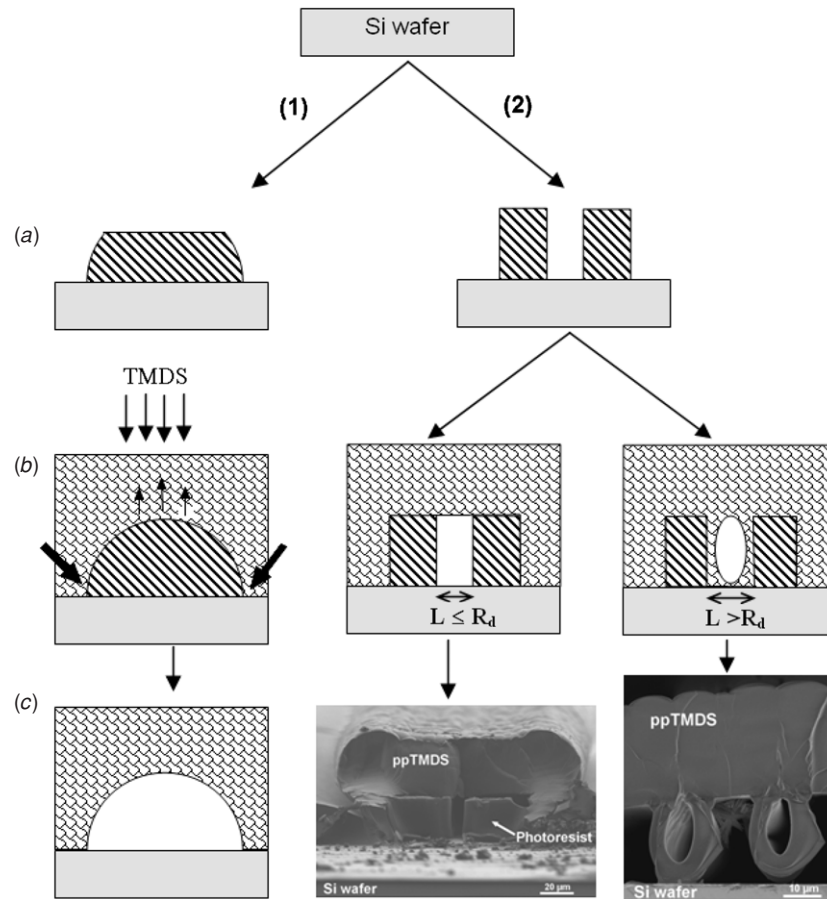


Figure 1. Principle of the PPSL process using two methods. Method 1 requires three main steps: (a) micropatterning of the sacrificial material. The mask and the dose of UV exposure determine the shape of the patterns, (b) plasma polymerization of TMDS on the sacrificial layer, inducing more constraints at the base of the pattern and (c) the decomposition of the sacrificial material leading to the release of a desired channel. Method 2 allows the fabrication of small channels without etching the sacrificial material. The distance between two patterns (L) governs the shape and the type of the microchannel obtained. Note that the SEM image (at the right) represents two hydrophobic microchannels, while the corresponding schemes show only one.

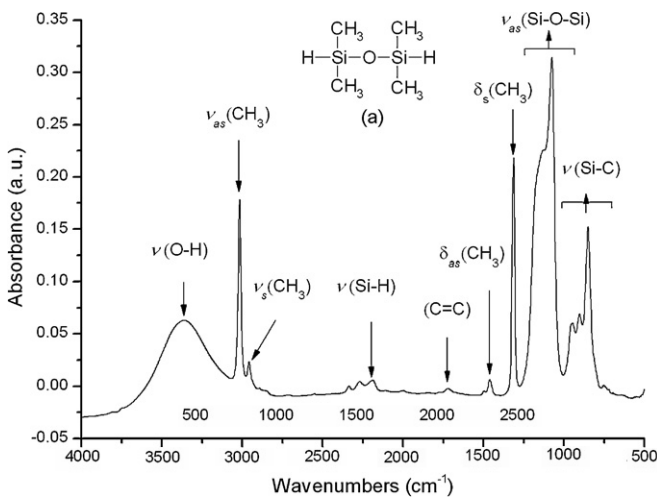


Figure 2. Infrared spectrum of plasma polymerized TMDS. (a) Semi-developed formula of the TMDS monomer.

a hollow channel. The resulting microchannels are optically transparent. Typical ppTMS channels on the Si substrate are shown in figure 3. The released structures are rinsed in

deionized water and then undergo a supercritical CO₂ drying to avoid the sticking effect caused by capillary forces.

2.2. MEMS design and fabrication

The PPSL technique was used to fabricate a biomicroelectromechanical system (BioMEMS). This fabrication aims to demonstrate the feasibility of the direct integration of microfluidic circuits onto a substrate supporting electromagnetic components, here a coplanar waveguide (CPW). The latter is used in high frequency circuits as propagation lines for dielectric and terahertz spectroscopies [27, 28]. Figure 4 shows the proposed fabrication process. The CPW fabrication requires three steps*. First, a thin layer of 200 nm chromium (Cr) was sputtered over a high resistivity (5–10 Ω cm⁻¹) Si substrate as an adhesion layer, before the deposition of a 1 μm gold layer using Plassys MP 450 S. Next, the substrate underwent standard photolithography to transfer CPW features onto the gold layer. Then, the exposed gold areas are removed by ion polishing leaving the desired waveguides. The substrate is finally cleaned by oxygen plasma treatment.

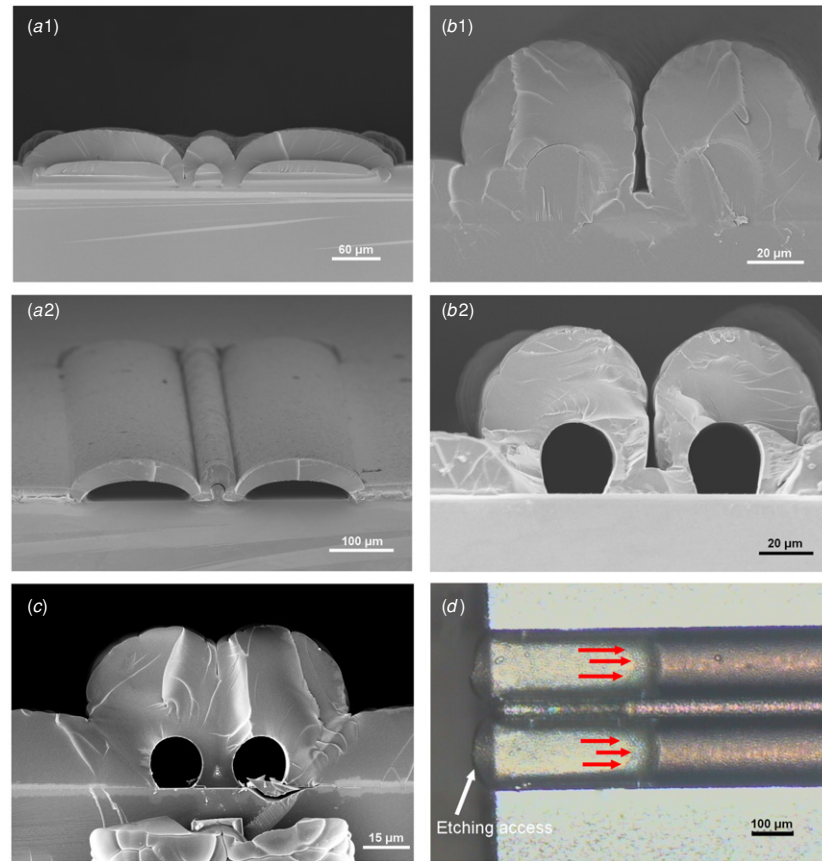


Figure 3. SEM micrographs of the cross-sectional view of microchannels resulting from the PPSL process before (*a1*, *b1*) and after (*a2*, *b2*) the etching of the sacrificial layer. (*c*) Circular-shape microchannel. (*d*) Top view optical micrograph of two parallel microchannels during sacrificial material decomposition. The gray part represents the remaining photoresist and the clear area is the released channel after 30 min of etching.

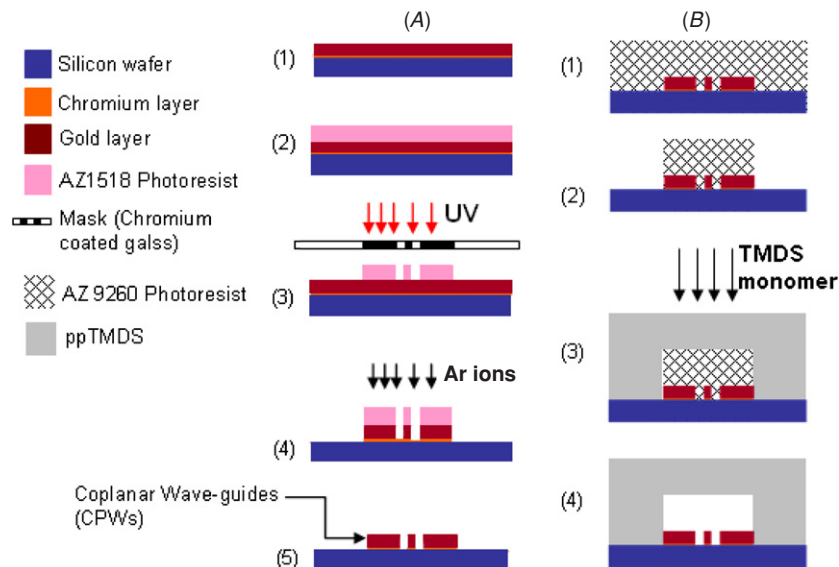


Figure 4. Schematic representation of the microfabrication process of a fluidic MEMS. (A) Photolithography of the coplanar waveguides on a silicon wafer: (1) deposition of a gold layer, (2) spin coating of the photoresist, (3) standard photolithography, (4, 5) ion polishing and oxygen plasma treatment; (B) PPSL technique: starting with surface micropatterning of a sacrificial photoresist (steps 1 and 2), followed by the direct polymerization of the TMDS monomer (step 3) and the decomposition of the sacrificial material (step 4).

The integration of the microfluidic circuits is achieved by the plasma polymerization technique discussed above. The

microchannels were designed as 130 to 700 μm wide, 25 μm deep and 3 mm long. Two channel ends were broadened

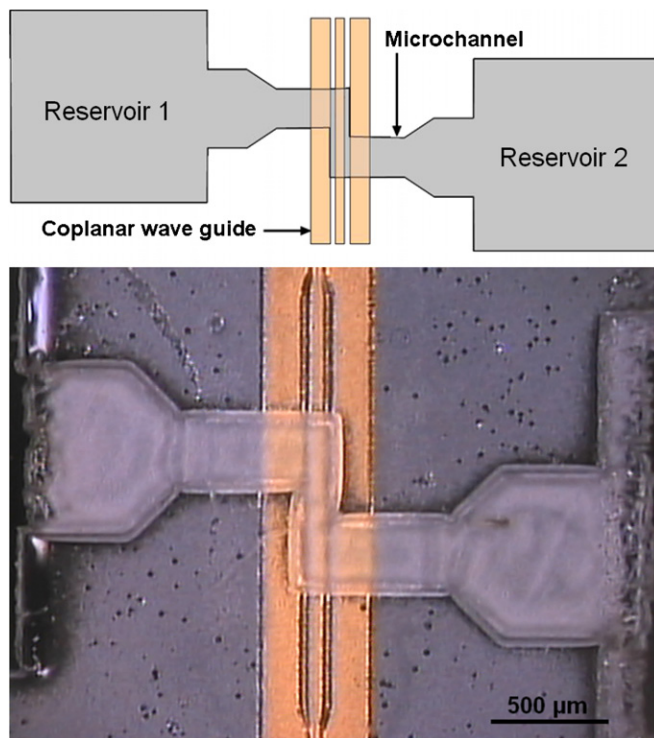


Figure 5. Scheme and optical micrograph of the fabricated fluidic MEMS. The microfluidic circuit is directly integrated on a coplanar waveguide. The fluidic access is ensured by two reservoirs at each side of the microchannel.

to 1 mm to form open reservoirs for easier fluidic access (figure 5). These reservoirs are masked during the plasma polymerization of the cover layer. These are subsequently used as etch holes of the sacrificial layer.

2.3. Water filling experiments

The wetting properties of different materials and their surface energies are controlled by angle contact measurements using a GBX Digidrop. Experiments to study the filling of the microchannels were carried out with DI water and phosphate

buffer (0.02 M, pH 6.8) as test fluids. To allow flow visualization, the microchannel system was mounted on an optical microscope equipped with a CCD camera. Because ppTMDS is transparent, liquid flow inside microchannel may be observed and captured as digital movie files. The fluidic features were determined by manual frame-to-frame comparisons.

3. Results and discussion

3.1. Plasma polymerization

The ability to form a buried air microchannel requires specific properties for both the overcoat and the sacrificial materials. Here, the PPSL technique was performed using plasma polymerized TMDS (ppTMDS) as the encapsulating material, and the positive photoresist AZ9260 as the sacrificial one. The ppTMDS deposit presents good mechanical strength to span large air gaps without collapsing during or after fabrication. Figure 6 shows a channel 700 μm wide and 20 μm high without pillars. A variety of aspect ratios and channel sizes can be achieved with this method. This is made possible not only because of the mechanical strength of the polymer but also because of the special polymerization mode of the TMDS monomer at the edges of the micropatterned structures. In fact, it can be seen from figure 7 that the film surface is formed by smooth and spherical hill-type morphologies of few micrometers size and the microchannel is surrounded by self-formed support structures. The latter play an important role to stabilize very large channels without pillars and could also explain the formation of periodic constrictions in the interior surface of ppTMDS channel sidewalls (figure 8). These observations suggest that (i) the polymerization mechanism can be affected by surface micropatterning, leading to the appearance of some interesting features of the deposited films and (ii) the film grows by forming small spherical clusters on the surface. The polymerization parameters (input power, pressure, monomer flow rate) determine the size of these clusters which in turn probably determine the deposition resolution discussed below. Further investigations are needed

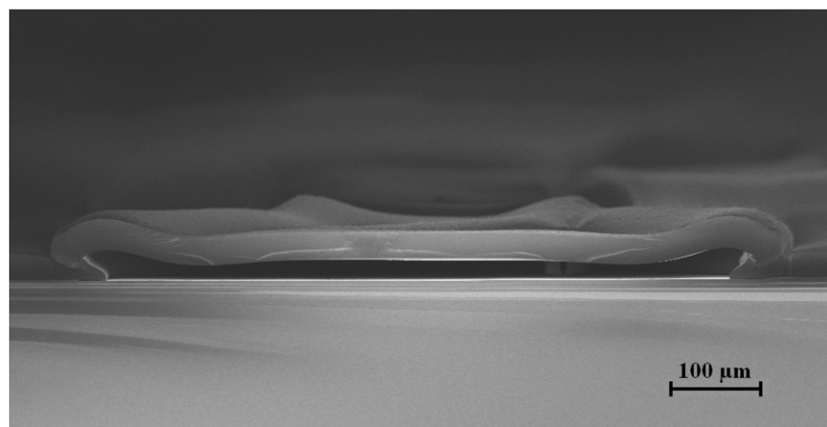


Figure 6. SEM micrograph of a cross-sectional profile of the largest microchannel obtained by the PPSL process. It presents dimensions of 700 μm width and 20 μm height.

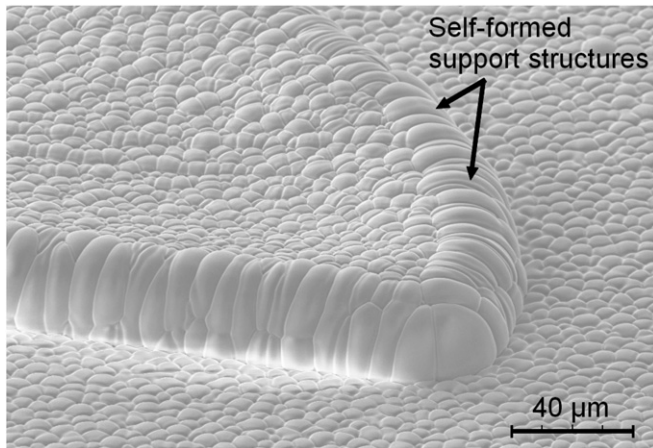


Figure 7. External aspect of a microchannel obtained by PPSL. The ppTMDS film surface is organized in spherical hill-type morphologies of few micrometers size. Special features can be seen at the microchannel edges.

to understand the ppTMDS growth mechanism on a patterned surface and its related properties.

Besides its topographical aspects, ppTMDS offers several advantages related to its physical and chemical properties, such as transparency in the visible wavelengths, chemical stability against solvents used in the lithography process and a relative low permittivity ($\epsilon_r \approx 4$) with low losses in the millimeter wave and terahertz spectrum [29]. The latter is of great interest for MEMS based on electromagnetic waveguides. Finally, unlike many polymers, ppTMDS is not self-fluorescent which enables fluorescent detection. The photoresist AZ9260 allows the achievement of a good aspect ratio and the deposition of film thickness up to 150 μm , corresponding to the achievable channel height [30]. However, PPSL is presently limited by the decomposition rate of this sacrificial material. Removing a polymerized AZ 9260 layer is the most time-consuming step, because the film polymerizes during UV irradiation and becomes relatively highly cross-linked. The sacrificial polymer decomposes with an initial rate of 7 $\mu\text{m min}^{-1}$ into volatile and soluble products. This rate depends strongly on the channel dimensions, and decreases over time to 2 $\mu\text{m min}^{-1}$

because of the saturation of the etching solution. As a result, 10 h is needed to release the fluidic circuit displayed in figure 5. Longer decomposition times are required for longer and thicker microchannels. However, because chemical etching is a diffusion-limited process, there is a limitation in the length of the channel that can be processed. This hindrance can be overcome by the use of other sacrificial materials that can decompose within a reasonable time or can be etched by a plasma or thermal process. Video 1 in the supplementary material available at stacks.iop.org/JMM/19/4/045022 shows the meniscus shape of water evaporating in the microchannel. The observed curvature confirms the hydrophobic properties of the channel wall after etching of the sacrificial layer, and ensures that there are negligible residues after decomposition. Figure 8 confirms that the microchannels are clean with no visible particulates contaminating the surface.

The direct plasma polymerization allows good adhesion on a large variety of substrates, thus avoiding the use of an additional adhesion layer. Furthermore, the deposition resolution (distance between two patterns that allows the deposition of the film on the support material, denoted as R_d) of this method is estimated to be around 4 μm . This property permits the fabrication of small channels (<4 μm width) without need of sacrificial materials. As we can see from figure 1, plasma polymerization on predefined micropatterns leads to the appearance of hydrophobic closed channels when the distance between these patterns is slightly higher than R_d . It is important to note that the deposition resolution of the polymer could also be used to create small accesses in the sacrificial layer patterns (figure 1, when $L \leq R_d$) to allow the entrance of the etching solution and thus permit faster decomposition.

3.2. Microfluidic characterization

The ppTMDS microchannel is 2 mm long, 20 μm high and has a total volume of 23 nL. We designed two reservoirs at the ends of the channel. In addition to their role as an access for the etching solution and as inlet/outlet ports, these reservoirs provide a surface tension that permits the filling of the channel by capillary force. The final device is shown in figure 8.

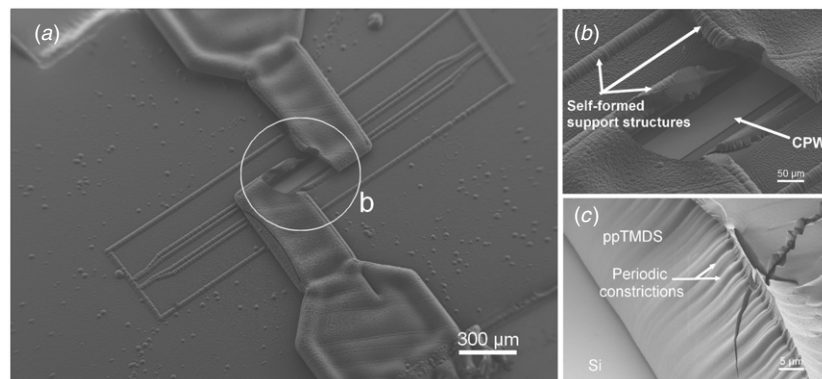


Figure 8. SEM micrographs of the (a) fluidic MEMS; (b) enlarged view of the partially abraded region, showing the electromagnetic sensor (CPW) and the self-formed support structures; (c) interior surface of the ppTMDS channel sidewall. We can see the periodic constrictions formed during polymerization.

The system was filled by adding a droplet to the channel reservoir. Capillary forces dominate largely in microfluidic systems due to the large surface-to-volume ratio. Surface tension of a liquid meniscus provides sufficient pressure to push water into the channel. Water and buffer were drawn into the device by capillarity from one reservoir to another. Liquid flow inside micrometer-sized channels is essentially laminar (Reynolds number <5 for the channel used here). In spite of the hydrophobic feature of ppTMDS, there is no need to treat the surface to fill the channels, unlike other hydrophobic polymers such as PDMS-based channels which need a prior hydrophilization treatment to allow a positive capillary action [31]. This might be explained by three main factors.

- (1) The capillary pressure produced by the liquid meniscus at the channel access reservoir allows water to enter the microchannel. This pressure is described as follows [32, 33]:

$$p = 2\delta \left(\frac{1}{h} + \frac{1}{w} \right) \quad (1)$$

where w is the width of the channel, h is its height and the surface tension $d_{(\text{H}_2\text{O})} = 7.36 \times 10^{-2} \text{ N m}^{-1}$ at 20°C . As the width of the reservoir is much larger than its thickness, equation (1) can be simplified to $p = 2\delta/h$. The pressure difference at the entrance of the microchannel used here is then $p = 8.096 \times 10^7 \text{ Pa}$. This pressure draws water with initial velocity of $V = 4.4 \text{ cm s}^{-1}$. The filling speed is reduced at the end to $V = 2.18 \text{ mm s}^{-1}$, due to the loss of pressure and viscosity effects. The filling speed is determined by the channel geometries, its surface energy and the liquid features.

- (2) The internal walls of the ppTMDS channel present periodic constrictions of $1\text{--}2 \mu\text{m}$ width and height. These constrictions may favor capillarity effects and then promote the displacement of water-based solutions along the channel surface [34]. This also can be useful in channel functionalization as these constrictions cause small velocities near the surface which in turn increases resident time and surface interactions, and thus promote adsorption and condensation of molecules.
- (3) The inner walls of the microchannels are non-wettable. Only the Si part is wettable, with the static contact angles $\theta_{\text{Si}} = 58^\circ \pm 3^\circ$ and $\theta_{\text{ppTMDS}} = 95^\circ \pm 3^\circ$. Total surface energies are 41.8 mJ m^{-2} (dispersive component $\gamma^d = 24.1 \text{ mJ m}^{-2}$, polar component $\gamma^p = 17.7$) and 22.3 mJ m^{-2} ($\gamma^d = 20.4 \text{ mJ m}^{-2}$, $\gamma^p = 1.9 \text{ mJ m}^{-2}$) for the hydrophilic and hydrophobic surfaces respectively. The internal ppTMDS wall generates a positive pressure acting against filling, while the surface tension force due to the bottom hydrophilic silicon surface reduces the ppTMDS effect and assists the water to flow inside the microchannel. Other factors are already known to affect slip, including surface roughness and the reduction in channel width which acts as passive valves.

The water filling operation can be seen in supplemental material available at stacks.iop.org/JMM/19/4/045022 (video 2). Capillary pressure is used here as the simplest way to draw liquids on the circuits. However, the PPSL method can easily be applied to pressure-driven flow systems and cavity-based MEMS.

4. Conclusion

A novel fabrication method of closed microchannels for microfluidic systems is reported. It is based on a direct plasma polymerization of the encapsulating material, here the organosilicon polymer ppTMDS, on a photopatterned resist. The latter, used as a sacrificial layer, was then decomposed to release the desired channels. We can easily create microchannels with various shapes and dimensions and with different surface features. In addition, this simple method allows the direct and rapid integration of fluidic circuits onto various sensors such as microelectrodes and waveguides.

Applying the concept of plasma polymerization to the fluidic MEMS fabrication is particularly attractive for several reasons: (1) it avoids the bonding step in the fabrication protocol; (2) it uses the ambient temperature process; (3) the large panel of organic or organosilicon materials that can be deposited; (4) the good biocompatibility of these materials and their easy functionalization; (5) processing onto different material substrates without the need of an adhesion layer and (6) this process can be scaled up to industrial production relatively easily. Beside this, ppTMDS films enable the fabrication of very large cavities ($>700 \mu\text{m}$) without pillars and small channels ($<5 \mu\text{m}$ width) without using a sacrificial material. One of our further challenges in this issue is the creation of microfluidic networks by the direct plasma polymerization of both sacrificial and overcoat layers to achieve the whole process in the same plasma reactor.

Acknowledgments

This work is supported by the National Research Agency funds (contract ANR-05-NT05-2.46562) and the Interdisciplinary Research Program of Lille University (PPF BioMEMS 2006 no 1803).

References

- [1] Kohl P A, Zhao Q, Patel K, Schmidt D, Allen S A B, Shick R and Jayaraman S 1998 Air-gaps for electrical interconnections *Electrochem. Solid-State Lett.* **1** 49–51
- [2] Dang B, Joseph P, Bakir M, Spencer T, Kohl P and Meindl J 2005 Wafer-level microfluidic cooling interconnects for GSI Proc. *IEEE Int. Interconnect Technology Conf.* (6–8 June, San Francisco, USA) pp 180–2
- [3] Zhao B, Moore J S and Beebe D J 2001 Surface-directed liquid flow inside microchannels *Science* **291** 1023–26
- [4] Delamarche E, Bernard A, Schmid H, Michel B and Biebuyck H 1997 Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks *Science* **276** 779–81
- [5] Treizebré A and Bocquet B 2008 Nanometric metal wire as a guide for THz investigation of living cells *Int. J. Nanotechnol.* **784–95** 05 Nos. 6/7/8
- [6] Boer M J d, Tjerkstra R W, Berenschot J W, Jansen H V, Burger G J, Gardeniers J G E, Elwenspoek M and Van den Berg A 2000 Micromachining of buried micro channels in silicon *IEEE J. MEMS* **9** 94–103
- [7] Dwivedi V K, Gopal R and Ahmad S 2000 Fabrication of very smooth walls and bottoms of silicon microchannels for heat dissipation of semiconductor devices *Microelectron. J.* **31** 405–10

- [8] McDonald J C and Whitesides G M 2002 Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices *Acc. Chem. Res.* **35** 491–9
- [9] Chie R-D 2006 Micromolding of biochip devices designed with microchannels *Sensors Actuators A* **128** 238–47
- [10] Peeni B A, Lee M L, Hawkins A R and Woolley A T 2006 Sacrificial layer microfluidic device fabrication methods *Electrophoresis* **27** 4888–95
- [11] Chatterjee R et al 2007 Three dimensional chip stacking using a wafer-to-wafer integration *Int. Interconnect Technology Conf., IEEE (4–6 June)* pp 81–3
- [12] Walsh K, Norville J and Tai Y-C 2001 Photoresist as a sacrificial layer by dissolution in acetone *14th IEEE Int. Conf. on Micro Electro Mechanical Systems* pp 114–7
- [13] Jayachandran J P, Reed H A, Zhen H, Rhodes L F, Henderson C L, Allen S A B and Kohl P A 2003 Air-channel fabrication for microelectromechanical systems via sacrificial photosensitive polycarbonates *IEEE J. MEMS* **12** 147–59
- [14] Lee L S and Gleason K K 2001 Hot filament chemical vapor deposition of polyoxymethylene as a sacrificial layer for fabricating air gaps *Electrochem. Solid-State Lett.* **4** G81–4
- [15] Bhusari D, Reed H A, Wedlake M, Padovani A M, Allen S A B and Kohl P A 2001 Fabrication of air-channel structures for microfluidic, microelectromechanical, and microelectronic applications *IEEE J. MEMS* **10** 400–8
- [16] Wu X, Reed H A, Wang Y, Rhodes L F, Elce E, Ravikiran R, Shick R A, Henderson C L, Allen S A B and Kohl P A 2003 Fabrication of microchannels using polynorbornene photosensitive sacrificial materials *J. Electrochem. Soc.* **150** H205–13
- [17] Noha H-S, Choib Y, Wu C-F, Hesketh and P J and Allen M G 2003 Rapid, low-cost fabrication of parylene microchannels for microfluidic applications *12th Int. Conf. on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems (8–12 June, Boston, MA)*
- [18] Linder V, Gates B D, Ryan D, Parviz B A and Whitesides G M 2005 Water-soluble sacrificial layers for surface micromachining *Small* **7** 730–6
- [19] Joseph P J, Kelleher H A, Allen S A B and Kohl P A 2005 Improved fabrication of micro air-channels by incorporation of a structural barrier *J. Micromech. Microeng.* **15** 35–42
- [20] Peeni B A, Conkey D B, Barber J P, Kelly R T, Lee M L, Woolley A T and Hawkins A R 2005 Planar thin film device for capillary electrophoresis *Lab Chip* **5** 501–5
- [21] Papautsky I, Brazzle J, Swerdlow H and Frazier A B 1998 A low-temperature IC-compatible process for fabricating surface-micromachined metallic microchannels *IEEE J. MEMS* **7** 267–73
- [22] Bagolini A, Pakula L, Scholtes T L M, Pham H T M, French P J and Sarro P M 2002 Polyimide sacrificial layer and novel materials for post-processing surface micromachining *J. Micromech. Microeng.* **12** 385–9
- [23] Tsai S-W, Loughran M, Hiratsuka A, Yano K and Karube I 2003 Application of plasma-polymerized films for isoelectric focusing of proteins in a capillary electrophoresis chip *Analyst* **128** 237–44
- [24] Muguruma H and Karube I 1999 Plasma-polymerized films for biosensors *TRAC Trends Anal. Chem.* **18** 62–8
- [25] Quédé A, Mutel B, Supiot P, Jama C, Dessaux O and Delobel R 2003 Characterization of organosilicon films synthesized by N₂-PACVD. Application to fire retardant properties of coated polymers *Surf. Coat. Technol.* **180** 265–70
- [26] Supiot P, Vivien C, Granier A, Bousquet A, Mackova A, Escaich D, Clergereaux R, Raynaud P, Stryhal Z and Paylik J 2006 Growth and modification of organosilicon films in PECVD and remote afterglow reactors *Plasma Process. Polym.* **3** 100–9
- [27] Facer G R, Notterman D A and Sohn L L 2001 Dielectric spectroscopy for bioanalysis: from 40 Hz to 26.5 GHz in a microfabricated wave guide *Appl. Phys. Lett.* **78** 996
- [28] Mille V, Bourzgui N E, Vivien C, Supiot P and Bocquet B 2006 New technology for high throughput THz *BioMEMS Proc. 28th IEEE-EMBS Int. Conf. (30 August–3 September, New York, USA)* pp 3505–8
- [29] Bocquet B, Bourzgui N, Guhel Y, Mille V, Vivien C and Supiot P 2004 Design of silicon-PPTMDS bio-MEMS by cold RPECVD *Proc. of SPIE Microfluidics, BioMEMS and Medical Microsystems II (San Jose, CA, USA)* vol 5345 pp 118–29
- [30] Conédéra V, Le Goff B and Fabre N 1999 Potentialities of a new positive photoresist for the realization of thick moulds *J. Micromech. Microeng.* **9** 173–5
- [31] Bodas D and Khan-Malek C 2007 Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—an SEM investigation *Sensors Actuators B* **123** 368–73
- [32] White F M 1986 *Fluid Mechanics* 2nd edn (New York: McGraw-Hill)
- [33] Yang L-J, Yao T-J, Huang Y-L, Xu Y and Tai Y-C 2002 Marching velocity of capillary menisci in microchannels *15th IEEE Int. Conf. on Micro Electro Mechanical Systems* vol 15 pp 93–6
- [34] Simoes E W, de Souza S G, da Silva M L P, Furlan R and Peres H E M 2006 Study of preconcentration of non-polar compounds in microchannels with constrictions *Sensors Actuators B* **115** 232–9

* N.B: Les paramètres expérimentaux des différentes étapes peuvent être retrouvés dans les annexes 6 et 7.

Références

- [1] Weston D.F., Smekal T., Rhine D.B., Blackwell J., “Fabrication of microfluidic devices in silicon and plastic using plasma etching”, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **19**, 2001, 2846-2851.
- [2] Ratner B. D., “Nanostructures, Microscale Technologies, and Plasma Deposited Films”, *Plasma Polym.*, **6**, 2001, p189.
- [3] Ichiki T., Sugiyama Y., Taura R., Koidesawa T., Horiike Y., “Plasma applications for biochip technology”, *Thin Solid Films*, **435**, 2003, 62-68.
- [4] Rossi F., Bretagnol F., Valsesia A., Colpo P., “Application of plasma processes in NanoBiotechnology”, *Eur. Phys. J. Appl. Phys.*, **43**, 2008, 277-281.
- [5] Mille V., Bourzgui N., Vivien C., Supiot P., Bocquet B., “ppTMDS as a new polymer technology for a high throughhput bio-MEMS design”, *J. micromech. Microeng.*, **18**, 2008, 125026.1.
- [6] Hiratsuka A., Mugurumab H., Lee K.-H., Karube I., “Organic plasma process for simple and substrate-independent surface modification of polymeric BioMEMS devices”, *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 2004, 1667-1672.
- [7] Dhayal M., “Application of low-temperature substrate bonding in fabrication of reusable micro-fluidic devices”, *Vacuum*, **80**, 2006, 488-493.
- [8] Hanein Y., Pan V.Y., Ratner B. D., Denton D. D., Böhringer K. F., “Micromachining of non-fouling coatings for bio-MEMS applications”, *Sens. Actuators B*, **81**, 2001, 49-54.
- [9] Lin Y.-S., Chang C.-H., Huang T.-J., “Enhanced corrosion protection of cold rolled steel by low-temperature plasma cleaning and plasma polymerization”, *Surf. Coat. Technol.*, **200**, 2006, 4929-4938.
- [10] Kampfrath G., Hintsche R., “Plasma-Polymerized Thin Films for Enzyme Immobilization in Biosensors”, *Anal. Lett.*, **22**, 1989, 2423-2431.
- [11] Bouaidat S., Winther-Jensen B., Christensen S. F., Jonsmann J., “Plasma-polymerized coatings for bio-MEMS applications”, *Sens. Actuators A*, **110**, 2004, 390-394.
- [12] Kurosawa S., Miura H., Takahashi H., Park J.-W., Aizawa H., Noda K., Yamada K., Hirata M., “Preparation of long-lifetime gas recognition films by plasma polymerization technique”, *Sens. Actuators B*, **108**, 2005, 558-563.

- [13] Hiratsuka A., Kojima K.-i., H. Muguruma, Lee K.-H., Suzuki H., Karube I., “Electron transfer mediator micro-biosensor fabrication by organic plasma process”, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 2005, 957-964.
- [14] Storey D. M., McGrath T. S., Shimpi T. M., “Molecular plasma deposition of colloidal materials”, 31 Jul. 2007, United States Patent 7250195 B1.
- [15] Heyse P., Roeffaers M. B. J., Paulussen S., Hofkens J. Jacobs P. A., Sels B. F., “Protein immobilization using atmospheric-pressure dielectric-barrier discharges: a route to a straightforward manufacture of bioactive films”, *Plasma process. Polym.*, **5**, 2008, 186-191.
- [16] VITO plasma technology, <http://www.vitoplasma.com/en/66>
- [17] Tsuchiya Y., Akutu K., Iwata A., “Surface modification of polymeric materials by atmospheric plasma treatment”, *Prog. Org. Coat.*, **34**, 1997, 100-107.
- [18] Tendero C., Tixier C., Tristant P., Desmaison J., Leprince P., “Atmospheric pressure plasmas: A review”, *Spectrochim. acta, Part B: Atom. spectrosc.*, **61**, 2006, 2-30.
- [19] Topala I., Dumitrascu N., Popa G., “Properties of the acrylic acid polymers obtained by atmospheric pressure plasma polymerization”, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B*, **267**, 2009, 442-445.
- [20] Chen G., Chen S., Zhou M., Chen W., Yang S., “Organic nanocones fabricated by atmospheric plasma polymerization for immobilizing bioprobes”, *Nanotechnology*, **19**, 2008, 075504.
- [21] Akdoğan E., Çökeliler D., Marcinauskas L., Valatkevicius P., Valincius V., Mutlu M., “A new method for immunosensor preparation: Atmospheric plasma torch”, *Surf. Coat. Technol.*, **201**, 2006, 2540-2546.
- [22] Yang P., Zhang J., Guo Y., “Synthesis of intrinsic fluorescent polypyrrole nanoparticles by atmospheric pressure plasma polymerization”, *Appl. Surf. Sci.*, **255**, 2009, 6924-6929.
- [23] Foest R., Schmidt M., Becker K., “Microplasmas, an emerging field of low-temperature plasma science and technology”, *Intern. J. Mass Spectr.* **248**, 2006, 87-102.
- [24] Chao C. C., Liao J.-D., Chang J.-E. (Guest Editors), Cluster issue on microplasmas (Numéro special: “Microplasmas”), *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **41**, 2008.
- [25] Ideno T., Ichiki T., “Maskless etching of microstructures using a scanning microplasma etcher”, *Thin Solid Films*, **506-507**, 2006, 235-238.

- [26] Shimizu Y., Sasaki T., Bose A. C., Terashima K., Koshizaki N., “Development of wire spraying for direct micro-patterning via an atmospheric-pressure UHF inductively coupled microplasma jet”, *Surf. Coat. Technol.*, **200**, 2006, 4251-4256.
- [27] Yoshiki H., “Thin film coatings on capillary inner walls by microplasma”, *Vacuum*, in press, doi:10.1016/j.vacuum.2009.06.032.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre général de l'extraordinaire mutation qui se profile dans le domaine de la biologie et de l'environnement. Les prévisions d'utilisation de microsystèmes microfluidiques dans ces secteurs d'activités sont exponentielles. Des besoins apparaissent aussi bien en termes de nouveaux moyens d'investigations ou d'actionnement. De plus, dans les domaines du capteur et de l'instrumentation, le concept « d'intelligence ambiante » nécessite de développer de nouveaux matériaux et procédés de fabrication pour pouvoir accueillir sur une même puce la source d'énergie, les moyens de communication et d'analyses, ainsi que les aspects actionnement et mobilité du microdispositif.

Ce travail est donc centré sur deux objectifs bien précis: le premier est l'intégration des plasmas froids dans le procédé de microfabrication des BioMEMS, en développant des méthodes de fonctionnalisation et de microfabrication par polymérisation plasma. Le second est l'utilisation de ce bioMEMS pour l'analyse en temps réel et sans marqueur d'une réaction enzymatique par la spectroscopie TeraHertz. Ces objectifs ont nécessité un développement à plusieurs niveaux, suivi d'une intégration finale des différentes fonctions.

La première réalisation, décrite dans le chapitre 3, a consisté à développer un procédé pour rendre la surface du BioMEMS stable, réactive et biocompatible. Un film mince riche en amine a été déposé par polymérisation assistée par plasma de décharge radiofréquences, avec une vitesse de croissance qui peut atteindre 26 nm/min, ce qui est 5 à 20 fois plus rapide que les valeurs rapportées dans la littérature. Une telle vitesse de croissance permet de fonctionnaliser une surface en quelques minutes. L'analyse des caractéristiques des films déposés montre que la densité des fonctions amines réactives et la stabilité des films peut aisément être contrôlée par un simple réglage des paramètres du plasma, principalement la puissance RF. Des couches minces avec les caractéristiques désirées ont été ainsi obtenues avec les paramètres optimisés (50-75 W, 190 Pa). Ces films sont très stables en milieu aqueux et peuvent avoir une épaisseur de 10-800 nm et une densité apparente de fonctions amines relativement élevée ($5.5 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$ ou 15 NH_2 pour 100 atomes de carbone). En outre, nous avons démontré dans le chapitre 3 que dans les conditions utilisées, la densité apparente des fonctions amines augmente avec l'épaisseur du film, ce qui ouvre de nouvelles perspectives

pour l'utilisation de ce type de polymère comme matrice tridimensionnelle pour la conception de micropuces biologiques.

La densité des amines mesurée est largement suffisante pour permettre l'immobilisation et la formation d'une monocouche d'enzyme, i.e. trypsine, à la surface du film ppAA tel que présenté dans le chapitre 4. En effet, ce chapitre rapporte trois résultats importants: (i) une monocouche stable de protéine se forme à la surface du polymère de ppAA même si la surface n'a pas été préalablement traitée avec un agent espaceur. Cela signifie que le film de ppAA représente un très bon support pour l'immobilisation de biomolécules que ce soit par adsorption ou par liaison covalente; (ii) l'utilisation du glutaraldehyde n'a pas d'effet sur le rendement d'immobilisation, mais augmente significativement les performances enzymatiques en offrant une meilleure flexibilité pour l'enzyme. A l'inverse, la réduction des fonctions imines ne change pas l'activité enzymatique mais améliore le rendement d'immobilisation grâce à la stabilité du lien covalent. La combinaison des deux traitements a abouti à la mise au point d'une meilleure méthode d'immobilisation; (iii) malgré un changement dans la valeur des paramètres cinétiques après l'immobilisation de l'enzyme, ceux-ci restent du même ordre de grandeur que ceux de l'enzyme libre, révélant ainsi le maintien d'une bonne activité catalytique après le greffage.

L'intégration de ces procédés de bio-fonctionnalisation au processus de microfabrication d'un BioMEMS THz (chapitre 5) a révélé deux points essentiels: premièrement, le film de ppAA reste fonctionnel et réactif après des traitements à 150 °C, ce qui montre une bonne stabilité thermique du film. Deuxièmement, les enzymes immobilisées dans le bioMEMS restent très actives avec une diminution des contraintes diffusionnelles grâce au confinement du milieu réactionnel dans les microcanaux.

Le BioMEMS ainsi fonctionnalisé a été utilisé pour réaliser des mesures en spectroscopie THz grâce à des guides d'ondes intégrés. Les analyses en transmission (0,06-0,11 THz) montrent plusieurs points intéressants :

- ✓ Le film de ppAA (50-100 nm) s'avère être un matériau complètement transparent dans la bande de fréquence utilisée, ce qui rend ce polymère très intéressant pour l'analyse de biomolécules immobilisées en spectroscopie THz.

- ✓ Le BioMEMS THz est capable de réaliser des mesures à sec en distinguant le film de ppAA de la monocouche de protéines, bien que cette dernière présente moins de 5 nm d'épaisseur.
- ✓ Le BioMEMS THz est capable de réaliser des mesures en milieu aqueux en suivant une réaction enzymatique en temps réel et à l'échelle micrométrique (volume d'analyse ≈ 1 nL). L'évolution de l'absorbance durant la réaction enzymatique montre une cinétique très rapide avec une réponse temporelle qui suppose une réaction de type michaelienne. La reproduction des mêmes mesures avec différentes concentrations de substrats permettra probablement de remonter aux paramètres cinétiques de l'enzyme dans un milieu confiné avec moins de contraintes diffusionnelles. Cette perspective est particulièrement attractive puisqu'elle permettrait de comparer les résultats enregistrés à ceux obtenus par la spectrofluorométrie dans le chapitre 4. Une telle comparaison donnerait une meilleure estimation des effets diffusionnels et affinerait nos estimations des paramètres cinétiques.

D'une manière générale, la spectroscopie THz combinée à la technologie des microsystèmes va très probablement permettre d'accéder à de nouvelles propriétés de la matière vivante par une méthode non-invasive, sans marqueur et en temps réel. Cependant, une accumulation des mesures expérimentales reste encore nécessaire pour pouvoir aboutir à un modèle d'interprétation et construire des banques de données.

Au cours de cette thèse, nous avons également réussi à utiliser la polymérisation plasma sur des couches sacrificielles pour la fabrication du système microfluidique des BioMEMS (Chapitre 6). Des microcanaux de 5 à 800 μm de largeur sont ainsi obtenus après dissolution d'une couche sacrificielle. Nous avons également mis en évidence un mode de croissance particulier du film de ppTMDS qui permet l'apparition spontanée de microcanaux par une simple polymérisation plasma sur une surface microstructurée, sans utilisation de couches sacrificielles ou de gravure.

La combinaison de la technologie des plasmas froids avec les méthodes lithographiques ouvre de nouvelles perspectives pour l'élaboration de nouveaux microsystèmes microfluidiques dédiés à l'analyse biologique, médicale et environnementale. L'industrialisation des BioMEMS passera très probablement par la réalisation de la quasi-

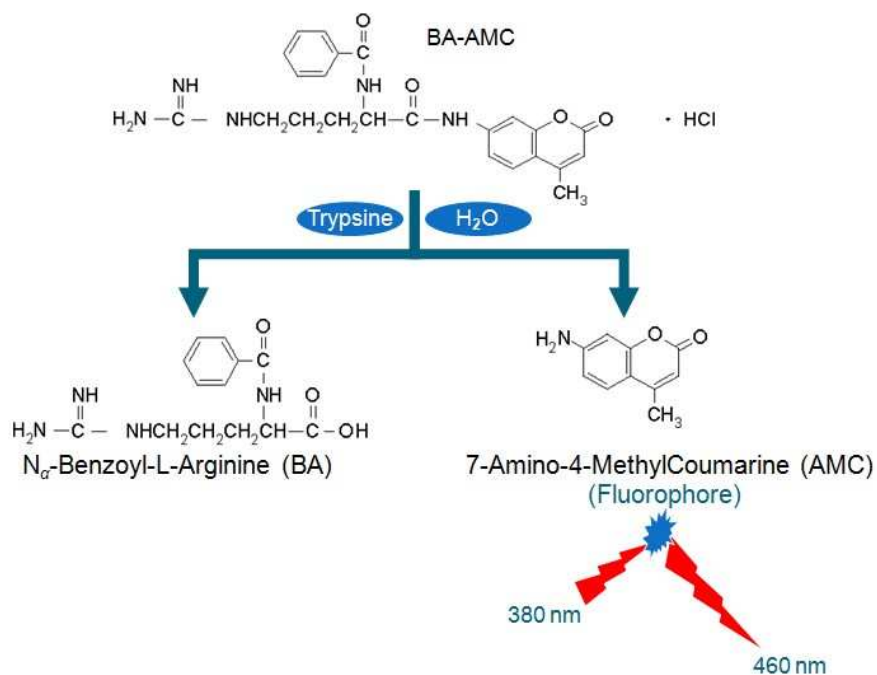
totalité des étapes de fabrication par une suite de procédés plasmas froids automatisés, principalement à pression atmosphérique.

Au-delà des résultats expérimentaux et des développements concernant les BioMEMS, les plasmas froids et la spectroscopie THz, cette thèse a tenté d'apporter un éclairage sur les orientations futures et les enjeux d'avenir pour les trois domaines sus-cités. Cet éclairage devrait permettre d'opérer des changements et d'élaborer des choix stratégiques dès maintenant, afin de rester compétitif au cours des dix prochaines années et pouvoir ainsi prétendre à une petite part du grand marché des nouvelles technologies.

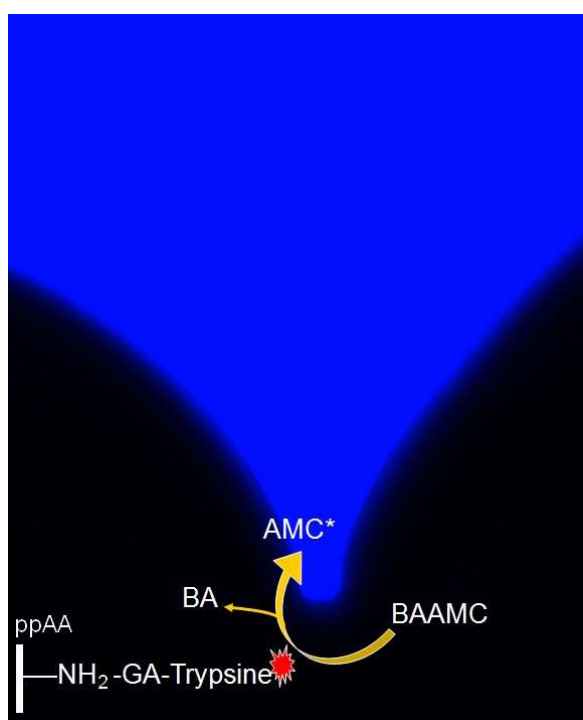
Annexes

Annexe 1. (a) Schéma de la réaction de biocatalyse du substrat BA-AMC par la trypsine pour générer un produit fluorescent. (b) Image optique du microscope à fluorescence pendant la réaction.

(a)



(b)



Annexe 2. Démonstration de la relation du coefficient d'extinction κ avec le coefficient d'absorption α .

Considérant une onde électrique plane d'un faisceau lumineux se propageant dans la direction x à travers un milieu d'indice de réfraction n . κ étant le coefficient d'extinction, ω la fréquence angulaire et c la vitesse de la lumière. Le vecteur d'onde k est donné par :

$$k = \frac{2\pi}{\lambda/n^*} = \frac{n^* \omega}{c} = (n + j\kappa) \frac{\omega}{c} \quad (A1)$$

Et le champ électrique s'exprime par :

$$\begin{aligned} E(x, t) &= E_0 \cdot e^{j(kx - \omega t)} \\ &= E_0 \cdot e^{-\frac{\kappa\omega}{c}x} \cdot e^{j\left(\frac{n\omega}{c}x - \omega t\right)} \end{aligned} \quad (A2)$$

L'a puissance du signal est proportionnelle au carré du champ électrique, ce qui s'écrit :

$$I \propto E \cdot E = E_0^2 \cdot e^{-2\frac{\kappa\omega}{c}x} \quad (A3)$$

Cette relation traduit la décroissance du signal électromagnétique dans un milieu à pertes et peut s'exprimer sous la forme suivante :

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-\alpha x} \quad (A4)$$

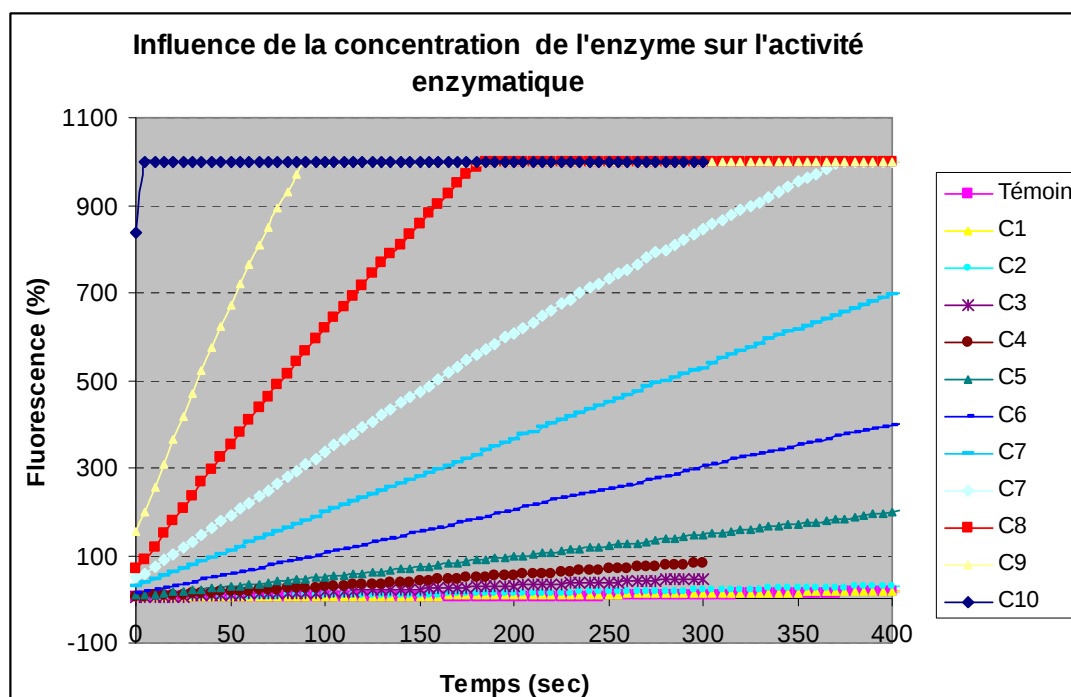
C'est avec cette loi que Beer-Lambert a exprimé l'atténuation du milieu en fonction de la concentration des solutions chimiques ou biologiques.

Des relations (A3) et (A4) on déduira que κ est lié au coefficient d'absorption α par la relation :

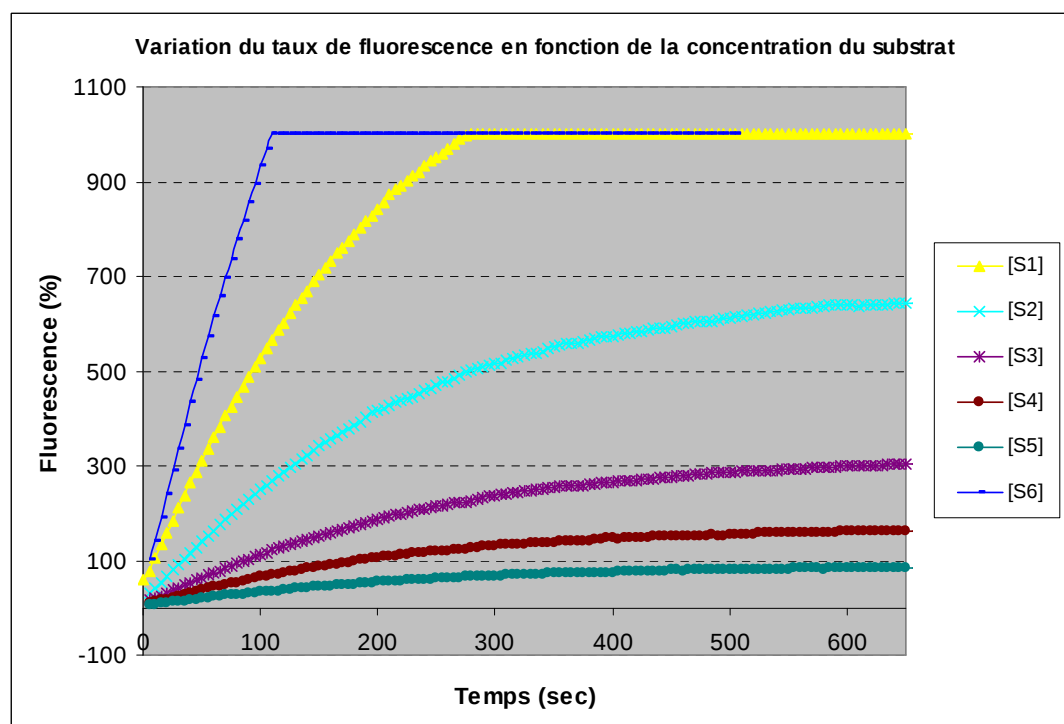
$$\alpha = 2 \frac{\kappa\omega}{c} = \frac{4\pi\kappa}{\lambda} \quad (A5)$$

Annexe 3. Variation de la fluorescence produite par la réaction enzymatique en fonction de (a) la concentration en enzyme $[C_i]$ ($[C_i] = 0,05-400 \mu\text{g/ml}$) ou (b) la concentration en substrat $[S_i]$ ($[S_i] = 10 \text{ nM}-2 \text{ mM}$).

(a)



(b)



Annexe 4. Processus de microfabrication du BioMEMS TeraHertz.

Cette annexe représente le tableau S1 cité dans l'article 4 comme données supplémentaires.

Table S1. Technological process of the THz BioMEMS microfabrication

Step	Description
1- Microfluidic circuits fabrication	Substrate: Silicon (Level 2) - Deposition (LPCVD)^a of 200 nm thickness silicon nitride (Si_xN_y) - Spin coating of the photoresist AZ4562: (speed: 1500 rpm^b, Acceleration: 3000 rpm, time: 40s, thickness: 10 μm). - Photolithography: exposition to 400 nm UV light during 20 sec. - Si_xN_y layer etching by RIE^c (gas mixture: CHF_3/CF_4, gas flows 20 sccm/20 sccm^d, power: 180 W, pressure: 100 mTorr, time: 6 min). - Plasma etching (RIE) of the silicon substrate. - Dry etching by a KOH bath at 80 °C.
2- THz waveguide fabrication	Substrate: Quartz (Level 1) - Deposition of 50 nm binding titanium layer. - Sputtering of 450 nm gold layer. - Spin coating of AZnLOF 2020 photoresist layer to get 2 μm thickness. - Photolithography of the THz waveguides - Plasma etching (RIE)
3- Wafer bonding	- Spin coating of 2 μm BCB layer onto level 1 (speed: 2500 rpm, acceleration: 2500 rpm, time: 20 s). - BCB layer liquefaction at 150 °C. - Assemblage of levels 1 and 2 in a Logitech automatic bonder at 180 °C and 2 bar pressure for 1 hour. - The structure (Level 1+2) was functionalized with cold plasma and then covered with a BCB coated glass substrate (Level 3).

^a LPCVD: Low Pressure Chemical Vapor Deposition

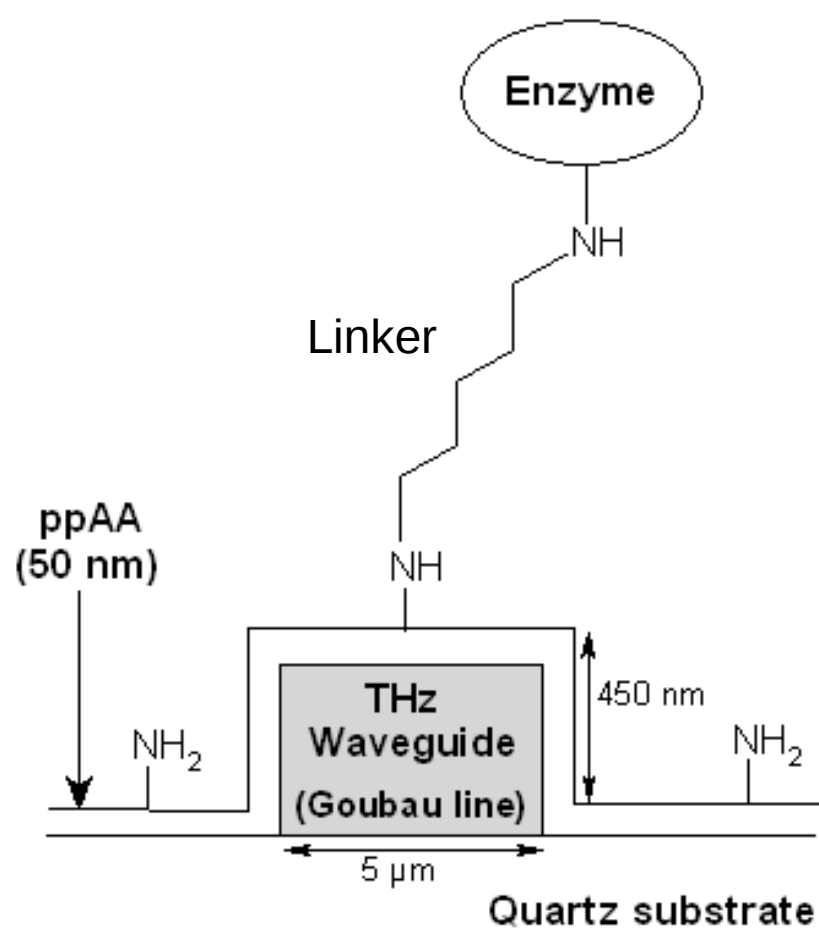
^b rpm: revolutions per minute

^c RIE: Reactive Ion Etching

^d sccm: standard cubic centimeter per minute.

Annexe 5. Schéma de la bio-fonctionnalisation du BioMEMS TeraHertz.

Cette annexe représente la figure S1 citée dans l'article 4 comme données supplémentaires.



Annexe 6. Processus de réalisation des lignes de transmission coplanaires (CPW) pour l'intégration des microcanaux par la méthode PPSL.

Les lignes de transmission sont réalisées en trois étapes technologiques :

a. Dépôt d'une couche d'or :

Cette étape est réalisée dans un pulvérisateur cathodique de type Plassys MP 450S, réglé à une pression de 3×10^{-6} mbar. Un substrat de silicium (100) dopé N, avec une haute résistivité, et une épaisseur de 350 ± 25 μm est utilisée pour déposer une couche de Chrome (Cr), qui joue le rôle d'une couche d'accroche, avant de déposer une couche d'or qui va servir pour la gravure des lignes coplanaires. Les paramètres de dépôt sont résumés dans le tableau 1 :

Paramètres Etape	Puissance (w)	Débit (sccm)	Tension (V)	Temps (min)	Epaisseur déposée (nm)
Cr	150	30	530	3	200
Au	150	10	279	12	1000

b. Photolithographie:

Afin de transférer les motifs des lignes à partir d'un masque vers le substrat préparé, une résine positive « AZ 1518 » a été déposée en tournette (*spin coating*) avec les paramètres (V : 3500 rpm, A : 5000, temps: 10 sec) pour avoir une épaisseur d'environ 1 μm .

Le résinage a été suivi d'un recuit à 100 °C pendant 1 min, puis d'une insolation aux UV ($10,48 \text{ mW/cm}^2$) pendant 3 min. Enfin, les motifs des lignes ont été révélés en plongeant le substrat dans un solvant « MIF 726 » pendant 30 sec. Ce procédé permet d'avoir un masque de résine sur la couche d'or.

c. Gravure des lignes:

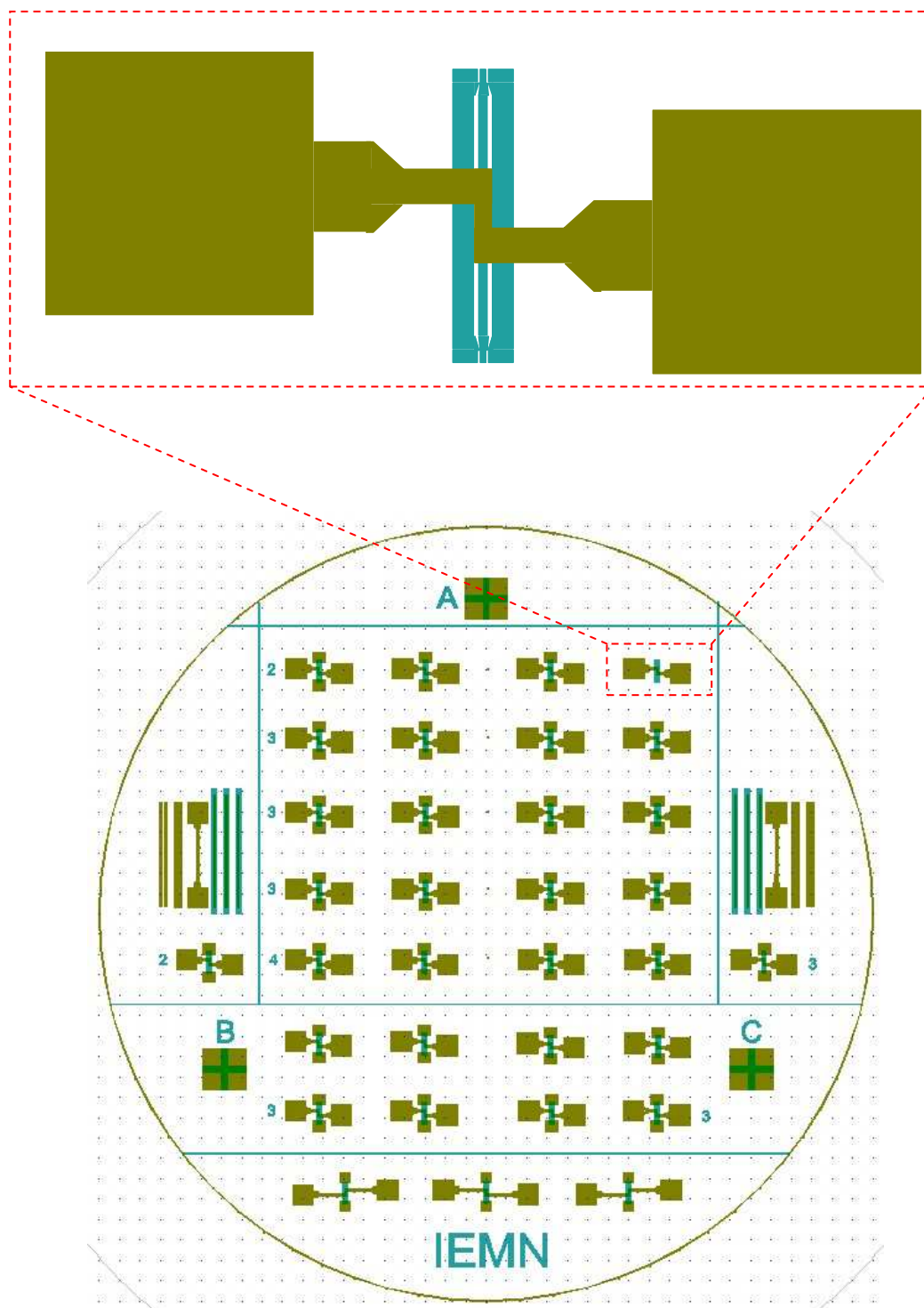
La gravure de la couche d'or à travers le masque de résine est réalisée dans un usineur ionique (gravure sèche par un flux d'argon) avec les paramètres (pression de départ : 7×10^{-6} mbar, débit d'Ar : 5,3 sccm, puissance : 500w, température du substrat : 9°C, temps : 23 min). Cette étape permet d'avoir des lignes coplanaires sur le substrat traité.

d. Nettoyage des lignes:

La dernière étape consiste à nettoyer le substrat de toutes les impuretés dues au processus technologique, par un traitement au plasma O_2 (150w, 100 mTorr, 30 sccm, 15 min).

Le même substrat utilisé précédemment pour déposer des lignes coplanaires (capteur électromagnétique), sera utilisé également pour la fabrication des microcanaux (système microfluidique). Cette microfabrication est réalisée en trois étapes détaillées dans l'article 4.

Annexe 7. Image du masque utilisé pour la photolithographie des lignes coplanaires (en bleu) et du circuit microfluidique (en vert) pour le développement du procédé PPSL. (Design réalisé par *Clewin 3.0*).



Liste des Tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des plasmas thermiques et non thermiques (froids).

Tableau 2. Paramètres cinétiques apparents de la trypsine libre vs. trypsine immobilisée.

Liste des Figures

Figure 1. Schéma basique d'un BioMEMS.

Figure 2. Evolution de la production scientifique (publications, brevets) concernant les bioMEMS depuis l'année 1979. Le graphique a été réalisé par l'interrogation des bases de données SCOPUS et Science Direct, en recherchant les termes: *BioMEMS OR biosensors OR lab on chip OR micro total analysis system*, dans *title OR abstract OR key words*.

Figure 3. Evolution du marché mondial des BioMEMS depuis l'année 2005 [7].

Figure 4. Le spectre électromagnétique et l'emplacement du champ TeraHertz.

Figure 5. Evolution de la production scientifique (publications, brevets) concernant l'utilisation des THz pour les sciences de la vie, depuis l'année 1995. Le graphique a été réalisé par l'interrogation des bases de données SCOPUS et Science Direct, en recherchant les termes: *Terahertz OR THz OR subterahertz OR millimeterwaves AND bio*, dans *title OR abstract OR key words*.

Figure 6. Evolution de la production scientifique (publications, brevets) concernant l'utilisation du plasma froid en micro et nanotechnologie, depuis l'année 1979. Le graphique a été réalisé par l'interrogation des bases de données SCOPUS et Science Direct, en recherchant les termes: *cold plasma OR non thermal plasma AND BioMEMS OR microtechnology, microfabrication, nanotechnology, biosensors, fonctionnalization OR lab on chip OR micro total analysis system*, dans *title OR abstract OR key words*.

Figure 7. Principe de fonctionnement et photos du réacteur plasma à décharge RF (rfGD).

Figure 8. Schéma simplifié du mécanisme de polymérisation plasma d'allylamine en décharge RF et en présence d'argon.

Figure 9. Réacteur RPECVD pour le dépôt de ppTMDS. R : régulateur de débit massique ; JP : jauge de pression; GM : générateur micro-onde ; PAL : piège à azote liquide ; DC : dispositif de couplage. L'image à droite montre la chambre de réaction (post-décharge) pendant la polymérisation plasma.

Figure 10. Différentes régions plasma du réacteur RPECVD.

Figure 11. Mécanisme simplifié de polymérisation plasma de TMDS en RPECVD, en présence d'azote et d'oxygène.

Figure 12. Photographie de l'UV-ozoneur (UVO Cleaner).

Figure 13. Schéma des différentes interactions induites par le plasma UV-ozone.

Figure 14. L'effet du traitement UV-ozone sur l'angle de contact du silicium et du ppTMDS.

Figure 15. L'effet du traitement UV-ozone sur la composition chimique de la surface du ppTMDS.

Figure 16. Schéma représentant les différentes forces intervenantes dans l'angle de contact, et des images représentant de gauche à droite: l'angle de contact de l'eau sur le silicium (Si), le polymère plasma hydrophobe du TMDS (ppTMDS) et le polymère plasma hydrophile d'allylamine (ppAA).

Figure 17. Schéma du dispositif de mesure de l'angle de contact.

Figure 18. Principe de fonctionnement de la microscopie à force atomique. (a) Courbe des forces intervenant sur la pointe de l'AFM, (b) Schéma du dispositif de mesure.

Figure 19. Schéma de principe d'un appareil XPS, composé de (1) tube à rayons X, (2) échantillon dans une chambre sous ultravide, (3) système de focalisation électronique ; (4) spectromètre analyseur, (5) détecteur à électrons (*channeltron*) et (6) un système d'acquisition et de traitement des données.

Figure 20. Schéma du principe de fonctionnement de la spectroscopie UV-visible.

Figure 21. Dispositif d'analyse de la réaction enzymatique sur support solide par spectrofluorométrie.

Figure 22. Signaux produits par interaction d'un électron primaire avec l'échantillon.

Figure 23. Réactions de la fluo-rescamine avec différents nucléophiles.

Figure 24. Dérivation chimique des amines primaires par le nitrobenzaldehyde.

Figure 25. Propagation des champs électrique et magnétique sur les lignes coplanaires (CPW).

Figure 26. Schéma des lignes de transmission coplanaires (CPW) avec la ligne de Goubau (GL) sous les pointes de l'analyseur de réseaux vectoriel (VNA). En pratique, les pointes du VNA sont déposées sur les deux extrémités de la ligne de transmission. L'analyse d'un échantillon se fait par son introduction dans un microcanal (μC) qui traverse la ligne de transmission THz.

Figure 27. Schéma représentant le comportement du film d'allylamine en milieu aqueux.

Figure 28. Graphe de l'évolution de la perte de matière après hydratation du ppAA ainsi que la densité des fonctions amines en fonction de la puissance RF injectée dans le réacteur plasma.

Figure 29. Images en microscopie électronique à balayage de nanofils de silicium avant (a1, a2) et après (b1, b2) fonctionnalisation par le polymère plasma d'allylamine (Coll. Gaëlle Piret, IRI).

Figure 30. Images AFM en phase de nanofils de silicium avant (a) et après (b) fonctionnalisation par une couche mince de 25 nm du polymère plasma d'allylamine (Coll. Gaëlle Piret, IRI).

Figure 31. Détection des amines par microscopie à fluorescence. (a) spectres brut du niveau de fluorescence de deux échantillons d'épaisseurs différentes. (b) Evolution de la fluorescence en fonction de l'épaisseur du film analysé.

Figure 32. (a) Evolution de la densité des fonctions $-NH_2$ en fonction de l'épaisseur des films analysés. (b) Courbe d'étalonnage de la densité des groupements $-NH_2$ en fonction de l'intensité de fluorescence.

Figure 33. Représentation moléculaire de la trypsine. En rouge, les terminaisons amines des résidus lysines par lesquels l'enzyme est liée d'une manière covalente à la surface. En bleu, le site actif impliqué dans la réaction de biocatalyse. Cette représentation a été générée par le logiciel libre VMD (*Visual Molecular Dynamics*).

Figure 34. Images AFM d'une monocouche de trypsines immobilisées sur un support de silicium fonctionnalisé par un polymère plasma d'allylamine. Les molécules de trypsine ($4.9nm \times 3.9nm \times 3.3nm$) semblent se stabiliser en formant des motifs en "pétales florales". La bosse blanche sur le coté inférieur-gauche de l'image est une superposition rare d'une vingtaine de protéines au même endroit.

Figure 35. Exemples d'une représentation de Michaelis-Meten (a) et d'une représentation de Hanes-Woolf. Cette dernière permet de déterminer graphiquement les paramètres cinétiques (K_m et V_m).

Figure 36. Influence des différentes solutions et tampons utilisés sur la fluorescence enregistrée. Conditions de mesure : $[BA-AMC]=1mM$, $[Trypsine]=60\mu g/ml$, Tampon à pH 8, $T^\circ=22^\circ C$.

Figure 37. Courbe d'étalonnage de l'hydrolyse de BA-AMC par la trypsine sans (a) et avec un support Si (b) ou Si-ppAA (b) dans la cuvette d'analyse.

Figure 38. Représentation de Michaelis-Menten pour la trypsine libre vs. Trypsine immobilisée.

Figure 39. Représentation d'Hanes-Woolf pour la trypsine libre vs. Trypsine immobilisée.

Figure 40. Détecteur THz sur puce. (a) Photographie du détecteur composé d'une ouverture, une couche jouant le rôle d'une sonde et un film mince jouant le rôle de détecteur. (b) Schéma de la propagation du champ électromagnétique à travers le dispositif.

Figure 41. Schéma d'un nanodétecteur THz. Les parties grise et verte sont composées de nanofils capables de détecter les radiations THz émises par un objet cible.

Figure 42. Schéma représentant les modes vrais de la dynamique moléculaire et leurs échelles de temps dans une biomolécule.

Figure 43. Couche(s) d'hydratation d'une biomolécule en milieu aqueux. Les flèches noires représentent la dynamique des molécules d'eau et des liaisons hydrogène de l'une des couches [19](modifiée).

Figure 44. Evolution du nombre de publications scientifiques concernant les plasmas atmosphériques depuis l'année 2000. La recherche a été réalisée sur la banque de données « *Science Direct* » (axe de gauche) et le journal *Plasma Processes and Polymers* (axe de droite), pour tous les articles dont le titre contient les mots «*atmospheric*» et «*plasma*».

Remerciements

Au terme de ce travail, je désire tout d'abord adresser mes profonds remerciements à mes trois directeurs de thèse: les professeurs Didier Guillochon, Philippe Supiot et Bertrand Bocquet, de m'avoir si chaleureusement accueilli dans leurs équipes, d'avoir mis à ma disposition les moyens et l'encadrement nécessaires à l'aboutissement de mes idées, et de m'avoir accordé beaucoup de liberté dans la gestion de mon agenda de travail. Une pensée particulière à Bertrand qui a été le premier à me faire confiance en me proposant ce sujet de thèse.

Mes remerciements vont également aux directeurs des trois laboratoires: IEMN, GÉPIFRÉM et ProBioGEM qui m'ont accueilli dans leurs structures. La proximité de ces trois sites a été cruciale pour la réussite de ce travail interdisciplinaire. Plusieurs expériences ont nécessité un ou deux déplacements à chacun des trois laboratoires le même jour.

Je remercie sincèrement les professeurs Farzaneh Arefi-Khonsari et Loïc Blum pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'être rapporteurs de ce travail. Je suis également honoré par l'acceptation du professeur Alain Cappy et des docteurs Pascal Colpo et Philippe Leveque d'être membres du jury et examinateurs de ce mémoire.

Un Grand Merci à mes co-encadrants: le Prof. D. Vercaigne-Marco, le Dr N. Bourzegui, le Dr. C. Vivien, et une reconnaissance particulière aux ex-étudiants qui ont largement contribué à ma formation. Je pense notamment à Vianney Mille (MCF à Paris), Sami Abou-rich (Post-doc en Belgique) et Anthoney Treizebré (MCF à Lille). Un souhait de réussite à Simon qui vient d'arriver dans l'équipe M²T.

Je n'oublierai certainement pas de remercier les techniciens, ingénieurs et chercheurs des trois laboratoires, particulièrement: C. Dupret, C. Foissac, B. Mutel et surtout Christian Malas dont la gentillesse et l'extrême disponibilité m'ont profondément marqué. Merci mec!

De l'IEMN, je citerai avec gratitude pour leur aide, leur expertise et leur sympathie: C. Boyaval (MEB), S. Godey (XPS), D. Deremes (AFM), C. Legrand (chimie), E. Delos et S. Lepillet (Carac), D. Guerin et S. Lenfant (NCM) et R. Ringot.

Un grand merci à mes amis qui ont su me laisser suffisamment de temps libre pour rédiger mes articles et ma thèse, mais pas assez pour m'ennuyer. Je pense particulièrement à Amar et Akli qui venaient de temps à autre m'arracher à mon PC pour quelques moments de distraction.

Enfin, j'adresse mes remerciements mais surtout mes excuses à ma femme et bien aimée Sylvia, qui a supporté pendant trois ans mes nuits blanches devant l'ordinateur qu'elle appelle désormais «ma seconde femme». Je lui dédie ce travail, ainsi qu'à ma sœur, mes frères et mes très chers parents.

Au-delà du travail collaboratif, il est primordial dans la recherche interdisciplinaire d'avoir des scientifiques munis d'un bagage multiculturel, capables de joindre les besoins d'une science aux solutions offertes par les autres disciplines. Dans plusieurs cas, la solution est déjà disponible, c'est juste un problème de visibilité.

Le processus de recherche scientifique, particulièrement dans le domaine interdisciplinaire devrait se faire avec une plus grande flexibilité par rapport aux objectifs assignés. Autrement dit, la recherche serait beaucoup plus fructueuse si le chercheur accepte de découvrir autre chose que ce qui a été visé au départ. L'histoire des sciences nous apprend que souvent les découvertes «parallèles» sont beaucoup plus importantes que l'objectif originel. Il est tout à fait évident que pour permettre une telle approche de la recherche, l'évaluation d'un projet scientifique, principalement académique, devrait se focaliser moins sur le nombre d'objectifs atteints et plus sur le nombre de problèmes résolus.

La vocation première de l'interdisciplinarité n'est pas de devenir une discipline scientifique en soi mais de permettre l'émergence de nouvelles disciplines. Du point de vue évolutif, la recherche interdisciplinaire commence par une collaboration de plusieurs compétences et un échange de services à distance. Elle évolue ensuite vers un élargissement de la culture scientifique de chaque spécialiste impliqué et la réunion des moyens sur un même site. Enfin, elle aboutit à l'éclosion d'une nouvelle discipline qui ne nécessite plus de collaboration mais de spécialisation. La microfluidique et les BioMEMS n'en sont que des exemples.

A.A