



**HAL**  
open science

# Étude et réalisation de nanostructures photoniques à base de silicium poreux chimiquement fonctionnalisé en vue d'une application biocapteur

Mohamed Dribek

► **To cite this version:**

Mohamed Dribek. Étude et réalisation de nanostructures photoniques à base de silicium poreux chimiquement fonctionnalisé en vue d'une application biocapteur. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Rennes 1, 2010. Français. NNT: . tel-00576609

**HAL Id: tel-00576609**

**<https://theses.hal.science/tel-00576609v1>**

Submitted on 14 Mar 2011

**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.

N° d'ordre : 2010REN1E002

ANNÉE 2010



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Physique*

**Ecole doctorale Sciences de la Matière**

présentée par

**Mohamed DRIBEK**

préparée dans l'unité de recherche n°6082 FOTON  
Laboratoire des Fonctions Optiques pour les Technologies de l'information  
Groupe Matériaux Nanostructurés et Photonique

---

**Etude et réalisation  
de nanostructures  
photoniques à base  
de silicium poreux  
chimiquement  
fonctionnalisés en vue  
d'une application  
biocapteur**

**Thèse soutenue à LANNION  
le 10 décembre 2010**

devant le jury composé de :

**Jean-Claude SIMON**

Professeur à l'Université de Rennes 1, ENSSAT  
Lannion, FOTON CNRS UMR 6082 / *président*

**Rabah BOUKHERROUB**

Directeur de Recherche - CNRS, Institut de recherche  
interdisciplinaire IRI-IEMEN / *rapporteur*

**Tijani GHARBI**

Professeur à l'Université de FrancheComté, Institut  
FEMTO-ST UMR 6174 / *rapporteur*

**Pierre CHAMINADE**

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris XI,  
Groupe de chimie analytique EA n°4041 / *examineur*

**Bruno FABRE**

Directeur de Recherche à l'Université de Rennes 1,  
MaCSE CNRS UMR 6226 / *examineur*

**Lazhar HAJI**

Professeur à l'Université de Rennes 1, IUT Lannion,  
GMNP-FOTON / *directeur de thèse*



# Table des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>5</b>
<b>1 Les biocapteurs : Etude bibliographique</b>	<b>9</b>
1.1 Définition d'un biocapteur . . . . .	10
1.2 Les biorécepteurs . . . . .	11
1.2.1 Biorécepteurs enzymatiques . . . . .	12
1.2.2 Biorécepteurs d'affinité . . . . .	13
1.2.3 Biorécepteurs de synthèse . . . . .	16
1.3 Les transducteurs (technologies de biodétection) . . . . .	17
1.3.1 Transducteurs électrochimiques . . . . .	17
1.3.2 Transducteurs optiques . . . . .	19
1.4 Techniques d'immobilisation des biorécepteurs . . . . .	26
1.4.1 L'électropolymérisation . . . . .	26
1.4.2 La photopolymérisation . . . . .	27
1.4.3 La chimie douce . . . . .	28
1.5 Le silicium poreux et ses applications en biocapteurs . . . . .	37
1.5.1 Le silicium poreux . . . . .	37
1.5.2 Transduction optique sur nanostructures photoniques de silicium poreux pour la biodétection . . . . .	41
1.6 Application envisagée : Biocapteur optique de glucagon sur silicium poreux . . . . .	45
1.7 Conclusion . . . . .	47
<b>2 Moyens, conditions d'élaboration et techniques de caractérisation</b>	<b>51</b>
2.1 Élaboration et biofonctionnalisation des monocouches de silicium poreux . . . . .	51
2.1.1 Anodisation électrochimique . . . . .	52
2.1.2 Biofonctionnalisation . . . . .	54
2.2 Caractérisation morphologique du silicium poreux . . . . .	57
2.2.1 Contexte . . . . .	57
2.2.2 Etude de la morphologie et de la taille des pores . . . . .	58
2.2.3 Surface spécifique . . . . .	62
2.2.4 Détermination de la Porosité . . . . .	64
2.3 Techniques de caractérisation chimique du silicium poreux pour le suivi de la fonctionnalisation . . . . .	68
2.3.1 Méthode par modélisation du spectre de réflectance . . . . .	69
2.3.2 Autres techniques de caractérisation chimique du silicium poreux . . . . .	70
2.4 Conclusion . . . . .	79

<b>3</b>	<b>Simulation de spectres de réflectance de structures optiques à base de silicium poreux</b>	<b>81</b>
3.1	Introduction . . . . .	81
3.2	Application du formalisme des matrices de transfert dans une structure à base de silicium poreux constituée d'une seule couche . . . . .	81
3.3	Application du formalisme des matrices de transfert dans une structure multicouche à base de silicium poreux . . . . .	83
3.3.1	Principe . . . . .	83
3.3.2	Miroir de Bragg . . . . .	84
3.3.3	Microcavité . . . . .	87
3.4	Modèle de Bruggeman . . . . .	89
3.5	Détermination de l'indice de réfraction d'un milieu effectif constitué de 6 éléments différents dans le cas de monocouches . . . . .	91
3.6	Etude des facteurs de mérite pour la fonctionnalisation de structures photoniques à base de silicium poreux . . . . .	94
3.6.1	Cas des monocouches de silicium poreux . . . . .	95
3.6.2	Cas des multicouches de silicium poreux . . . . .	96
3.7	Conclusion . . . . .	98
<b>4</b>	<b>Caractérisations physico-chimiques du silicium poreux pour la mise en oeuvre d'un procédé de biofonctionnalisation du matériau</b>	<b>101</b>
4.1	Mise en oeuvre du procédé de silanisation et biofonctionnalisation du silicium poreux monocouche . . . . .	102
4.1.1	Contexte . . . . .	102
4.1.2	Etude de la silanisation par immersion . . . . .	103
4.1.3	Etude de la silanisation par imprégnation . . . . .	109
4.2	Biofonctionnalisation du silicium poreux monocouche . . . . .	112
4.2.1	Protocole de biofonctionnalisation . . . . .	112
4.2.2	Résultats des caractérisations par spectroscopie RAMAN . . . . .	113
4.2.3	Résultats par réflectométrie . . . . .	115
4.2.4	Etude de la biofonctionnalisation d'une monocouche poreuse élaborée avec du Si de type N <sup>+</sup> dopé Sb ( $\rho = 10^{-2} \Omega.cm$ ) . . . . .	119
4.3	Biofonctionnalisation du silicium poreux multicouche structuré en microcavité . . . . .	125
4.3.1	Microcavité sur silicium de type P <sup>+</sup> . . . . .	126
4.3.2	Microcavité sur silicium de type N <sup>+</sup> . . . . .	128
	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>132</b>
	<b>Annexe : Publications et posters</b>	<b>138</b>
	<b>Table des figures</b>	<b>155</b>
	<b>Liste des tableaux</b>	<b>160</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>162</b>

# Introduction générale

De nos jours, la croissance exponentielle de la demande en dispositifs analytiques permettant une détection fiable, rapide et peu coûteuse de substances de diverses origines (biomédicales, alimentaires, synthétiques,..etc.) contribuent au développement important des travaux de recherche sur le sujet des biocapteurs. Dans cette optique, le groupe GMNP (Groupe de Matériaux Nanostructurés et Photonique) du laboratoire FOTON (Fonctions Optiques pour les Technologies de l'informatiON) qui développe depuis quelques années la technologie d'élaboration du silicium poreux, a décidé d'entreprendre cette thèse portant sur l'étude et la réalisation de nanostructures photoniques à base de ce matériau en vue d'une application biocapteur. Le contexte général de cette thèse est alors la réalisation de biocapteur optique à base de silicium poreux.

Disposant d'une structure à indice de réfraction modulable, une grande surface spécifique et une compatibilité avec les milieux biologiques, le silicium poreux peut être considéré comme un composant de choix pour une transduction optique dans un dispositif de biodétection directe. Consistant à transformer le phénomène biochimique résultant de l'interaction entre la sonde et l'analyte en un signal mesurable, cette transduction nécessite la préparation préalable de la surface interne du silicium poreux par des procédés chimiques de biofonctionnalisation. Initialement mis en place avec des surfaces planes et régulières, ces procédés chimiques se transposent de plus en plus vers des surfaces nanoconfinées dont l'accès et la caractérisation nécessitent des moyens technologiques plus adaptés. Ayant conscience de l'importance de la qualité de l'immobilisation des biorécepteurs dans la conception d'un biocapteur, nous avons, par ce travail, essayé d'apporter notre contribution dans la mise en oeuvre et le contrôle de procédés de biofonctionnalisation du silicium poreux. Ainsi, dans la perspective de développer une application de biodétection innovante, nous exposons dans ce manuscrit les études préliminaires que nous avons menées pour l'élaboration de structures nanophotoniques à base de ce matériau et la caractérisation de la chimie de sa surface.

Les objectifs de ce travail doctoral sont alors :

- Choix d'une application de biodétection innovante. Ceci revient à choisir un analyte pour lequel aucun biodétecteur n'a été développé à nos jours.

- Mise au point d'un procédé de biofonctionnalisation visant à fixer la sonde (biorécepteur correspondant à l'analyte choisi) à la surface du silicium poreux.
- Suivi et caractérisation de la chimie de surface de nanostructures photoniques à base de silicium poreux fonctionnalisé lors de son élaboration.

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous présentons une étude bibliographique sur les biocapteurs. Nous commençons par définir les biocapteurs. Puis, nous reportons les différents types de biorécepteurs et de transducteurs utilisés dans la conception de ces dispositifs analytiques. Nous nous intéressons plus particulièrement à développer les techniques optiques de biodétection. Ensuite, nous présentons les techniques générales d'assemblage des biorécepteurs aux matériaux transducteurs. Enfin, nous décrivons le silicium poreux ainsi que les nanostructures photoniques à base de ce matériau et leurs applications comme transducteurs optiques. A la fin de cette étude bibliographique nous définissons l'application de biodétection que nous avons choisie.

Le deuxième chapitre du manuscrit développe les moyens et les conditions d'élaboration et les techniques de caractérisation que nous avons employées pour la préparation du silicium poreux chimiquement fonctionnalisé. Dans ce chapitre, nous présentons dans un premier temps les conditions d'élaboration et de biofonctionnalisation des monocouches de silicium poreux. Dans un deuxième temps, nous exposons les résultats expérimentaux d'une étude morphologique visant à caractériser des monocouches du silicium poreux. En effet, pour mieux comprendre la structure nanométrique des pores constituant le silicium poreux et pour préparer ce matériau à accueillir des molécules organiques nécessaires à sa biofonctionnalisation, nous avons commencé nos expérimentations par une étude préliminaire portant sur la morphologie du silicium poreux (forme et taille des pores) après son élaboration par anodisation électrochimique. Enfin, nous décrivons les techniques de caractérisation chimique du silicium poreux que nous avons utilisées pour le suivi de la fonctionnalisation.

Le troisième chapitre est consacré à la simulation des spectres de réflectance de structures optiques à base de silicium poreux. Nous présentons au début de ce chapitre la méthodologie que nous avons adoptée pour la mise en place d'un programme permettant la modélisation de la réflectance d'une structure poreuse monocouche ou multicouche en partant des indices de réfraction. Nous décrivons le modèle que nous avons choisi pour relier ces indices à la composition du silicium poreux afin d'exploiter les déplacements des spectres de réflectance dans le suivi de la fonctionnalisation du matériau. Nous poursuivons ce chapitre par une étude sur les facteurs de mérite qui sont impliqués dans la réponse spectrale simulée après fonctionnalisation chimique des structures photoniques à base de silicium poreux monocouches et multicouches.

Enfin, le quatrième chapitre présente les résultats expérimentaux relatifs à la caractérisation physico-

chimique du silicium poreux pour la mise en oeuvre d'un procédé de biofonctionnalisation du matériau. Dans l'objectif d'évaluer le protocole de biofonctionnalisation que nous avons mis en place, nous avons suivi l'évolution de la réponse spectrale des monocouches poreuses par réflectométrie. L'ajustement des spectres théoriques simulés par le programme présenté dans le chapitre 3 aux spectres expérimentaux obtenus par analyse spectroscopique en réflectance de ces couches poreuses aux différentes étapes de sa préparation nous a permis dans un premier temps de déterminer leurs porosités et dans un deuxième temps de contrôler l'effet des premières étapes de fonctionnalisation telles que l'oxydation thermique et la silanisation.

Pour la silanisation, deux protocoles, l'un par immersion et l'autre par imprégnation, ont été testés. Les épaisseurs des couches de silane ainsi que les taux de recouvrement des surfaces traitées ont été estimés et reliés à l'efficacité des protocoles à greffer des monocouches homogènes et organisées. En se basant sur ces résultats, nous avons fixé les conditions finales de silanisation. Nous avons par la suite complété la fonctionnalisation de la couche poreuse par un agent de couplage glutaraldéhyde et de l'albumine selon un procédé chimique communément utilisé dans la littérature scientifique. L'efficacité de ce protocole à greffer des espèces biologiques dans le volume poreux a été vérifié par Raman, puis par réflectométrie sur des anticorps spécifiques. Le taux de recouvrement de la surface poreuse en éléments de reconnaissance moléculaires (anticorps) a été estimé et comparé aux résultats obtenus par d'autres études sur des surfaces planes.

Des études complémentaires utilisant le couplage d'un appareil MEB à un spectromètre à dispersion d'énergie (EDX) et la spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) pour la caractérisation physico-chimique du matériau lors de la mise en place du protocole de biofonctionnalisation sont aussi présentées dans ce chapitre.

Afin de confirmer les résultats obtenus sur les monocouches, nous avons conçu et élaboré des structures multicouches (microcavités) et suivi leur fonctionnalisation par réflectométrie.

Enfin, nous donnons une conclusion de ce travail, et ouvrons des perspectives pour les travaux à venir.



# Chapitre 1

## Les biocapteurs : Etude bibliographique

La notion de biocapteur n'est pas récente, elle est même aussi vieille que l'apparition de la vie sur terre. En effet, tous les organismes vivants possèdent naturellement des capteurs qui leur permettent d'interagir avec leur environnement. Malgré la diversité des phénomènes et des substances à détecter, la nature a produit tous les capteurs nécessaires pour les détecter. Par exemple, les vers de terre possèdent des mécanorécepteurs et des propriocepteurs qui leur permettent de détecter respectivement les stimuli mécaniques et les pressions hydrostatiques. Il existe aussi d'autres récepteurs naturels chez les animaux pour détecter la température, la lumière, les odeurs, les phéromones et de nombreuses substances chimiques. Chacun de ces systèmes de détection est constitué d'un ensemble de récepteurs moléculaires et/ou de cellules qui sont liés à une cascade biochimique (série de réactions biochimiques) très complexe dont l'activation entraîne une réponse macroscopique appropriée. Ces systèmes de biodétection naturels sont caractérisés essentiellement par des sensibilités très élevées, pouvant atteindre l'unité moléculaire et une spécificité moléculaire bien définie (relative à l'espèce moléculaire, à la présence de certains groupements chimiques ou à la disposition stéréochimique de la molécule). Ils sont aussi rapides, biocompatibles et biodégradables. En essayant de transposer ces mécanismes naturels, les scientifiques ont fait de la biologie du vivant leur source d'inspiration essentielle dans les dernières décennies pour le développement de nouvelles technologies de plus en plus accessibles et robustes. Nous citerons parmi ces technologies, celle des biocapteurs qui se développent de plus en plus.

Les biocapteurs constituent une nouvelle classe de dispositifs analytiques. Ils représentent une voie prometteuse dans la recherche de techniques de détection de plus en plus spécifiques, rapides, sensibles et dans divers domaines d'applications : biomédical, agroalimentaire, énergétique, aérospatial, militaire, médicolegal ou encore sécuritaire.

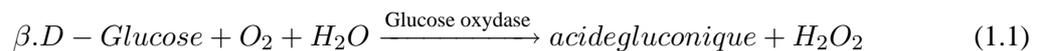
Avant de décrire l'application choisie pour étudier la biodétection optique sur silicium poreux, nous présentons dans ce chapitre une étude bibliographique sur les biocapteurs. Nous commençons par définir les biocapteurs. Puis, nous développons les différents types de biorécepteurs et de transducteurs utilisés dans la conception de ces dispositifs analytiques. Ensuite, nous présentons les techniques générales d'assemblage des biorécepteurs aux matériaux des transducteurs. La partie suivante définit

les différentes techniques optiques exploitées pour la biodétection. Enfin, nous décrivons le matériau qu'est le silicium poreux que nous avons utilisé ainsi que les nanostructures photoniques à base de ce matériau et leurs utilisations en tant que transducteurs optiques.

## 1.1 Définition d'un biocapteur

Le terme "Biocapteur" a été introduit dans la littérature scientifique à la fin des années 1970 suite aux travaux de Rechnitz [1] sur la détection sélective de l'arginine par une électrode  $\text{NH}_3$  à surface modifiée par des micro-organismes. Cependant, le premier dispositif reconnu aujourd'hui comme biocapteur a été introduit par Clark en 1956 [2] puis illustré par Clark et Lyons en 1962 [3]. Il était constitué de l'enzyme Glucose Oxydase (GO) piégée à la surface d'une électrode de platine par une membrane à dialyse en polyéthylène permettant la diffusion des substrats et des produits de la couche enzymatique.

L'électrode de platine est polarisée par une tension constante de 600 mV et le courant produit est proportionnel à la concentration d'oxygène ( $\text{O}_2$  dissout) de la solution. La consommation de l'oxygène par la réaction d'oxydation du glucose sous l'effet de l'enzyme glucose oxydase (équation 1.1) est donc mesurée par cette électrode.



Très peu de temps après, les études d'Updike et Hicks [4] sont apparues sur les électrodes enzymatiques, ensuite des travaux sur la détection biosélective se sont multipliés pour exploiter d'autres variantes de biocapteurs avec des applications de plus en plus innovantes. De nos jours, l'abondance des études sur les biocapteurs est essentiellement due aux collaborations entre scientifiques de différentes disciplines, à savoir des biologistes, des chimistes et des physiciens. En effet, du fait de sa composition qui rassemble des éléments biochimiques à un dispositif physique, le biocapteur peut être considéré comme un outil biophysique.

Actuellement, le biocapteur peut être défini comme un dispositif analytique intégrant des biorécepteurs et un transducteur permettant la qualification et/ou la quantification des interactions analytes/sondes. Les biorécepteurs (ou sondes ou éléments de reconnaissance moléculaire) ont pour rôle la fixation des analytes (substance à détecter) contenus dans l'échantillon à analyser. Ce dernier peut être pur (contenant que la substance à analyser) ou complexe (contenant des impuretés). Le transducteur assure la transformation du phénomène biochimique en un signal physique mesurable (figure 1.1). Comme toute méthode d'analyse, celle développée avec un biocapteur nécessite pour sa valida-

tion la détermination d'un certain nombre de paramètres caractéristiques tels que : la sélectivité, la spécificité, la répétabilité, la reproductibilité, la linéarité, la sensibilité, les limites de détection et de quantification, la robustesse et la justesse [5].

Dans la section suivante, sont présentés les différents types de biorécepteurs pouvant être utilisés dans la conception des biocapteurs.

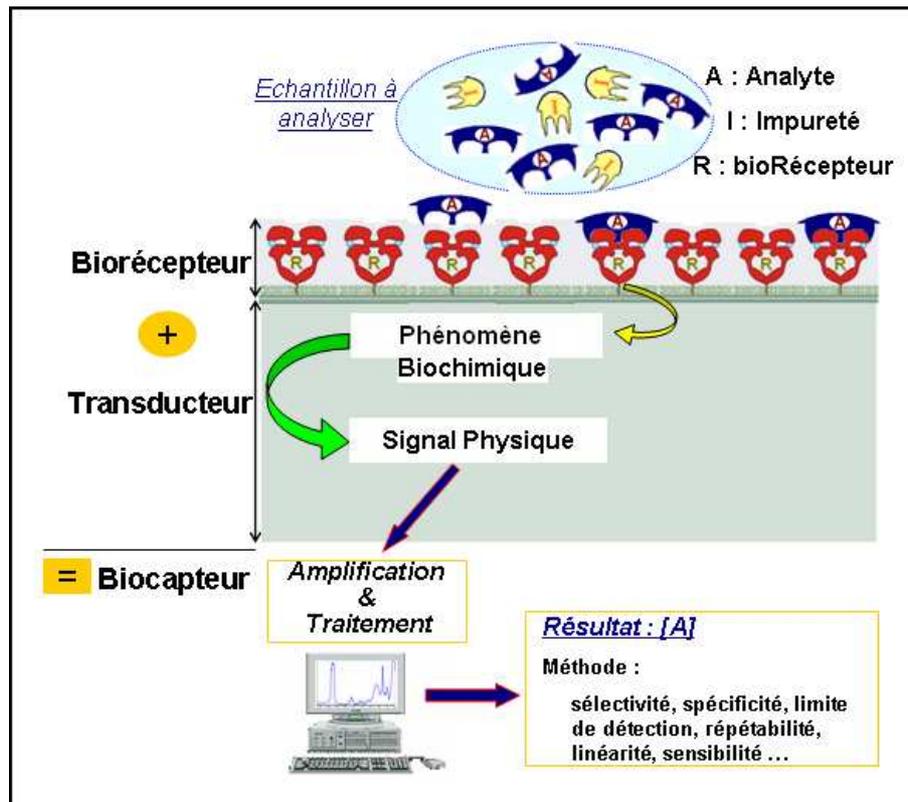


Figure 1.1 – Schéma général d'un biocapteur.

## 1.2 Les biorécepteurs

Le biorécepteur est un élément biologique de reconnaissance moléculaire. C'est un composant fondamental et caractéristique du biocapteur. En effet, la nature ainsi que la qualité de la sonde sont des facteurs déterminants dans le niveau de sélectivité et de sensibilité d'un dispositif de biodétection. Le choix du biorécepteur dépend généralement de la nature de l'analyte, de sa concentration ainsi que de la composition de l'échantillon à analyser. On distingue, généralement, trois groupes de biorécepteurs, les biorécepteurs enzymatiques, les biorécepteurs d'affinité et ceux de synthèse [6] que nous présentons ci-dessous.

### 1.2.1 Biorécepteurs enzymatiques

Ils sont aussi appelés biorécepteurs catalytiques. Ces biorécepteurs sont constitués d'enzymes. Il s'agit généralement de protéines possédant une activité catalytique positive. En effet, ces enzymes participent à certaines réactions biochimiques en augmentant les vitesses de transformation des substrats (analytes) sans être modifiés. Quand l'enzyme E est ultra-majoritaire dans le milieu, la réaction de transformation du substrat S (analyte) peut s'écrire comme ci-dessous :



avec  $k_1$  et  $k_2$  sont respectivement les constantes cinétiques des réactions de formation du complexe enzyme-substrat  $E \bullet S$  et de l'apparition du produit P.

Dans ce cas de biorécepteur, le transducteur doit être sensible au résultat de la réaction de transformation enzymatique de l'analyte (équation 1.2).

La biodétection enzymatique est conditionnée par la nature de l'analyte et la gamme de sa concentration dans le milieu à analyser. En effet, l'analyte doit d'une part constituer un substrat dans une réaction enzymatique et d'autre part être à une concentration comprise entre  $10^{-1}$  et  $10^{-7}$ M [7, 8, 9, 10]. Les enzymes sont classées, en fonction du type de réaction qu'elles catalysent, en six principaux groupes (tableau 1.1). Les oxydo-réductases sont des enzymes catalysant les réactions d'oxydo-réduction en transférant les ions  $H^+$  et des électrons. Une transférase est une enzyme dont le rôle est de catalyser le transfert d'un groupe fonctionnel (par exemple un groupe éthyle ou phosphate) d'une molécule (appelée donneur) à une autre (appelée accepteur). Les hydrolases constituent une classe d'enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse d'esters (estérases), de liaisons peptidiques (peptidases), et de liaisons osidiques (osidases). Une lyase est une enzyme qui catalyse la rupture de différentes liaisons chimiques par des moyens autres que l'hydrolyse ou l'oxydation. Une isomérase est une enzyme qui catalyse les changements au sein d'une molécule, souvent par réarrangement des groupements fonctionnels et conversion de la molécule en l'un de ses isomères. Une ligase est une enzyme qui catalyse la jonction de deux molécules par de nouvelles liaisons covalentes [11].

Enzymes	Oxydoréductases	Transférases	Hydrolases	Lyases	Isomérases	Ligases
Réactions	oxydoréduction	transfert d'un groupement fonctionnel	hydrolyse de liaisons	rupture de liaison	isomérisation	liaison de deux molécules

Tableau 1.1 – Différentes classes enzymatiques et les réactions biochimiques correspondantes [11].

Les enzymes de la classe oxydoréductases sont les plus impliquées dans les applications de bio-détection. Pour catalyser les réactions d'oxydo-réduction des substrats, ces enzymes sont associées à des molécules appelées "coenzymes d'oxydoréduction" telles que la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et la flavine adénine dinucléotide (FAD). L'application la plus connue est celle de la glucose oxydase pour mesurer la glycémie. Ce biocapteur a connu un développement très important dans les années quatre-vingts pour améliorer la performance de ces mesures [12, 13] et la réalisation de bandelettes pour l'auto-surveillance de la glycémie chez les patients du diabète [14, 15]. Durant la fin des années quatre-vingt et pendant les années quatre-vingt-dix, les efforts se sont concentrés d'une part sur l'amélioration de la qualité de l'électrode de mesure [16, 17] et d'autre part sur le développement de dispositifs implantables pour la mesure en continu de la glycémie [18, 19].

Après les oxydoréductases, les hydrolases sont les enzymes les plus exploitées pour des applications de biodétection enzymatiques [6]. Toutes les classes enzymatiques, à l'exception des ligases, ont été utilisées dans la conception de biocapteurs. Dans le tableau 1.2, sont présentés quelques exemples de biorécepteurs enzymatiques utilisés. Il est parfois nécessaire de combiner les actions de plusieurs enzymes dans un seul biocapteur. Ainsi, les substances (Produits P) dont la production a été catalysée par une enzyme E1 constituent les substrats pour une autre enzyme E2. Cependant, l'intégration de plusieurs classes enzymatiques dans une application de biodétection n'est pas sans conséquence sur la qualité de l'analyse. En effet, on remarque que la capacité de détection, exprimée en limite de détection (LD) dans le tableau 1.2, est d'autant plus faible que le nombre de réactions enzymatiques exploitées est élevé.

Classe enzymatique	Enzyme	Analyte	LD	Réf
hydrolase	hydrolase d'organophosphorés	paraoxon	16 nM	[20]
isomérase	protéine disulfide isomérase humaine	vincristine	ND	[21]
transférase + oxydoréductase	glycérol kinase glycérol-3-phosphate oxydase	ATP	200 nM	[22]
lyase + lyase + oxydoréductase	citrate lyase oxaloacétate décarboxylase pyruvate oxydase	acide citrique	15 $\mu$ M	[23]

*LD : Limite de détection. ND : Non Déterminé. ATP : Adénosine triphosphate.*

Tableau 1.2 – Exemples de biorécepteurs enzymatiques.

### 1.2.2 Biorécepteurs d'affinité

Contrairement au biorécepteur enzymatique, le biorécepteur d'affinité fixe l'analyte sans provoquer de réaction chimique. Ainsi, la liaison de l'analyte au biorécepteur est le seul phénomène biochimique à transformer par le transducteur en signal mesurable. La première catégorie de ces biorécepteurs est constituée d'éléments immunologiques qui sont les immunoglobulines et leurs dérivées. Les

biocapteurs utilisant cette catégorie de biorécepteurs sont souvent appelés immunocapteurs (immunosensors). Les immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines douées d'activité anticorps, c'est-à-dire capables de se lier spécifiquement à un déterminant antigénique unique appelé épitope [24]. Il existe cinq classes d'immunoglobulines : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE. Toutes les Ig, en dépit de leur très grande hétérogénéité, sont bâties sur un modèle de base commun, symétrique, celui de l'IgG monomère qui fut la première décrite [25, 26]. Leur poids moléculaire est d'environ 150 kDa (kiloDalton, le dalton est l'unité de masse des atomes en biochimie, 1 Da = 1 g/mol). Elles comportent toutes quatre chaînes polypeptidiques groupées en deux paires identiques de taille inégale (figure 1.2) [27, 28] :

- d'une part deux chaînes lourdes dites H, pour "heavy", d'environ 50 kDa chacune, soit 450 à 600 acides aminés.

- d'autre part 2 chaînes légères dites L, pour "light", d'environ 25 kDa chacune, soit 210 à 220 acides aminés.

Les chaînes légères sont unies aux chaînes lourdes par un pont disulfure très proche de leur extrémité carboxyterminale. Dans chaque immunoglobuline, existent deux sites de fixation d'antigène, ou paratopes, constitués chacun de l'association des régions VH (région variable "V" de la chaîne lourde "H") et VL (région variable "V" de la chaîne légère "L"). Les chaînes lourdes sont unies entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures au niveau de la région charnière. Cette région assure une flexibilité suffisante pour que les deux sites de liaison de l'antigène aient une bonne mobilité l'un par rapport à l'autre [24].

Les immunoglobulines ou anticorps et leurs fragments de fixation d'antigènes (Fab : fragment antigen binding) constituent les éléments de reconnaissance biologiques les plus adaptés à la biodétection d'analytes de concentrations comprises entre  $10^{-6}$  et  $10^{-10}$ M. Des anticorps polyclonaux et monoclonaux, des anticorps recombinants (obtenus par génie génétique), des anticorps obtenus par "phage display", des fragments "Fab", des fragments "scfv" (fragment variables simple chaîne) et des mini-anticorps (deux fragments scfv reliés) ont tous été exploités pour la biodétection [30, 31]. Quelques exemples d'application de certains de ces éléments sont présentés dans le tableau 1.3.

<b>Biorécepteur</b>	<b>Analyte</b>	<b>LD</b>	<b>Réf</b>
Anticorps monoclonal IgG1	Hormone chorionique gonadotrope	11,2 mUI/ml	[32]
Fragment Fab	Anticorps anti-pneumolysine	10 ng/ml	[33]
Fragment ScFv	Anticorps anti-IgG	2,3 nM	[34]
Ac recombinant	Protéine virale VIF du HIV-1	ND	[35]

*LD : Limite de détection. ND : Non Déterminé*

Tableau 1.3 – Exemples de biorécepteurs immunologiques.

La sensibilité et la spécificité de la biodétection aux moyens de ces éléments immunologiques dépendent normalement de trois paramètres qui sont : (i) la spécificité de l'interaction antigène-anticorps

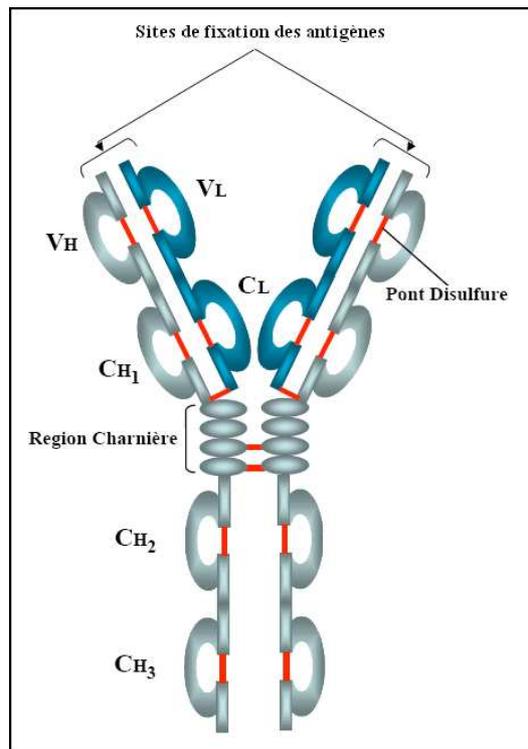


Figure 1.2 – Représentation schématique d'un anticorps [adaptée de [29]].

(plus précisément épitope-paratope), (ii) l'affinité du site de fixation de l'antigène pour le déterminant antigénique présent sur l'analyte, et (iii) le bruit de fond du capteur. En pratique, une forte affinité entre le site de fixation de l'antigène et l'analyte rend difficile la régénération du biorécepteur et donc l'usage multiple du dispositif [36].

La deuxième catégorie de biorécepteurs d'affinité est constituée de récepteurs physiologiques. Ces récepteurs sont des protéines localisées dans la membrane cellulaire, dans le cytoplasme ou dans le noyau cellulaire. Ils se lient spécifiquement à des substances appelées ligands (tels les neurotransmetteurs ou les hormones). Malgré les problèmes de stabilité in-vitro rencontrés avec ces éléments biologiques et la difficulté de les intégrer dans des dispositifs de biodétection, des récepteurs membranaires tels que les canaux ioniques ont été proposés pour la conception de biocapteurs d'affinité [37, 38]. En effet, l'utilisation du canal ionique "gramicidine A" contenu dans une membrane issue d'une souche bactérienne thermophile (résistant à des températures élevées) s'est avérée prometteuse [39]. Grâce à l'ingénierie biomoléculaire permettant la synthèse de canaux ioniques de plus en plus fiables, différentes applications de biodétection ont été étudiées [40]. D'autres éléments biomimétiques ont été synthétisés afin d'élargir les applications biocapteurs et de les adapter à la demande analytique actuelle. Dans le paragraphe suivant est présentée cette classe de biorécepteurs.

### 1.2.3 Biorécepteurs de synthèse

Dans l'objectif d'améliorer la rentabilité, d'augmenter la stabilité et de promouvoir l'industrialisation de dispositifs biocapteurs, des éléments biomimétiques et équivalents aux biorécepteurs naturels ont été synthétisés. Dans cette classe de biorécepteurs, on trouve les polymères à empreintes moléculaires ou MIPs (Molecularly Imprinted Polymers), les aptamères et les acides nucléiques peptidiques.

#### Les polymères à empreintes moléculaires

Cette catégorie de récepteur est formée par polymérisation autour d'une molécule servant de gabarit, qui est ensuite retirée [41]. Ce sont par essence d'excellents récepteurs pour les composés proches de ceux sur lesquels ils ont été moulés. Leur application est variée et concerne des analytes tels que des pesticides, des ligands biotinylés (marqué à la biotine), des métalloporphyrines, des stéroïdes, des polymères et des anticorps [42]. Cependant, des problèmes liés d'une part aux procédés de synthèse des polymères à empreintes moléculaires (élimination du gabarit) et d'autre part à l'efficacité de l'interaction récepteur-ligands (cinétique, sélectivité et affinité) limitent le développement de cette technologie innovante [6].

#### Les aptamères

Les aptamères sont des oligonucléotides sélectionnés à partir d'une banque aléatoire de séquences selon leur aptitude à reconnaître une cible. Des aptamères présentant des affinités et spécificités comparables à celles des anticorps pour des molécules variées (acides aminés, antibiotiques, motifs ARN ou ADN, protéines) ont été obtenus [43]. Durant les dix dernières années, l'application la plus étudiée en biodétection est celle d'un aptamère antithrombine [44]. Dernièrement, Centi et ses collègues [45] ont réussi à détecter la thrombine (protéine de la coagulation sanguine) à des concentrations sub-nanomolaires dans des milieux complexes. Actuellement, grâce à leur stabilité et leur régénération facile, les aptamères sont en concurrence avec les anticorps pour assurer la biodétection dans les biocapteurs.

#### Les acides nucléiques peptidiques (PNAs)

L'acide nucléique peptidique est un oligo-amide artificiel composé d'une répétition d'unités N-(2-aminoethyl)-glycine reliée chacune à une base nucléique par une liaison méthylène carbonyle. Il se fixe sur l'acide nucléique (ADN et ARN) de séquence complémentaire formant un complexe de stabilité très élevée [46]. Ce type de biorécepteur a un intérêt grandissant dans la conception de biocapteurs génomiques [47]. En 2003, Hahm et Lieber [48] ont réussi à détecter des séquences du gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane receptor gene) de la mucoviscidose à des concentrations

femtolaire ( $\sim 10fM$ ).

### Ligands de bas poids moléculaires

Conçus à partir de la structure cristallographique de leurs cibles, ces ligands ont été développés essentiellement pour améliorer les techniques chromatographiques de séparation des protéines. Aujourd'hui ces molécules organiques de bas poids moléculaire constituent une nouvelle alternative aux biorécepteurs naturels dans la conception des biocapteurs. En effet des molécules symétriques telles que le ligand triazinique spécifique à l'insuline recombinant M13 ont été obtenues et utilisées pour des applications de biodétection [49, 50].

## 1.3 Les transducteurs (technologies de biodétection)

Le transducteur est le composant d'un biocapteur qui détecte les changements physiques se produisant dans l'élément de reconnaissance moléculaire (biorécepteur ou sonde) suite à la liaison de l'analyte et les convertit en un signal de sortie qui peut être amplifié, affiché et sauvegardé. Pour cela un des paramètres physiques du transducteur doit être sensible soit directement à l'interaction physique analyte/biorécepteur ou à la présence du produit de l'interaction.

Il n'existe pas de classification officielle des transducteurs. Ils sont généralement désignés selon la nature du phénomène physique ou physico-chimique qu'ils exploitent pour la quantification des interactions analytes/biorécepteurs. On peut alors distinguer les transducteurs électrochimiques, mécaniques et optiques. Dans cette section nous nous intéressons particulièrement aux méthodes électrochimiques de transductions qui représentent le point de départ historique des biocapteurs ainsi qu'aux méthodes optiques qui constituent une direction prometteuse dans la conception de dispositifs analytiques plus performants.

### 1.3.1 Transducteurs électrochimiques

Les transducteurs électrochimiques sont ceux les plus utilisés et les plus décrits par la littérature. En effet l'histoire des biocapteurs a commencé il y a une quarantaine d'années par l'introduction du capteur enzymatique de glucose à transduction ampérométrique [3]. L'ampérométrie et la potentiométrie constituent les principales techniques électrochimiques de transduction.

L'ampérométrie repose sur la mesure d'un courant résultant de l'oxydation ou de la réduction d'une espèce électroactive au niveau d'une électrode de travail soumise à un potentiel constant. Plusieurs types de matériaux ont été exploités pour la fabrication de l'électrode, à savoir des métaux nobles, du graphite, des semiconducteurs, des polymères conducteurs électroniques, du papier et des sels conducteurs [6]. La quantité de charge (en coulombs) passant entre les deux électrodes, de travail et

de référence, est reliée à la quantité oxydée ou réduite de l'espèce électroactive au niveau de l'électrode de travail par la relation de Faraday (équation 1.3) :

$$n = \frac{Q}{zF} \quad (1.3)$$

Avec  $n$  : le nombre de moles de la substance transformée,  $Q$  ; la quantité de charge transférée en Coulombs,  $z$  : le nombre d'électrons transférés pendant la réaction d'oxydo-réduction et  $F$  : la constante de Faraday ( $96487 \text{ C.mol}^{-1}$ ).

La potentiométrie, technique électrochimique mesurant la différence du potentiel électrique entre deux électrodes à courant nul, est utilisée par les électrodes sélectives d'ions (ISE ; ion selective electrodes) tels que les électrodes de pH classiques. Ces électrodes, une fois recouvertes d'enzymes, peuvent devenir transductrices dans un biocapteur potentiométrique. Par exemple, un biocapteur pour le dosage de l'azote uréique sanguin a été développé en utilisant une électrode sélective d'ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) à membrane PVC (chlorure de vinyle) recouverte d'uréase et la nonactine en tant qu'ionophore [51]. Ultérieurement, les électrodes sélectives d'ions ont été miniaturisées grâce aux technologies de microfabrication. Ainsi, ont été fabriqués les transistors à effet de champ sensibles aux ions (ISFET ; ion selective field effect transistor) [52]. La structure générale de ces transistors est constituée d'une couche d'oxyde thermique ( $\text{SiO}_2$ ) déposée sur un semi-conducteur (silicium) dopé (n ou p). La polarisation de ce semi-conducteur par rapport à l'électrode de référence est assurée par la solution conductrice dans laquelle le capteur est plongé (figure 1.3).

Les grilles de ces transistors ont été par la suite recouvertes d'enzymes (ENFET) ou d'anticorps

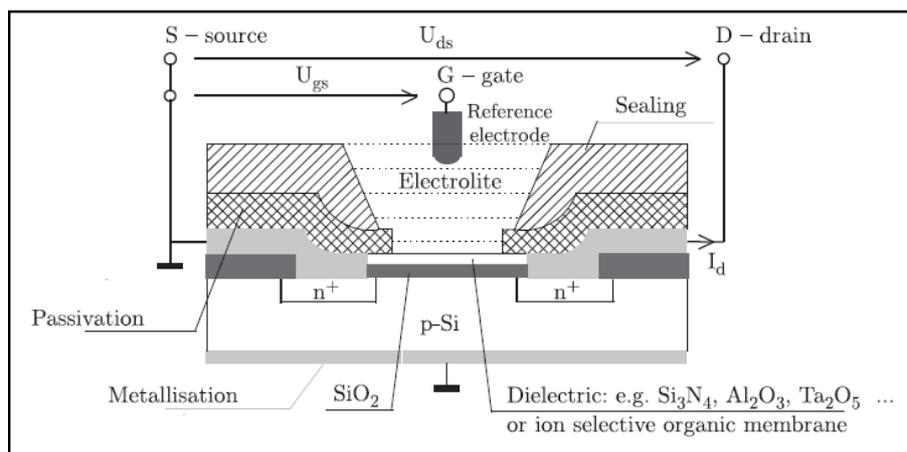


Figure 1.3 – Représentation schématique d'un transistor à effet de champ sensible aux ions [52].

(ImmunoFET) pour des applications de biodétection [53]. L'électrode potentiométrique a alors été proposée pour être utilisée comme une sonde de détection directe des interactions biomoléculaires par

le suivi de la variation de la densité de charge de surface entraînée par la formation des complexes ligand-substrat. Cependant, en pratique, ce concept s'est avéré difficile à appliquer. Les difficultés semblent être dues essentiellement à la résistance de charge interfaciale élevée et à l'effet de matrice. De ce fait, les travaux de recherche sur les bioFETs se sont focalisés sur les méthodes de fabrication des transistors, les mécanismes de transduction, la stabilité des membranes et leur fonctionnalisation ainsi que sur l'aspect biologique et en particulier la biocompatibilité, le pouvoir tampon et la durée de vie des enzymes.

### 1.3.2 Transducteurs optiques

Durant les dix dernières années, un grand intérêt a été accordé aux techniques optiques dans le suivi des phénomènes biochimiques exploités dans la biodétection. Plusieurs facteurs pouvant expliquer la place qu'occupe la transduction optique dans la recherche analytique, à savoir un succès historique de l'exploitation des phénomènes optiques dans le fonctionnement des appareils d'analyses chimiques et biochimiques mis sur le marché ainsi que des avantages primordiaux dans la conception des biocapteurs tels qu'un emploi non destructif, une aptitude à l'utilisation en milieu aqueux, une capacité d'effectuer des mesures cinétiques et de donner des résultats immédiats et de hautes sensibilités.

De nos jours, les techniques optiques nous offrent une large gamme de paramètres mesurables pour la biodétection. Comme présenté dans le tableau ci-dessous (tableau 1.4), dans la plupart des cas, chacune de ces techniques permet l'exploitation concomitante de plusieurs paramètres de mesures.

Technique	Paramètre mesuré
Ellipsométrie et polarimétrie	Etat de polarisation
Spectroscopie d'absorption	Intensité, spectre et dépendance de la polarisation
Diffusion élastique	Intensité, angle, longueur d'onde et dépendance de la polarisation
SPR*	Intensité, phase, position du pic et polarisation
Luminescence	Intensité, longueur d'onde, état de polarisation et durée de vie
Diffusion Raman	Intensité, position du pic et état de polarisation
Guide d'onde résonant	Intensité et fréquence de résonance
Onde évanescente	Profil du mode et son intensité
Interférence	Intensité et phase

\*SPR : Résonance Plasmonique de Surface

Tableau 1.4 – Techniques optiques et paramètres mesurables en biodétection.

Dans le cadre de développement d'un biocapteur optique, le choix d'une de ces techniques dépend de plusieurs paramètres dont le plus important est sans doute le type de matériau à utiliser pour la transduction. Ainsi l'avantage de pouvoir élaborer le silicium poreux avec une porosité (et donc un indice de réfraction) modulée nous a orienté vers le choix d'une des techniques de transduction

optique basée sur la variation d'indice de réfraction. Trois catégories de phénomènes optiques sont exploitées par ces techniques : l'interférométrie, la réflexion totale interne et la résonance plasmonique de surface. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'interférométrie qui semble permettre une biodétection plus sensible avec les matériaux poreux. Nous présentons donc dans la partie suivante les principales méthodes interférométriques utilisées pour la biodétection.

#### a. Interféromètre de Mach-Zehnder

L'interféromètre de Mach-Zehnder est une technique optique illustrée à la fin du dix-neuvième siècle et qui permet dans un premier temps la création de deux ondes lumineuses cohérentes à partir d'une même source de lumière et dans un second temps la recombinaison de ces ondes dans l'objectif de générer un phénomène d'interférence.

Dans les applications de biodétection, le dispositif fondamental d'un interféromètre de Mach-Zehnder est un guide d'onde par réflexion interne totale. La réflexion interne totale est un phénomène optique permettant le confinement de la lumière dans un milieu (coeur du guide) d'indice de réfraction supérieur aux indices des matériaux adjacents. Malgré cet effet de confinement, une partie de l'onde guidée se propage dans le milieu avoisinant le coeur. Cette partie de l'onde constitue le champ évanescent. Celui-ci est très sensible aux variations d'indice de réfraction du milieu externe, par exemple le superstrat, d'où son exploitation pour détecter la présence de molécules organiques d'indice supérieur à 1,4 dans ce milieu. Le guide d'onde d'un interféromètre Mach-Zehnder présente deux bras situés entre l'entrée et la sortie du guide [54]. Ainsi, ces deux bras forment à leurs extrémités deux jonctions Y appelées aussi "coupleurs 3 dB"

Un des deux bras est sélectionné pour accueillir la fenêtre de détection, site d'interaction moléculaire biorécepteur/analyte, et constitue le "bras de détection". Le deuxième bras constitue alors le "bras de référence" (figure 1.4).

Ainsi, la présence d'analyte au niveau de la fenêtre de détection entraîne l'augmentation de l'indice de réfraction du milieu superstrat et donc un déphasage  $\Delta\phi$  entre les modes d'ondes guidés se propageant dans chacun des bras. Ce déphasage est observé à la sortie du guide sous forme d'une variation d'intensité lumineuse pouvant être exprimée par l'équation 1.4 [54, 55].

$$\frac{I_S}{I_E} = \frac{1}{2}(1 + \cos\Delta\phi) \quad (1.4)$$

Avec :

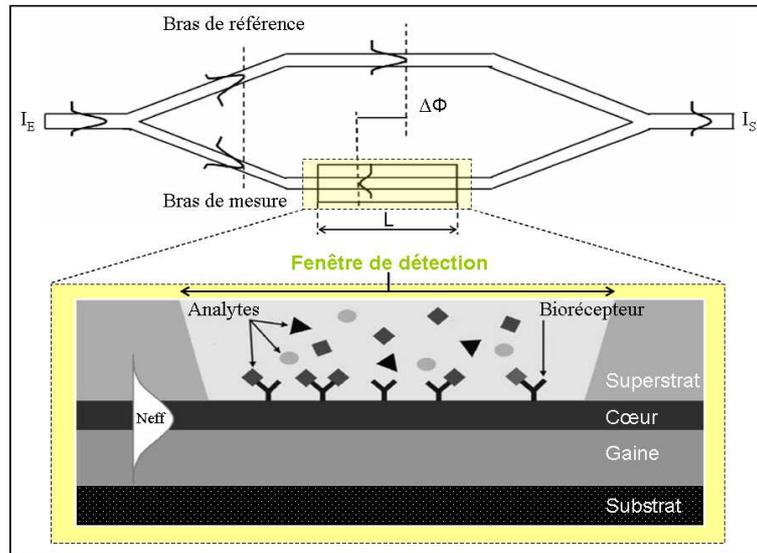


Figure 1.4 – Principe de l'utilisation de l'interféromètre Mach-Zehnder pour la biodétection.

$$\Delta\phi = \frac{2L\pi\Delta n}{\lambda} \quad (1.5)$$

Où  $I_E$  est l'intensité de la lumière à l'entrée de l'interféromètre et  $I_S$  à sa sortie,  $L$  est la longueur de la fenêtre de détection,  $\Delta n$  est la variation d'indice de réfraction effectif entraînée par l'interaction biorécepteur/analyte et  $\lambda$  est la longueur d'onde du champ lumineux.

La reproductibilité des résultats de biodétection par l'interféromètre Mach-Zehnder exige l'emploi de guides d'onde monomodes [54]. L'élaboration d'une telle structure optique nécessite des technologies de photolithographie et de dépôt de couches minces. Les matériaux utilisés pour la réalisation de ces structures sont généralement à base de silicium (Si, SiO<sub>2</sub>, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) [54, 55, 56, 57]. Des matériaux polymères tels que la résine photosensible SU-8 et le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) ont aussi été utilisés [58].

### b. Interféromètre de Young

Cette technique optique utilise les interférences de Young. Habituellement, ces interférences désignent en physique une expérience qui consiste à faire interférer deux faisceaux de lumière monochromatique issus d'une même source, en les faisant passer par deux petits trous (trous de Young) percés dans un plan opaque. Sur un écran disposé en face de ces fentes, on observe un motif de diffraction qui est une zone où s'alternent des franges sombres et brillantes. La disposition de ces franges dépend du déphasage acquis par les deux ondes. Comme pour l'interféromètre de Mach-Zehnder, l'application de l'interféromètre de Young à la biodétection nécessite l'utilisation d'un guide d'onde. Ce guide

présente lui aussi un coupleur 3 dB (jonction Y), cependant les bras de mesure et de référence ne se rejoignent pas et chacun d'entre eux présente une sortie indépendante (figure 1.5).

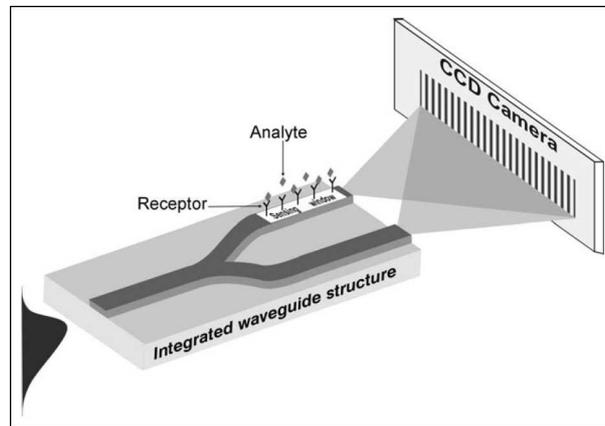


Figure 1.5 – Principe de l'utilisation de l'interféromètre de Young pour la biodétection [59].

Ainsi la lumière couplée à l'entrée du guide est divisée au niveau de la jonction Y en deux faisceaux parallèles confinés dans les deux bras de l'interféromètre. Un phénomène d'interférence est alors produit suite au chevauchement des parties divergentes des deux faisceaux sortants. Il en résulte un motif d'interférence qui sera enregistré par une caméra CCD placée à une certaine distance de la structure guidante. La présence d'analyte dans la fenêtre de détection entraîne un déphasage entre les ondes des bras de mesure et de référence. Le motif d'interférence présente un décalage d'amplitude proportionnelle à la variation de l'indice effectif du mode guidé dans le bras de détection [59].

Les travaux les plus avancés dans la conception et l'application de cette technique interférométrique pour la biodétection sont ceux d'Aurel Ymeti et son équipe [60]. Ces chercheurs sont parvenus à démontrer l'aptitude d'un biocapteur immunologique, développé sur un interféromètre de Young à quatre branches, à détecter trois substances différentes en même temps [60].

### c. Interféromètre de Hartman

Conçu par N. F. Hartman en 1997 [61], ce type d'interféromètre est constitué d'une couche guidante en nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) de  $140 \mu\text{m}$  d'épaisseur déposée par PECVD (Plasma-enhanced chemical vapor deposition) sur un substrat de verre BK-7. La couche de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  est recouverte par une première couche de silice ( $\text{SiO}_2$ ) de faible épaisseur (40 nm). Une deuxième couche de  $\text{SiO}_2$  plus épaisse (500 nm) est déposée sur toute la surface de la première à l'exception de deux zones rectangulaires identiques séparées d'une distance égale à 1 mm. Ces zones constituent les fenêtres de mesure et de référence et ont chacune 15 mm de longueur et 1 mm de largeur (figure 1.6).

Une lumière monochromatique générée par une diode laser est injectée dans l'interféromètre par l'intermédiaire de réseaux (gratings). Un objectif est utilisé pour focaliser les rayons lumineux à la

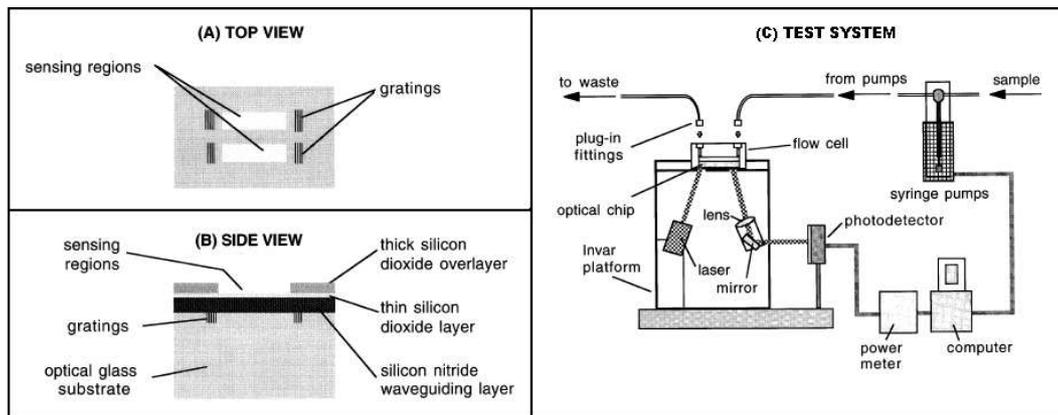


Figure 1.6 – Interféromètre de Hartman : (A) Vue de dessus, (B) coupe transversale et (C) schéma de l'ensemble de système de détection [62].

sortie des deux guides (de mesure et de référence) et les interférences des signaux sont transmises par le moyen d'un photodétecteur (figure 1.6(C)). Cette technique a permis à Schneider et ces collaborateurs [62, 63] de développer des applications de biodétections immunologiques de l'hormone chorionique gonadotrope (hCG), des influenza virus A et des bactéries *Salmonella typhimurium*.

Bien que les trois techniques optiques décrites ci-dessus (Mach-Zehnder, Young et Hartman) sont de conceptions différentes, les principes de leurs applications en biodétection sont similaires. En effet, avec les trois méthodes, la biodétection consiste à mesurer le déphasage que subit une onde lumineuse se propageant dans un guide d'onde suite à l'interaction de son champ évanescent avec la matière organique capturée par des biorécepteurs préalablement immobilisés au niveau de la fenêtre de détection. Ainsi les trois méthodes ont des performances similaires et présentent pratiquement les mêmes contraintes de conception. En particulier, toutes ces techniques nécessitent une longueur de fenêtre de détection assez importante. En conséquence, la taille de ces structures interférométriques est souvent de l'ordre de quelques centimètres [64].

#### d. Interférométrie par rétrodiffusion

Le principe de cette technique optique est de mettre en interaction une onde lumineuse cohérente et monochromatique avec une microstructure (un canal microfluidique par exemple) contenant les interactions moléculaires à détecter afin de sonder les variations instantanées de l'indice de réfraction du matériau de la structure ou de la solution qu'elle contient (figure 1.7). Cette méthode a été appliquée pour étudier des interactions biomoléculaires en solution ou en surface [65, 66]. L'utilisation de l'interférométrie par rétrodiffusion sur des tubes capillaires en silice fondue a permis de détecter des interactions moléculaires relatives à des variations d'indice de l'ordre de  $10^{-7}$  [67].

En plus de cette sensibilité remarquable, l'interférométrie par rétrodiffusion présente l'avantage d'utiliser des échantillons de volumes très réduits (nanolitres).

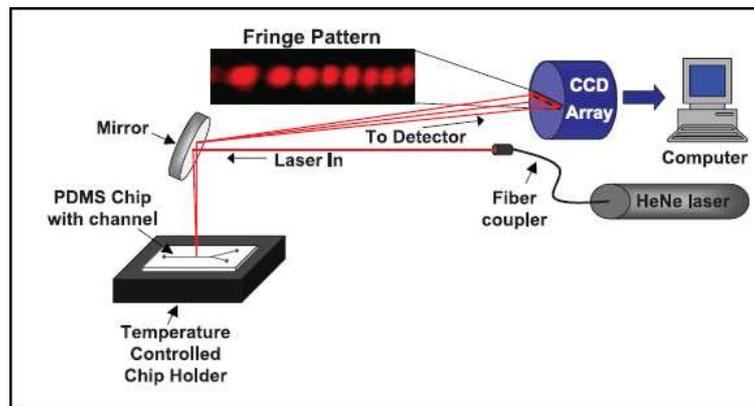


Figure 1.7 – Exemple d’application de l’interférométrie par rétrodiffusion pour la détection d’interactions moléculaires [65].

### e. Interféromètre de Fabry-Pérot

L’interféromètre de Fabry-Pérot est constitué de deux miroirs plans et partiellement réfléchissants, maintenus parallèles et séparés par une distance  $L$ . Entre ces deux miroirs est placé un milieu d’indice de réfraction  $n$  tandis qu’à l’extérieur des miroirs, l’indice est supposé égal à 1. Lorsqu’une onde électromagnétique est envoyée sur un Fabry-Pérot, elle subit des réflexions multiples entre les deux miroirs. Les ondes peuvent interférer constructivement ou destructivement suivant leurs déphasages relatifs, déphasages qui dépendent du rapport du chemin optique du Fabry-Pérot à la longueur d’onde de la lumière envoyée. Pour des applications de biodétection, les principales structures exploitées avec cette technique interférométrique, sont les fibres optiques et les nanostructures en silicium poreux. L’intégration d’un Fabry-Pérot dans une fibre optique peut se faire de plusieurs façons. Certains dispositifs biocapteurs ont été élaborés par l’insertion d’une pièce de fibre creuse entre deux morceaux de fibre optique ou entre deux réseaux de Bragg fibrés (figure 1.8 (A) et (B)) [68, 69]. Avec ces configurations, la réflectance de la lumière est sensible à la variation d’indice de réfraction à l’extrémité de la fibre. Avec d’autres configurations, une pièce de fibre optique conique a été insérée entre deux réseaux de Bragg fibrés [70] et c’est la section de la fibre de faible diamètre qui est sensible à la variation d’indice de réfraction (figure 1.8(C)).

La deuxième application biocapteur de l’interféromètre de Fabry-Pérot a été obtenue sur des structures multicouches en silicium poreux [71]. Ces structures sont couramment appelées "microcavités". En effet le silicium poreux élaboré par anodisation électrochimique est un matériau à indice de réfraction modulable. Il est donc possible de réaliser dans un substrat de silicium plusieurs couches poreuses superposées d’épaisseurs nanométriques et d’indices de réfraction variables d’une couche à l’autre pour obtenir une structure multicouche verticale. Une microcavité est constituée de deux miroirs de Bragg en vis à vis, séparés par une couche active d’épaisseur  $e_c$  et d’indice  $n_c$ . Avec le silicium poreux, un miroir est obtenu par l’empilement périodique d’un motif constitué par l’alternance

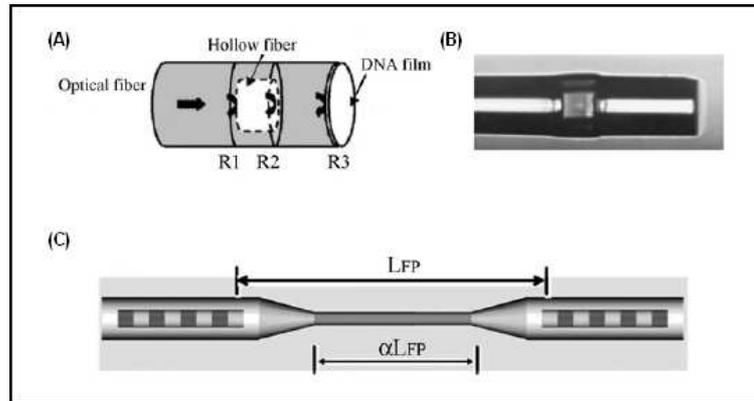


Figure 1.8 – Exemples de structures fibrées exploitant l'interférométrie de Fabry-Pérot pour la bio-détection [69, 70].

de deux couches d'indices optiques ( $n_1$  et  $n_2$ ) et d'épaisseurs ( $e_1$  et  $e_2$ ) différentes et répétés  $N$  fois. L'interférence des ondes lumineuses réfléchies par les interfaces séparant les couches poreuses d'une microcavité illuminée par la surface permet d'obtenir un spectre de réflectance caractéristique de cette structure. Ce spectre est constitué de deux bandes spectrales de réflectivités élevées séparées par un pic de résonance situé à une longueur d'onde spécifique (figure 1.9) et appelé "pic de Fabry Pérot" (mode de résonance). L'incorporation de molécules organiques dans cette structure poreuse entraîne des modifications des valeurs des indices des couches internes et donc un déplacement du mode de Fabry Pérot sur le spectre de réflectance [71].

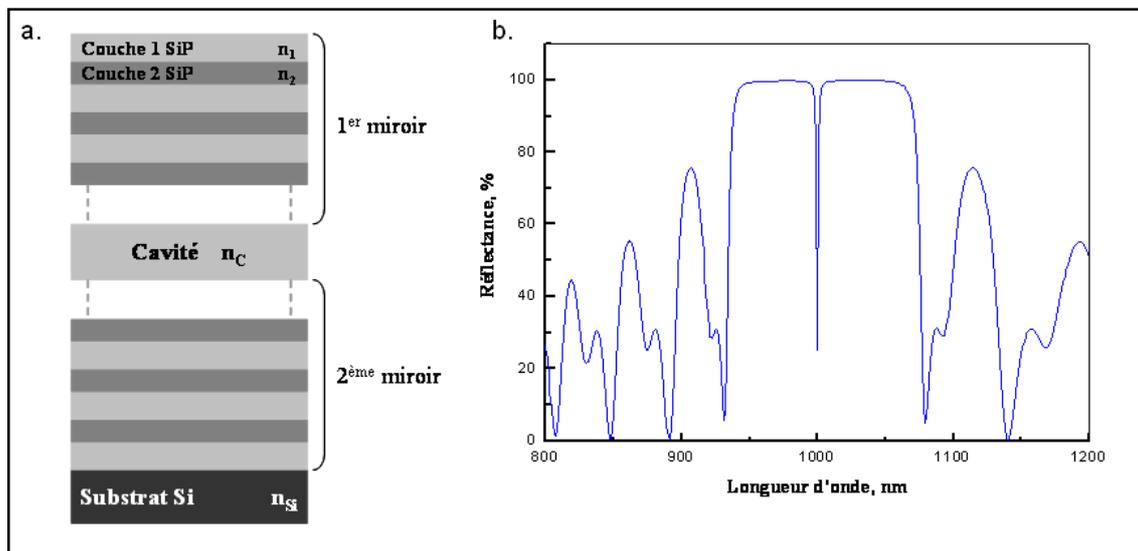


Figure 1.9 – a. Représentation schématique d'une coupe transversale d'un échantillon de silicium poreux structuré en microcavité. b. Spectre théorique de la réflectance en fonction de la longueur d'onde simulé pour une microcavité centrée à 1000 nm ( $n_1 = 1,22$ ,  $n_2 = 1,44$  et  $N = 15$ ).

Le Fabry-Pérot est pratiquement la seule technique interférométrique qui a exploité le silicium

poreux pour la biodétection. Il semble bien que cette technique optique soit la plus adaptée pour la conception de dispositifs biocapteurs à base de silicium poreux. En effet, la sensibilité de la détection des protéines sur des microcavités en silicium poreux est proche de celle obtenue avec un interféromètre de Mach-Zehnder à base d'un guide en oxy-nitride de silicium (tableau 1.5). En plus, et contrairement aux autres configurations (Mach-Zehnder, Young et Hartman), l'obtention d'une microcavité en silicium poreux ne nécessite pas d'étapes technologiques supplémentaires (comme la photolithographie pour réaliser des guides d'onde) souvent difficiles à reproduire.

Technique interférométrique	Limite de détection	référence
Mach-Zehnder	20 pg mm <sup>-2</sup>	[72]
Hartman	5 ng mL <sup>-1</sup>	[63]
Rétrodiffusion	0,1 ng mL <sup>-1</sup>	[73]
Fabry-Pérot	Fibre optique 25 μg mL <sup>-1</sup>	[68]
	Silicium poreux 50 pg mm <sup>-2</sup>	[71]

Tableau 1.5 – Sensibilités des techniques interférométriques pour la détection des protéines.

## 1.4 Techniques d'immobilisation des biorécepteurs

La liaison des éléments de reconnaissance (biorécepteurs) au transducteur est un facteur déterminant dans la conception d'un biocapteur. En effet, la qualité de cet assemblage biorécepteur-transducteur s'avère essentielle pour le bon fonctionnement du biocapteur, à savoir des utilisations faciles (ne demandant pas trop de manipulations), multiples (réutilisable), prolongées (longue durée de vie) et un faible coût économique [6]. Plusieurs procédés d'immobilisation de biomolécules sur des supports solides ont été développés depuis les années soixantes. Les mécanismes employés par ces procédés sont résumés dans le schéma de la figure 1.10.

Ils sont soit de nature physique impliquant des phénomènes de piégeage (rétention physique) tels que l'inclusion dans une matrice ou le confinement membranaire, soit de nature chimique par liaison au support ou réticulation. Les procédés les plus utilisés dans le domaine des biocapteurs sont l'électropolymérisation, la photopolymérisation et l'immobilisation par chimie douce. Nous décrivons ces trois procédés ci-dessous.

### 1.4.1 L'électropolymérisation

L'électropolymérisation est un procédé électrochimique de fabrication de film de polymère sur un substrat qui constitue l'électrode de travail, à partir d'une solution électrolyte contenant le monomère [76]. L'incorporation d'éléments biologiques dans l'électrolyte permet leur fixation à la surface de l'électrode.

Cette technique d'immobilisation a connu des avancées importantes ces dernières années et a suscité

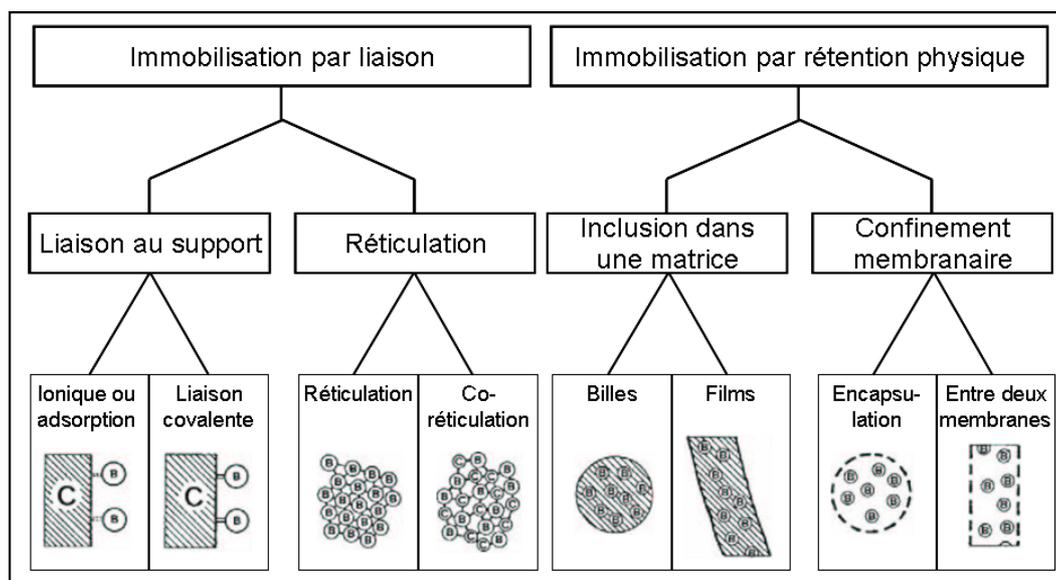


Figure 1.10 – Principales méthodes d'immobilisation des biorécepteurs [74, 75].

une attention considérable pour le développement des biocapteurs, particulièrement à transduction électrochimique. En effet, en faisant varier la nature du monomère, plusieurs approches ont été mises en place. Ainsi, des films de polymères électrogénérés de très bonne reproductibilité ont pu être élaborés [77]. La robustesse de la biodétection a aussi pu être améliorée d'une part par l'efficacité de la rétention physique des biorécepteurs au sein de ces films et d'autre part par l'établissement dans certains procédés de liaison covalente entre les monomères et les éléments de reconnaissance biologique.

#### 1.4.2 La photopolymérisation

Ce procédé consiste en une polymérisation ultra-rapide d'une résine sans solvant intervenant sélectivement dans les zones éclairées. Cette résine est dite "photoréticulable". Elle est constituée de monomères ou oligomères possédant plusieurs fonctions polymérisables, de photoamorceurs qui libèrent des espèces actives lors de l'exposition à la lumière (radicaux libres ou acides protoniques) ainsi que de biomolécules à immobiliser.

La photopolymérisation peut être conduite par l'une des deux approches suivantes : le photocouplage direct et la photo-déprotection. Lors du photocouplage direct, l'activation par des photons de certains groupements fonctionnels transforme les monomères qui les contiennent en intermédiaires hautement réactifs. Les groupements les plus utilisés dans la photoimmobilisation des biorécepteurs sont les phényle-azides, les phényle-diazirines et les benzophénones. Pour la photo-déprotection, les photons entraînent le détachement d'un groupement protecteur appelé "groupement photolabile" et donc l'apparition de la fonction réactive du monomère. Cette approche est largement utilisée dans la fabrication des puces à peptide [78].

L'électropolymérisation et la photopolymérisation sont des procédés d'immobilisation adaptés le plus

souvent pour la fixation des biorécepteurs sur des surfaces planes et régulières. Cependant, des procédés d'immobilisation issus de la chimie douce semblent avoir un spectre d'application plus large et permettent la biofonctionnalisation de surfaces nanoconfinées et/ou irrégulières comme celle du silicium poreux. Ainsi, nous développons dans la partie suivante les différentes possibilités chimiques offertes par ces procédés pour la fixation des biorécepteurs sur des surfaces inorganiques.

### 1.4.3 La chimie douce

La chimie douce est un concept qui s'inspire du vivant et a pour objectif la création de liaisons intermoléculaires fortes dans des conditions ambiantes. Contrairement aux procédés de polymérisation, la chimie douce permet de synthétiser des hybrides organo-minéraux sans aucun apport énergétique. Ainsi, la chimie douce nous permet d'immobiliser des molécules aussi fragiles que des enzymes, des anticorps et même des cellules vivantes au sein de matrices inorganiques. En effet, ces éléments biologiques disposent souvent de plusieurs groupements fonctionnels réactifs tels que des amines primaires ( $-NH_2$ ) et des fonctions acides carboxyliques ( $-COOH$ ) ainsi que des sites de fixation par affinité. Cependant, les surfaces inorganiques ne présentent naturellement aucune réactivité vis à vis de ces éléments. Pour cela, l'immobilisation par chimie douce des biorécepteurs à la surface d'un transducteur passe obligatoirement par une étape d'activation de cette surface. Les deux principaux procédés d'activation de surface sont la formation de monocouches auto-assemblées (SAM : self-assembled monolayers) de certains composés soufrés sur des surfaces métalliques et la silanisation des surfaces de verre ou de silice [79].

Ainsi, dans cette section nous présentons quelques caractéristiques de ces procédés d'activation de surface puis les différentes méthodes d'assemblage des biorécepteurs à ces surfaces.

#### a. Monocouches auto-assemblées (SAM)

L'auto-assemblage moléculaire est le phénomène par lequel des molécules forment par elles-mêmes des structures avec un haut degré d'organisation sans intervention externe. Ce phénomène se produit spontanément dans la nature, par exemple dans les cellules où la membrane est faite d'une double couche lipidique auto-assemblée. Par voies artificielles, des structures auto-assemblées ont pu être élaborées pour des applications diverses telles que le ciblage thérapeutique, la protection des surfaces contre la corrosion et la fonctionnalisation de matériaux inorganiques [80].

En biodétection, le phénomène d'auto-assemblage est essentiellement utilisé pour la conception de dispositifs à transduction électrochimique. Son application repose sur la grande affinité des atomes de soufre contenus dans des thiols ( $R-SH$ ), des thioéthers ( $R-S-R$ ) et des disulfures ( $R-S-S-R$ ) aux surfaces métalliques (or, platine, argent ou cuivre). Grâce à ses propriétés cristallographiques et sa stabilité, l'or est le matériau le plus utilisé avec ce procédé d'activation de surface. Le procédé consiste généralement à l'immersion de la surface à activer dans une solution de composés soufrés à température ambiante. Le processus de formation de la monocouche moléculaire suit une cinétique à deux phases. Une première phase d'initiation, pendant laquelle les molécules soufrées migrent vers la sur-

face métallique sous l'influence des interactions attractives générées entre les atomes de soufre et de métal. Ce phénomène, souvent appelé chimisorption, est spontané et ne dure que quelques minutes. Dans le cas de l'or, chaque atome de soufre s'adsorbe sur un site constitué de trois atomes de métal. La deuxième phase du processus correspond à l'organisation des molécules adsorbées les unes par rapport aux autres et vis à vis de la surface métallique. Le déroulement de cette phase est lent. Il est gouverné principalement par les interactions entre les chaînes alkyles des molécules adsorbées (interactions essentiellement de types Van Der Waals et électrostatiques). A la fin de cette phase, un film mince de matière organique est obtenu couvrant la surface métallique. La densité et l'organisation de cette couche de matière organique dépendent de plusieurs paramètres tels que l'état initial de la surface à traiter, de la concentration en agent actif (thiol, thioéther ou disulfure) de la solution appliquée, du choix du solvant ainsi que du temps de réaction. Malgré la diversité des travaux sur ce procédé d'activation de surface, il n'existe toujours pas de protocole standard pour l'obtention de monocouches auto-assemblées.

Toutefois, il est recommandé pour les applications de biodétection d'élaborer des monocouches auto-assemblées mixtes en utilisant deux composés soufrés à chaînes alkyles de longueurs différentes. Cette approche permet de baisser le niveau d'encombrement stérique entre les groupements fonctionnels permettant une orientation correcte de la couche auto-assemblée et une réactivité plus importante de la surface modifiée. Dans ce cas, le composé soufré à chaîne alkyle longue peut être initialement greffé au biorécepteur et la formation de monocouche autoassemblée mixte permet d'immobiliser directement la sonde à la surface du transducteur (surface métallique). Les travaux de T. H. Herne et M. J. Tarlov [81] illustrent bien l'avantage d'une telle procédure pour immobiliser des fragments d'ADN simple brin sur une surface d'or (Figure 1.11).

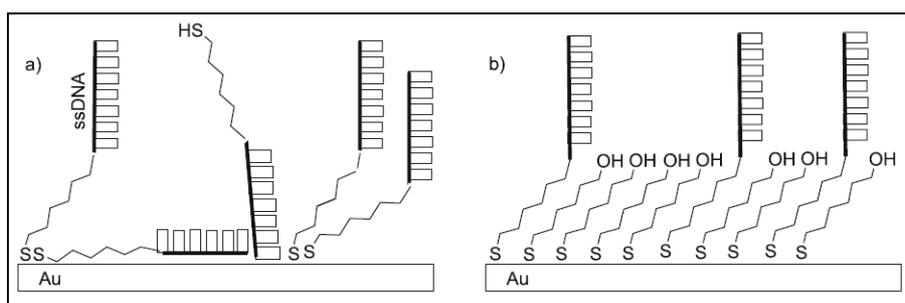


Figure 1.11 – Schémas des surfaces après auto-assemblage de monocouche pure (a) et mixte (b) pour l'immobilisation de fragments d'ADN simple brin [79].

## b. Silanisation

La silanisation est le deuxième procédé applicable par chimie douce afin d'activer des surfaces initialement inorganiques. Ce procédé a pour objectif de greffer des couches moléculaires de silanes à des surfaces de verre ou de silice hydroxylées. En effet, en solution les trialkoxysilanes ((RO)<sub>3</sub>-Si-

R'-Y) ainsi que les trichlorosilanes ((Cl)<sub>3</sub>-Si-R'-Y) réagissent avec les groupements hydroxyles (-OH) des silanols de surface selon les réactions illustrées sur la figure 1.12.

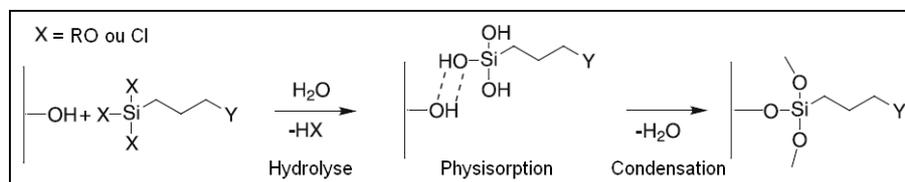


Figure 1.12 – Réactions mises en jeu lors de la silanisation [79].

La première réaction mise en jeu lors de la silanisation est l'hydrolyse des molécules de trialkoxysilane entraînant la formation de silanetriols ((HO)<sub>3</sub>-Si-R'-Y). Par phénomène de physisorption, ces derniers adhèrent à la surface traitée via des liaisons hydrogène formées entre les groupements hydroxyles. Enfin, des réactions de condensation se produisent entraînant d'une part la création de liaisons covalentes entre les silanes et la surface [79, 82] et d'autre part la polymérisation des silanes. Les trialkoxysilanes représentés dans la figure 1.13 sont les agents de silanisation les plus employés pour l'activation des surfaces de silice.

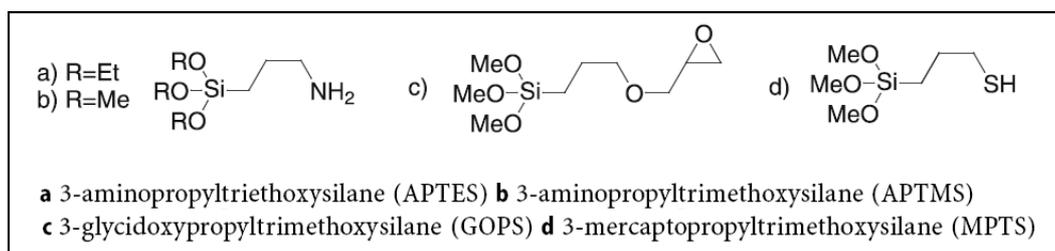


Figure 1.13 – Agents de silanisation majeurs dans l'immobilisation des biorécepteurs [79].

Ces alcoxysilanes permettent de greffer de courtes chaînes hydrocarbonnées (propyl) portant à leurs terminaisons les groupements fonctionnels amines (figure 1.13a et b), epoxy (figure 1.13c) ou thiol (figure 1.13d). L'organisation homogène en monocouche est plus difficile à atteindre avec ces courtes chaînes moléculaires qu'avec les longues chaînes des alkyltrichlorosilanes. A cette difficulté, s'ajoute le problème d'adsorption des groupements fonctionnels (surtout les amines des APTES et des APTMS) à la surface hydroxylée ainsi que la possibilité de formation d'agglomérats de polysilanes par réaction entre les alcoxysilanes au dépend de leurs fixations sur des sites hydroxyles libres. Malgré ces inconvénients, et pour des raisons de disponibilité (prêts à l'emploi), d'économie (bas coût) et de préparation (manipulation facile), les alcoxysilanes de courtes chaînes hydrocarbonnées sont largement utilisés dans la recherche et l'industrie. En effet, dans des conditions précises de concentration d'agent de silanisation, de type de solvant et de temps de réaction, il est possible d'obtenir des couches moléculaires assez homogènes de silanes à la surface des matériaux traités par ces alcoxysilanes. M. Hu et ses collaborateurs [83] ont étudié l'effet de la concentration de la solution de silanisation en

MPTS sur l'homogénéité de la couche de silane formée à la surface de silice traitée. Ils ont pu établir qu'il était impossible d'obtenir des monocouches organisées à des concentrations au dessus de  $5.10^{-3}$  M. Sur la figure 1.14, sont présentés les schémas des surfaces obtenues à la fin des procédés de silanisation au MPTS (3-mercaptopropyltriméthoxysilane) à des concentrations de  $5.10^{-3}$  M (Fig 1.14a),  $2.10^{-2}$  M (Fig 1.14b) et  $4.10^{-2}$  M (Fig 1.14c) montrant l'évolution du niveau d'irrégularité de la couche de silane en fonction de la quantité d'alkoxysilane utilisée.

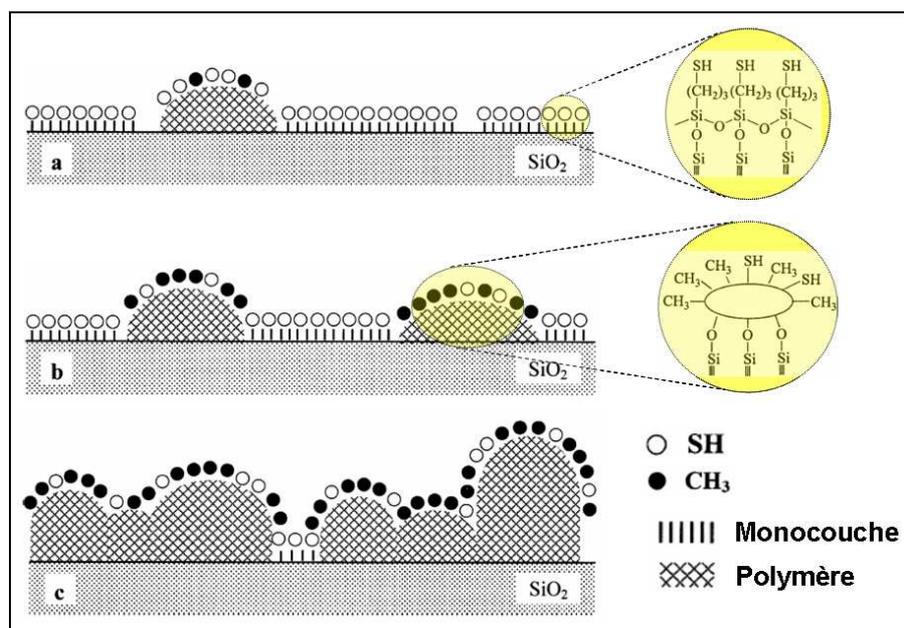


Figure 1.14 – Schémas des couches de silane formées à la surface d'une couche de silice correspondant à des concentrations de MPTS de  $5.10^{-3}$  M (a),  $2.10^{-2}$  M (b) et  $4.10^{-2}$  M (c) [83].

La maîtrise d'autres paramètres tels que la propreté de la surface à silaniser ainsi que son taux de recouvrement en groupement silanols (état de préactivation) favorise la formation de films monomoléculaires denses de silanes. Ainsi, un pré-traitement des surfaces à activer utilisant des solutions de nettoyage basiques et/ou acides est généralement préconisé avant l'étape de silanisation [84]. L'addition d'un agent de silanisation pegylé (fonctionnalisé avec du PEG ; polyéthylène glycol) aux alcoxysilanes classiques (Fig 1.13) ainsi que certaines méthodes de lavage de fin de procédé ont été proposées afin de réduire les phénomènes d'interaction intermoléculaires et donc améliorer la qualité du film de silane greffé [85]. Comme pour les monocouches auto-assemblées des thiols, et malgré les connaissances acquises sur l'activation des surfaces par silanisation, la littérature scientifique ne propose toujours pas de protocole standard de ce procédé de chimie douce. Au niveau des applications, la silanisation représente le procédé le plus exploité dans l'immobilisation des biorécepteurs à la surface des structures optiques de transduction. En effet, ces structures intègrent souvent le verre et la silice, matériaux prédestinés à la silanisation [79].

### c. Immobilisation des éléments de reconnaissance moléculaires aux surfaces activées

La chimie propose une liste assez large de méthodes de couplage des biomolécules aux surfaces activées [86]. Ces méthodes peuvent être répertoriées en trois classes selon le type de liaison que l'on souhaite créer entre les biorécepteurs et les surfaces fonctionnalisées des biocapteurs. On peut alors distinguer, (i) l'immobilisation par liaison covalente entraînant un greffage permanent de la sonde à la surface activée, (ii) la fixation par affinité et formation de complexes de type ligand-substrat entre les biorécepteurs et des sites spécifiques couvrant la surface activée et (iii) l'immobilisation par liaisons ioniques générées grâce aux phénomènes d'interactions statiques entre des groupements chargés des molécules biologiques et de la surface activée.

#### \* Immobilisation par des liaisons covalentes

Généralement, les biomolécules disposent à leurs surfaces de groupements fonctionnels réactifs leur permettant de se greffer par liaisons covalentes sur certaines fonctions chimiques activant la surface du transducteur. Ce greffage est immédiat lorsque les deux partenaires de la réaction présentent deux fonctions directement réactives l'une envers l'autre (amine avec aldéhyde, chlorométhyl ou époxy et époxy avec hydroxyle ou thiol). Dans le cas contraire (fonctions non réactives entre elles (carboxyl-amine ou amine-amine)), la méthode d'assemblage fait intervenir des agents de conjugaisons moléculaires dans des réactions supplémentaires. Ces agents agissent essentiellement de deux façons. La première consiste à faire évoluer la surface activée vers un état transitoire plus réactif pour pouvoir fixer les biomolécules par la suite. C'est ainsi qu'agissent les carbodiimides sur des surfaces carboxylées afin d'immobiliser des biomolécules par leurs fonctions amines ( $-NH_2$ ) (Fig 1.15).

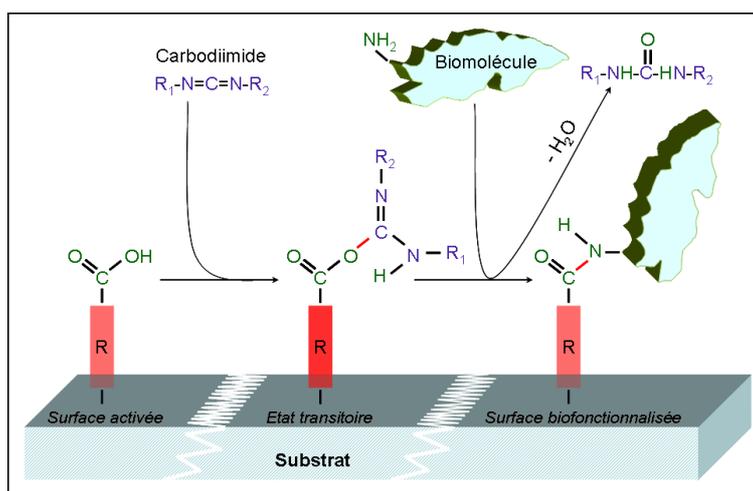


Figure 1.15 – Schémas des différentes étapes d'immobilisation des biomolécules via les carbodiimides.

La deuxième façon d'agir concerne des substances chimiques appelées "agents de couplage". Il s'agit de molécules de "pontage" capables dans un premier temps de se greffer d'une façon covalente

sur la surface activée et dans un deuxième temps d'accueillir les biomolécules et de les fixer. Un agent de couplage est souvent bifonctionnel, c'est à dire constitué d'une chaîne alkyl entre deux extrémités réactives. Quand les groupements fonctionnels constituant ces deux extrémités sont de même nature, l'agent de couplage est dit homobifonctionnel. Lorsque les deux fonctions sont différentes, l'agent est hétérobifonctionnel. Une liste de réactifs de couplage couramment utilisés, les longueurs de chaînes correspondantes ainsi que les groupements cibles sont présentés dans le tableau 1.6.

Agent de couplage	Fonctions couplées	Longueur de chaîne
Glutaraldéhyde	-NH <sub>2</sub> ...NH <sub>2</sub> -	7 Å [87]
1,4-phénylendiisothiocyanate	-NH <sub>2</sub> ...NH <sub>2</sub> -	7 Å [79]
Bis-imidates	-NH <sub>2</sub> ...NH <sub>2</sub> -	6 Å pour n=2 [88]
N-hydroxysuccinimide ester	-NH <sub>2</sub> ...NH <sub>2</sub> -	16,1 Å pour n=2 [79]
Sulfo-SMCC	-SH...NH <sub>2</sub> -	8,3 Å
GMBS	-SH...NH <sub>2</sub> -	7,3 Å
HSAB	-CH...NH <sub>2</sub> -	5,7 Å

Tableau 1.6 – Exemples d'agents de couplage bifonctionnels.

Les agents de couplage homobifonctionnels permettent alors de lier deux entités organiques différentes par les mêmes sites réactifs (généralement -NH<sub>2</sub>). La substance la plus utilisée de cette catégorie est le glutaraldéhyde (Fig 1.16-a). De structure très simple, cette molécule est constituée de deux groupements aldéhydes (-CHO) aux extrémités d'un alkane à cinq atomes de carbone. Le glutaraldéhyde se lie par ses extrémités aldéhydes aux biomolécules ainsi qu'aux surfaces aminées. D'autres exemples d'agent de couplage homobifonctionnels sont présentés sur la figure 1.16. Le 1,4-phénylendiisothiocyanate (Fig 1.16-b) est aussi une molécule qui lie les amines et elle est de taille comparable avec celle du glutaraldéhyde mais avec une structure cyclique et deux groupements réactifs isothiocyanates (-N=C=S). Les bis-imidates et les succinimide esters (Fig 1.16-c et d) sont deux familles de molécules avec des chaînes alkyls de différentes longueurs offrant ainsi la possibilité d'établir des pontages moléculaires de tailles plus importantes entre des partenaires organiques aminés.

Lorsque les sites fonctionnels à relier sont différents, un deuxième type d'agent de couplage appelé "hétérobifonctionnel" est utilisé. Le Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate) (Fig 1.16-e) est un agent de couplage disposant à ses extrémités un groupement N-hydroxysuccinimide ester (NHS) réactif avec les amines primaires (-NH<sub>2</sub>) à pH 7-9 et un groupement maléimide réactif avec les groupements sulfhydriles (-SH) à pH 6,5-7,5. Le GMBS (N-( $\gamma$ -maleimidobutyryloxy)succinimide ester) (Fig 1.16-f) assure aussi le pontage entre des fonctions amines et sulfhydriles. Souvent le couplage moléculaire avec cette substance commence par la fixation de l'élément aminé par l'extrémité NHS et la formation d'une liaison amide à pH 6,5-8,5. Par la suite, l'extrémité maléimide du GMBS réagit avec le groupement sulfhydrile pour créer une liaison

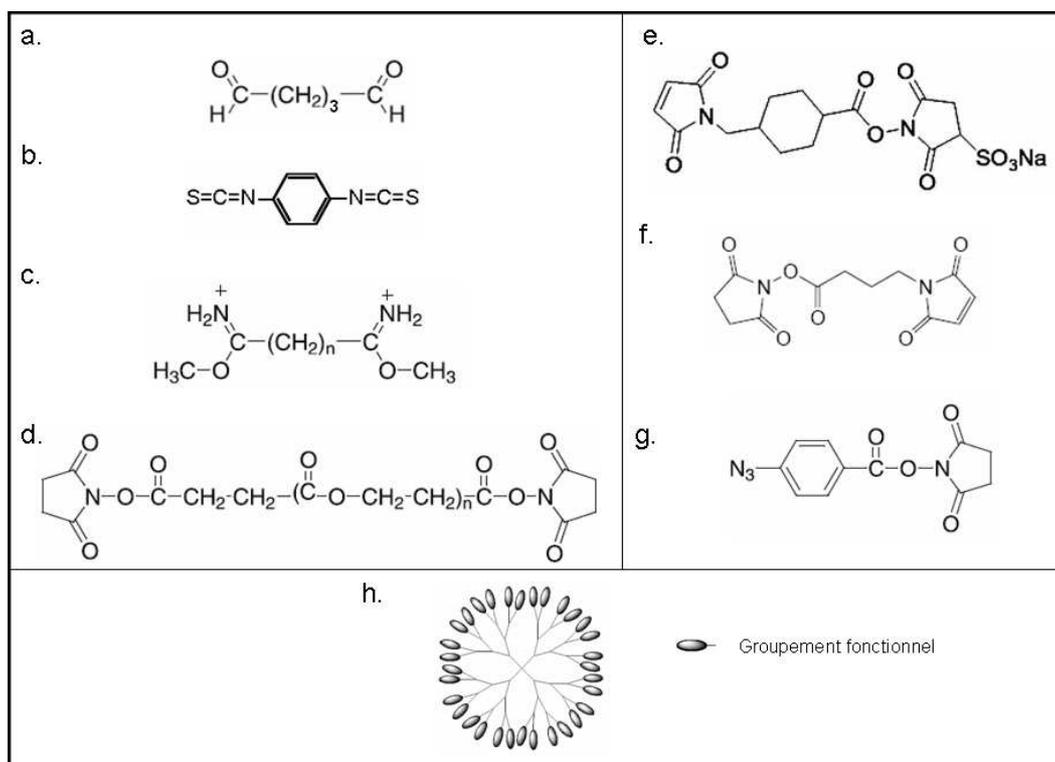


Figure 1.16 – Exemples d’agents de couplage homobifonctionnels (a. glutaraldéhyde, b. 1,4-phénylendiisothiocyanate, c. bis-imidate et d. N-hydroxy-succinimide ester), hétéro-bifonctionnels (e. Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, f. N-(γ-maleimidobutyryloxy) succinimide ester et g. acide N-hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoïque) et plurifonctionnels (f. les dendrimères).

thioéther à pH 6,5-7. Le HSAB (acide N-hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoïque) (Fig 1.16-g) est un agent de couplage hétérobifonctionnel utilisé pour assurer le greffage des fonctions amines sur des liaisons C-H. En effet, en plus de sa réactivité sur des amines, le HSAB dispose d’une fonction phénylazide photoactive (activée par irradiation ultraviolette à une longueur d’onde comprise entre 260 et 305 nm) pour réagir avec des liaisons C-H.

A ces deux catégories classiques d’agents de couplage bifonctionnels, des études assez récentes ont démontré l’intérêt d’utiliser des polymères de structure hyperbranchée appelés dendrimères comme agents de couplage plurifonctionnels [89]. Un dendrimère est une macromolécule, constituée de monomères qui s’associent selon un processus arborescent autour d’un coeur central plurivalent. La construction arborescente s’effectue par la répétition d’une même séquence de réactions jusqu’à l’obtention à la fin de chaque cycle réactionnel, d’une nouvelle génération et d’un nombre croissant de branches identiques (Fig 1.16-h). Après quelques générations, le dendrimère prend généralement une forme sphérique, hautement ramifiée et plurifonctionnalisée grâce aux nombreuses fonctions terminales présentes en périphérie. Lorsqu’elles sont réactives, ces fonctions permettent la création de liaisons covalentes entre ces polymères et les partenaires à relier à savoir une surface de matériau activée

et des éléments de reconnaissance biologiques.

\* Immobilisation par affinité

Le principe de cette technique d'immobilisation repose sur la formation de complexes de type ligand-substrat entre les biorécepteurs et des sites spécifiques couvrant la surface activée. L'avidine, glycoprotéine naturellement présente dans le blanc d'oeuf, ou son homologue bactérien, la streptavidine, contient quatre sites de fixation de très haute affinité pour la biotine (constante de dissociation  $K_d = 10^{-15}$  M). Ainsi, les complexes avidines (ou streptavidine)/biotines, permettent d'établir les plus fortes liaisons non covalentes entre les éléments de reconnaissance moléculaires et les surfaces activées du transducteur. Généralement, la petite molécule de biotine est attachée à l'élément biologique via un agent de couplage. C'est ainsi que des anticorps biotinilés [90] et des fragments d'ADN biotinilés [91] ont été immobilisés sur des surfaces activées recouvertes d'avidines (ou streptavidines) (Fig 1.17).

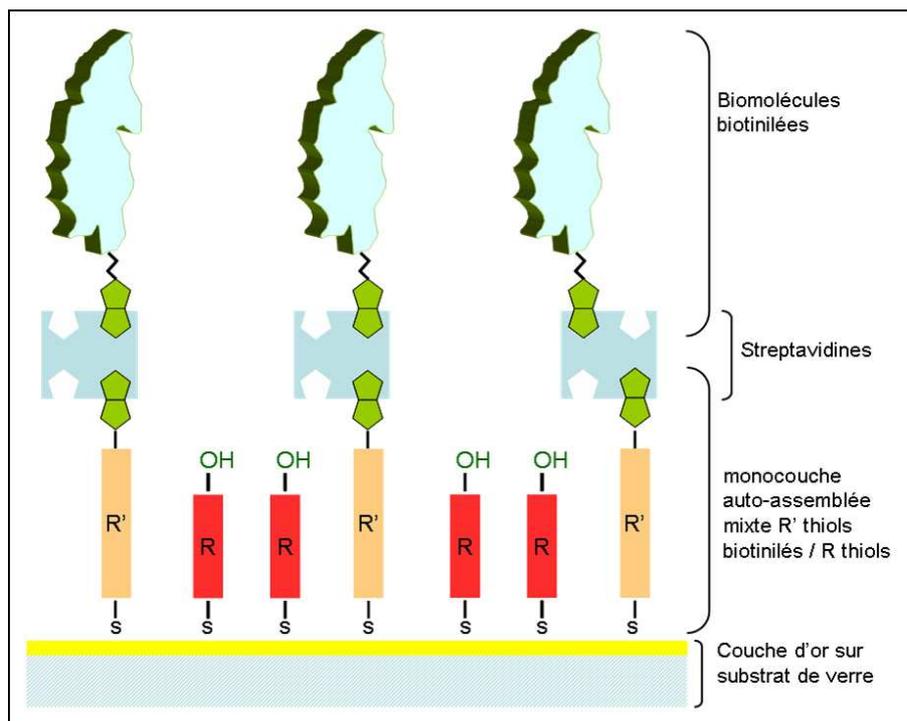


Figure 1.17 – Représentation schématique de l'immobilisation des biomolécules par l'affinité streptavidine/biotine.

La biofonctionnalisation par affinité avidine (ou streptavidine)/biotine permet d'obtenir des structures hybrides de stabilité assez importante. En effet, la rupture des liaisons mises en jeu dans les processus de formation de complexes biotine-avidine nécessite des conditions extrêmes de dénaturation. Cependant la réversibilité de ces complexes peut être provoquée dans des conditions ambiantes

par la présence en excès d'un analogue structural de la biotine : la desthiobiotine.

\* Immobilisation par des liaisons ioniques

Il est aussi possible d'immobiliser des biomolécules sur des surfaces fonctionnalisées par des monocouches auto-assemblées via des interactions électrostatiques. Les groupements fonctionnels mis en jeu lors de ce type de fixation sont souvent les amines ( $-NH_2$ ) et les carboxyles ( $-COOH$ ). Les acides nucléiques, chargés négativement grâce à leurs groupements phosphates, peuvent être adsorbés à une surface activée par une monocouche auto-assemblée présentant des groupements amines protonés ( $-NH_3^+$ ). Des polymères chargés, comme la poly-L-lysine, peuvent aussi coupler des biomolécules à des terminaisons carboxyliques des surfaces activées [92] (Fig 1.18).

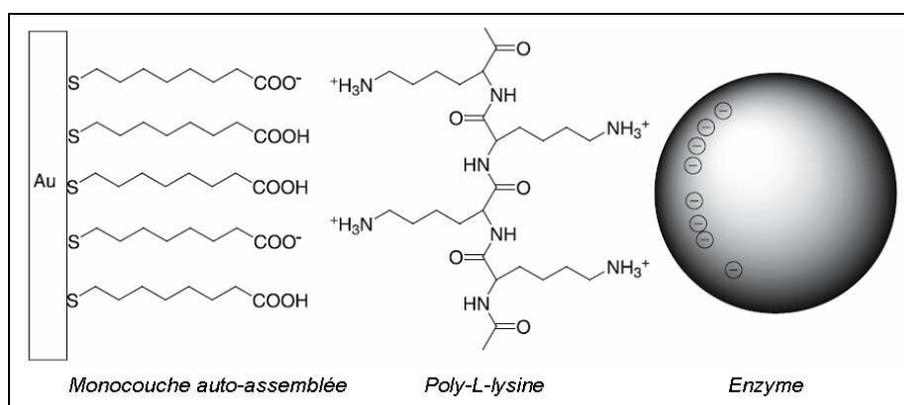


Figure 1.18 – Immobilisation des enzymes sur une monocouche aux terminaisons carboxyles par l'intermédiaire du polymère poly-L-lysine [79].

Comparée aux deux techniques d'immobilisation précédentes (par liaisons covalentes et par affinité), l'immobilisation par liaisons ioniques permet d'obtenir le système d'assemblage le plus fragile et donc le moins stable. En effet des petites variations de pH ou de forces ioniques peuvent altérer considérablement la qualité des interactions électrostatiques entre les éléments chargés du système et affecter l'intégrité de l'assemblage biorécepteur/transducteur. Il est donc indispensable de bien contrôler tous les paramètres environnants et susceptibles d'influencer l'efficacité de cet assemblage avec cette méthode d'immobilisation. Au contraire, l'immobilisation par liaisons covalentes permet un assemblage irréversible et stable. Cependant, cette méthode entraîne souvent le blocage d'une certaine proportion de sites actifs des éléments de reconnaissance biologiques et donc une baisse de la sensibilité de biodétection. L'immobilisation par affinité est un moyen d'immobilisation orientée et stable des molécules biologiques qui permet de préserver le maximum de sites actifs et donc une meilleure sensibilité de biodétection. En revanche, cette méthode d'assemblage nécessite des moyens biotechnologiques supplémentaires et donc un coût plus onéreux que l'immobilisation par liaisons covalentes ou par liaisons ioniques.

## 1.5 Le silicium poreux et ses applications en biocapteurs

Estimées à onze milliards de dollars en 2005 et avec une croissance de l'ordre de huit pour cent par an, les dépenses sanitaires mondiales en terme de biocapteurs sont en faveur d'un succès de ces dispositifs dans le diagnostic et le suivi analytique des pathologies humaines [93]. Ces besoins importants en dispositifs biocapteurs ne se limitent pas aux secteurs biomédicaux, mais s'étendent aussi à d'autres domaines vétérinaires, alimentaires et environnementaux. Dans l'objectif de répondre à ces besoins, la recherche sur les biocapteurs ne cesse d'investir et d'explorer différents types de matériaux. Parmi ces matériaux, on peut citer les semi-conducteurs comme le silicium qui est largement utilisé dans ces applications. En effet, leur utilisation a débuté dans les années soixantes et divers types de capteurs thermiques, barométriques, chimiques et biologiques ont été développés sur du silicium [94]. C'est essentiellement après la découverte par L.T. Canham en 1990 [95, 96] de l'intense photoluminescence émise à température ambiante par le silicium poreux que de très nombreuses études ont été consacrées à l'utilisation du silicium nano-structuré dans les capteurs. En plus de ses propriétés optiques, le silicium poreux est caractérisé par la facilité de son élaboration, une surface interne spécifique élevée (jusqu'à  $900 \text{ m}^2\text{cm}^{-3}$  [97]) et une innocuité vis à vis des tissus biologiques (bio-compatibilité) [98] lui permettant d'être un candidat intéressant pour des applications en biocapteurs. Ainsi nous décrivons dans cette section le silicium poreux, la méthode classique (électrochimique) permettant sa formation ainsi que les différentes applications de ce matériau dans la biodétection [93].

### 1.5.1 Le silicium poreux

Le silicium poreux a été découvert accidentellement en 1956, par A. Uhler [99] aux laboratoires Bell (Bell Telephone Laboratories) alors que ce chercheur travaillait sur le développement de techniques de polissage électrochimique du silicium dans des solutions d'acide fluorhydrique (HF). Au cours de ces expériences il a constaté qu'à une concentration donnée en HF, le polissage de silicium nécessitait l'application d'une densité de courant dépassant un certain seuil en dessous duquel la surface du matériau se couvrait d'un film coloré. Des observations similaires ont été reportés par D. R. Turner en 1958 [100]. Ce n'est qu'au début des années soixante-dix que la structure poreuse du film a été révélée [101, 102]. En revanche, l'intérêt de la communauté scientifique pour ce matériau n'a été suscité que vingt ans plus tard avec la découverte par L.T. Canham [95, 96] de l'intense photoluminescence émise par le silicium poreux à température ambiante. Depuis, un grand nombre d'études a été réalisé afin de mieux comprendre les propriétés physiques du silicium poreux et de l'adapter à des applications de natures différentes. Dans ce paragraphe du chapitre, nous décrivons brièvement la formation du silicium poreux ainsi que ces principales propriétés structurales et optiques nécessaires à introduire les applications de biodétection exploitant ce matériau.

### a. Formation du silicium poreux

Le silicium poreux est un matériau obtenu par anodisation électrochimique d'un substrat de silicium monocristallin. Le principe de cette technique consiste à appliquer un champ électrique entre une cathode en or ou platine et le substrat de silicium constituant l'anode dans un milieu électrolyte à base d'acide fluorhydrique (HF) (figure 1.19).

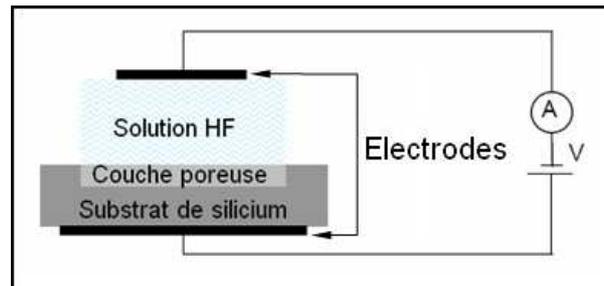


Figure 1.19 – Schéma de principe de l'anodisation électrochimique pour l'élaboration du silicium poreux.

Dans des conditions particulières de concentration de HF dans l'électrolyte et de densité de courant appliquée (rapport entre l'intensité du courant et la surface du substrat en contact avec la solution), ce procédé permet de graver des interstices dans le volume du substrat de silicium sous-jacent la surface du matériau en contact avec la solution du HF. Ces interstices sont appelés "pores" et se propagent dans le substrat sur une profondeur proportionnelle à la durée de l'opération d'anodisation.

Plusieurs schémas réactionnels ont été proposés pour décrire le mécanisme de formation électrochimique du silicium poreux [103, 104, 105]. Dans la littérature du silicium poreux, le mécanisme imaginé par Lehmann et Gosele [103] semble être le plus adopté (figure 1.20).

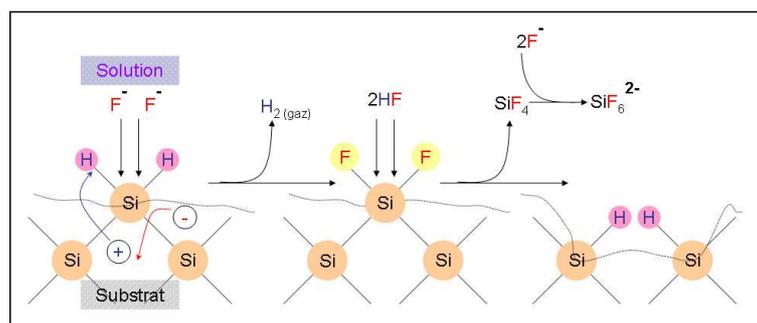


Figure 1.20 – Mécanisme réactionnel responsable de la formation du silicium poreux par anodisation électrochimique [103].

Il s'agit d'un mécanisme réactionnel à deux étapes. La première est électrochimique et consiste en une attaque nucléophile des liaisons Si-H exposées à la surface de l'échantillon par les ions fluorure  $F^-$ . Cette attaque entraîne la substitution des atomes d'hydrogène par celles du fluorure au niveau des sites d'initiation de la gravure. Cette étape fait intervenir un couple d'électrons/trous et s'accompagne

d'un dégagement de dihydrogène ( $H_2$ ). La deuxième étape est chimique. Elle est due à la fragilisation des liaisons Si-Si par la polarisation des liaisons Si-F formées au cours de la première réaction. Attaquées par la solution fluorhydrique, ces liaisons sont rompues entraînant la dissolution des atomes de silicium sous forme de  $SiF_4$  et la passivation de la nouvelle surface par des atomes d'hydrogène. L'obtention d'une couche de silicium poreux nécessite la reproduction de ces réactions durant un certain temps d'anodisation et en dehors du régime de l'électropolissage. En effet pour chaque concentration de HF, il existe un seuil de courant au dessus duquel la dissolution anodique ne permet plus la nanostructuration poreuse mais un lissage de la surface du substrat de silicium [106]. En plus de ces deux paramètres (concentration de HF et densité de courant appliquée), la cinétique de ces réactions de nanostructuration du silicium dépend du type et du taux de dopage du substrat (P,  $P^+$ , N ou  $N^+$ ) utilisé. En faisant varier ces paramètres, il est possible d'obtenir des matériaux poreux de caractéristiques morphologiques différentes. Ces caractéristiques sont étroitement liées à celles des pores qui sont : le type (ou forme), la taille (ou diamètre), le volume (ou porosité) et la surface des parois.

### b. Propriétés structurales

La caractérisation structurale du silicium poreux passe par l'identification de la forme générale de ses pores, l'analyse de leurs sections (taille des pores), la détermination de la fraction volumique qu'ils occupent (porosité) et la mesure de la surface de leurs parois.

En fonction de leurs formes, les pores ont été classés par L. T. Canham en quatre principaux types [107] (figure 1.21) : (a) des pores continus non ramifiés de forme cylindrique, (b) des pores continus non ramifiés de forme géométrique irrégulière, (c) des pores ramifiés et (d) des pores discontinus de forme aléatoire. L'identification de ces morphologies s'effectue généralement par des observations en microscopie électronique à balayage (MEB) des coupes longitudinales (obtenues par clivage des échantillons de silicium poreux perpendiculairement à sa surface) des échantillons à analyser [108].

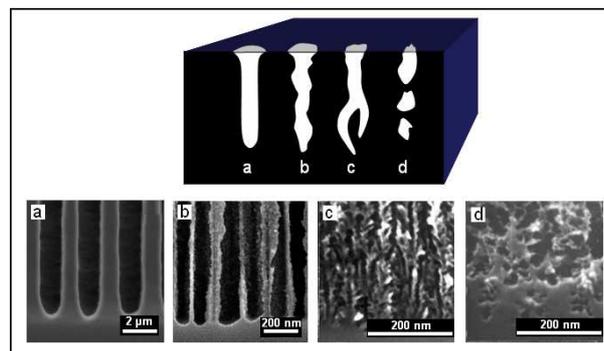


Figure 1.21 – Schéma et micrographies MEB des principales structures poreuses [107, 108, 109]. Pores continus non ramifiés de forme cylindrique (a), pores continus non ramifiés de forme géométrique irrégulière (b), pores ramifiés (c) et des pores discontinus de forme aléatoire (d).

Le deuxième paramètre structural est la taille moyenne (ou diamètre moyen) des pores. Ce pa-

ramètre correspond à la dimension moyenne des sections des pores. Il permet de classer le silicium poreux en microporeux (diamètre < 2 nm), mésoporeux (diamètre entre 2 et 50 nm) et macroporeux (diamètre > 50 nm). L'estimation de la taille moyenne des pores d'un échantillon est généralement obtenue grâce à des observations en microscopie électronique à balayage [110, 111] ou en transmission [112]. D'autres techniques, comme l'analyse des isothermes d'adsorption de gaz à basse température [113], la diffraction des rayons X [114], la résonance magnétique nucléaire [115], la calorimétrie différentielle à balayage [116] et la microscopie à force atomique [117, 118] ont été exploitées pour déterminer la taille des pores.

La porosité d'un échantillon de silicium poreux correspond à la fraction volumique d'air contenu dans sa couche poreuse. Des valeurs de porosité allant de 4 % (obtenue sur du silicium macroporeux) [119] à 95 % (obtenue sur du silicium mésoporeux) [107] ont pu être mesurées. Ce paramètre structural peut être déterminé par gravimétrie sur des couches de grandes épaisseurs [120]. La méthode gravimétrique est destructive. Elle est plus adaptée à des valeurs de porosités intermédiaires (de 30 à 70 %). Pour des couches poreuses de faibles épaisseurs (< 1  $\mu\text{m}$ ) et/ou de porosités élevées (de 70 à 95 %) ainsi que pour des couches de faibles porosités (de 4 à 30 %), la détermination de ce paramètre peut se faire grâce à des techniques optiques exploitant la réflectométrie [121], l'ellipsométrie [122] et l'absorption des rayons X [123].

Une couche de silicium poreux est aussi caractérisée par sa surface spécifique. Ce paramètre correspond à la surface développée par les parois des pores de l'échantillon par unité de volume occupé par la couche poreuse (en  $\text{m}^2\text{cm}^{-3}$ ). La détermination de ce paramètre est essentiellement assurée par la méthode BET (Brunauer-Emmett-Teller) d'adsorption de gaz [107]. Par cette technique, des surfaces spécifiques allant de 50 à 900  $\text{m}^2\text{cm}^{-3}$  ont été mesurées sur des échantillons de silicium poreux [97]. La possibilité d'élaborer le silicium poreux avec une surface spécifique aussi importante constitue l'avantage principal de son exploitation dans la conception des biocapteurs. En effet, l'objectif d'utiliser une surface spécifique importante est d'une part de pouvoir immobiliser un excès de biorécepteurs favorisant la détection de l'analyte sur un intervalle large de concentrations et d'autre part d'amplifier la transduction afin d'améliorer les capacités de détection (limites de détection et de quantification) et donc la sensibilité de la méthode d'analyse.

### c. Propriétés chimiques

La surface du silicium poreux fraîchement préparé est passivée avec de l'hydrogène d'où une présence prédominante des fonctions hydrogénosilanes (Si-H) sur cette surface [124]. Ces fonctions chimiques réagissent facilement dans différents types de réactions telles que les réactions d'hydrosilylation (addition d'un composé organique insaturé) et d'oxydation. Il est alors possible de modifier chimiquement la surface du silicium poreux par greffage covalent de molécules organiques [125]. La

fonctionnalisation chimique du silicium poreux est une étape cruciale de sa préparation pour des applications de biodétection. En effet, la modification chimique de la surface du silicium poreux permet d'une part l'incorporation de l'élément de reconnaissance (biorécepteur) qui confère au futur capteur sa spécificité et d'autre part, elle permet de stabiliser chimiquement la surface du matériau et donc de le protéger (de la corrosion par exemple), ce qui est indispensable pour l'élaboration d'un biocapteur performant [126].

### **c. Propriétés optiques**

Le silicium poreux présente des propriétés optiques qui découlent directement de sa structuration nanométrique. Il a été montré que les nanocristallites qui séparent les pores de ce matériau lui confèrent des propriétés de photoluminescence [95, 96]. Ces propriétés se traduisent par l'émission de lumière par un échantillon au cours de processus de relaxation après son excitation à une longueur d'onde donnée. Comme tout matériau déposé sous forme de couches minces, le silicium poreux présente un spectre de réflexion caractéristique de son indice de réfraction et de son épaisseur. La modulation de la réflectivité provient des interférences se produisant entre les faisceaux de lumière réfléchis par les deux interfaces du film mince. Dans le cas du silicium poreux, on considère les interfaces air/couche poreuse et couche poreuse/substrat de silicium. Les interférences sont constructives si les deux ondes réfléchies sont en phase. Des franges d'interférences brillantes sont alors observées. Si les deux ondes réfléchies sont en opposition de phase, des interférences destructives apparaissent et des franges sombres sont observées [126].

Par ces propriétés de photoluminescence ou de réflectivité, le silicium poreux produit un signal optique qui est affecté chaque fois qu'il est exposé à des changements environnementaux. D'où l'intérêt de ces deux phénomènes optiques dans l'application du silicium poreux pour la biodétection. Nous présentons dans le paragraphe suivant les principaux travaux sur cette application.

### **1.5.2 Transduction optique sur nanostructures photoniques de silicium poreux pour la biodétection**

L'utilisation du silicium poreux comme capteur chimique a été démontrée pour la première fois à la fin des années 1990 [127] : la méthode de transduction utilisée était la capacitance des films de silicium poreux. Aujourd'hui, d'autres propriétés physiques du silicium poreux sont utilisées comme moyen de transduction dans les capteurs, à savoir la résistivité, la photoluminescence et la réflectivité optique. Des études ont montré que les méthodes de détection basées sur les propriétés optiques sont les plus robustes. Ces méthodes sont capables de détecter des toxines, des composés organiques volatiles, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des explosifs, de l'ADN, des protéines, avec, pour certaines d'entre eux, une limite de détection de quelques ppm (parties par milliard) [126]. Dans cette partie nous présentons les principales applications du silicium poreux en biodétection par réflectivité optique, méthode utilisée dans le cadre de ma thèse.

### a. Structures monocouches

Le phénomène d'interférences optiques observé par Doan et Sailor [128] au début des années 1990 à la surface d'un échantillon de silicium poreux est à l'origine de l'exploitation de la réflectivité optique dans la biodétection sur ce type de matériau. En effet, la lumière envoyée à la surface de l'échantillon est réfléchi au niveau des deux interfaces air/silicium poreux et silicium poreux/substrat de silicium (figure 1.22a). L'interférence à la surface du matériau poreux des ondes réfléchies entraîne la formation de franges appelées "franges de Fabry-Pérot" [129]. Ces franges peuvent être visualisées par un spectromètre CCD sous forme d'un spectre d'interférences présenté sur la figure 1.22b.

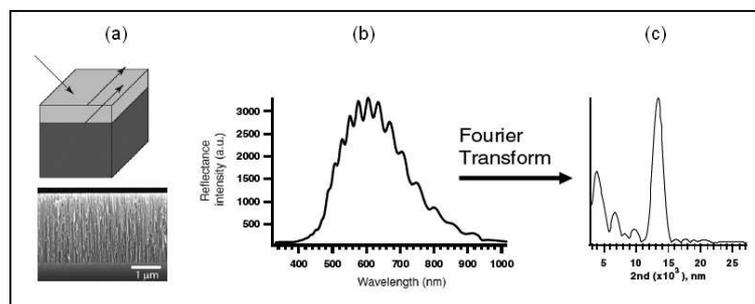


Figure 1.22 – Détermination de l'épaisseur optique d'une monocouche de silicium poreux : Schéma (en haut) et micrographie MEB (en bas) d'une monocouche de silicium poreux (a), sa réponse spectrale (b) et le résultat de l'application d'une transformée de Fourier (c) [93, 130, 117]

Les maxima de réflectivité observés sont localisés à des longueurs d'onde  $\lambda$  données par la relation suivante (équation 1.6) :

$$m\lambda = 2ne \quad (1.6)$$

où "m" est l'ordre d'interférence à une longueur d'onde " $\lambda$ ", "n" est l'indice de réfraction du milieu et "e" est l'épaisseur du film poreux. Le facteur "2" exprime le chemin parcouru par la lumière dans le film poreux et correspond à deux fois l'épaisseur du film poreux quand la réflectivité est mesurée en incidence normale. L'indice de réfraction est un indice composite qui est, en fait, une moyenne pondérée par la porosité entre l'indice de réfraction du silicium monocristallin et l'indice du milieu remplissant les pores. Ainsi tout changement dans la composition de ce milieu, provoqué par exemple par la fixation de l'analyte à un biorécepteur spécifique préalablement immobilisé à la surface des pores, entraîne une variation de l'indice de réfraction du film poreux et un déplacement des franges de Fabry-Pérot. La résolution de ce déplacement utilise généralement l'application d'une transformée de Fourier. Cette opération mathématique permet de simplifier l'analyse du signal multifrange en représentant son « contenu fréquentiel » sous forme d'un pic unique d'intensité proportionnelle à

l'épaisseur optique effective ( $n_e$ ) de la couche poreuse [129, 130, 131] (figure 1.22c).

Le premier travail sur la biodétection exploitant l'épaisseur optique d'une monocouche de silicium poreux est celui de Lin et ses collaborateurs [129]. Ces derniers ont observé la diminution de l'épaisseur optique d'une monocouche de silicium macroporeux (diamètre des pores égal à 200 nm environ) associée à l'augmentation de la quantité d'analyte détecté. Ils ont rapporté, dans un premier temps, la possibilité de détecter des fragments d'ADN de 16 nucléotides sur cette couche poreuse dont la surface a été préalablement fonctionnalisée par des oligomères nucléotidiques complémentaires dans un intervalle de concentrations allant de  $10^{-15}$  à  $2.10^{-6}$  M. La limite de détection de la méthode analytique a été estimée à  $9.10^{-15}$  g/mm<sup>2</sup>. Dans un deuxième temps, le travail a présenté des résultats de biodétection en cascade de la streptavidine, puis d'un anticorps secondaire biotinilé, ensuite d'un anticorps anti-digoxigénine et enfin de la digoxigénine à des concentrations respectives de  $10^{-14}$  M,  $10^{-12}$  M,  $10^{-8}$  M et  $10^{-6}$  M obtenues sur une monocouche poreuse fonctionnalisée avec de la biotine. Malgré l'impact scientifique important de cette découverte, la performance de ces résultats a été rapidement controversée à cause de la diminution de l'épaisseur optique de la couche poreuse après chaque opération de biodétection. En effet, Janshoff [117] a démontré en exploitant l'affinité entre la biotine comme biorécepteur, et la streptavidine comme analyte, que l'introduction des molécules organiques d'indice de réfraction supérieur à celui de l'eau ( $n_{eau} = 1,33$  et  $n_{orga.} > 1,4$ ), composant remplissant les pores avant la fixation de l'analyte sur son biorécepteur, doit entraîner une augmentation de l'épaisseur optique de la couche poreuse. Cependant, ce signal optique n'est pas aussi sensible que celui déterminé par Lin [129] (limites de détection respectives de 1 à  $10^{-9}$  g.mm<sup>-2</sup> et  $9.10^{-15}$  g.mm<sup>-2</sup>). Récemment, les résultats controversés de la première étude [129] ont été attribués à un phénomène de corrosion de la couche de silicium poreux après chaque opération de biodétection [132]. Cette corrosion serait due à une attaque nucléophile de la surface des cristaux de silicium par des molécules d'eau contenues dans le tampon de l'analyse. Il a été supposé que cette attaque est stimulée par la condensation des charges négatives des doubles brins d'ADN et la migration des trous positifs du matériau fortement dopé (de résistivité égale à 1 mΩ.cm) à cette surface. Ensuite, il a été démontré que l'exploitation de cet effet corrosif comme moyen d'amplification du signal optique dans la biodétection d'ADN est possible. Ainsi, de très faibles quantités d'ADN de l'ordre de  $10^{-19}$  mol/mm<sup>2</sup> [132] ont été détectées et la recherche d'applications exploitant ce concept de biodétection optique par corrosion de silicium poreux a fait l'objet d'autres études comme celles de l'équipe de Voelcker [133]. Il a été découvert, par cette équipe, la possibilité d'utiliser des agents catalyseurs de la corrosion comme le complexe organo-métallique "Ni<sup>II</sup> cyclama" afin d'augmenter la sensibilité du signal optique de biodétection des fragments d'ADN et des dérivés biotinylés. L'enzyme peroxydase (HRP : HorseRadish Peroxydase en anglais) a aussi été utilisée pour amplifier la variation du signal optique généré par la corrosion du silicium poreux [134]. En catalysant l'oxydation de l'ortho-phénylènediamine (OPD), cette enzyme entraîne la formation d'un produit radicalaire corrosif vis à vis de la surface poreuse et permet, selon Jane [134], au silicium poreux de détecter des anticorps à des concentrations très faibles (de 125 à 500 ng/ml). Même si la sensibilité de la biodétection optique sur silicium poreux monocouche a

été améliorée par l'utilisation d'agents de corrosion (enzymes, complexes organo-métalliques), il est important de signaler que cette approche nécessite une étape supplémentaire dans la biodétection. En effet, le phénomène de corrosion doit être amorcé par la liaison des récepteurs marqués par ces agents sur les analytes préalablement liés à leurs biorécepteurs au niveau de la surface des pores. La nature de la biodétection dans ce cas est plutôt indirecte, la durée des analyses est prolongée et la réutilisation du matériau est limitée par sa corrosion. Ainsi, et dans l'objectif d'améliorer la qualité de la transduction optique du silicium poreux pour des applications de biodétection directe, d'autres structures plus complexes que la monocouche ont été exploitées. Nous présentons maintenant ces structures ainsi que leurs applications dans la conception de biocapteurs.

### b. Structures multicouches

Les paramètres de courant fixés pour l'élaboration électrochimique des films de silicium poreux permettent normalement de contrôler de manière précise et reproductible à la fois l'indice de réfraction et l'épaisseur du film poreux. En effet, la densité de courant appliquée contrôle la quantité de silicium dissoute, donc la porosité et par conséquent l'indice de réfraction  $n$  de la couche poreuse. La durée de gravure électrochimique détermine son épaisseur  $e$ . Il est donc possible, en agissant sur ces paramètres, de générer des structures poreuses multicouches plus complexes [135, 136] (figure 1.23a,b).

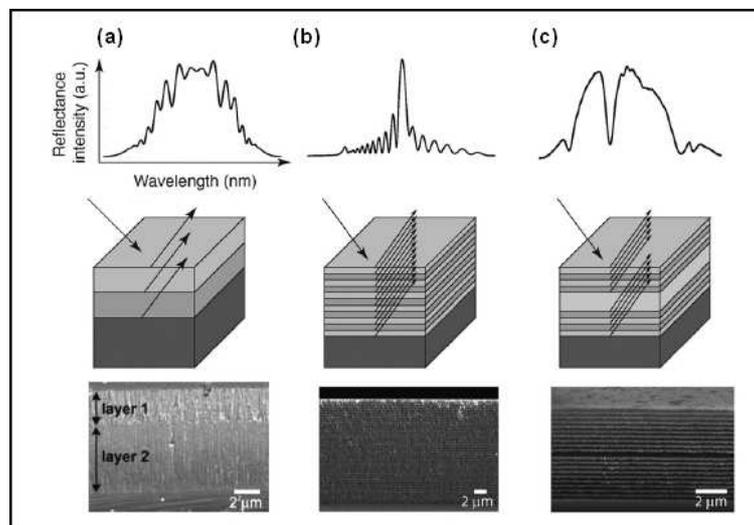


Figure 1.23 – Schémas (au milieu) et micrographies MEB (en bas) des différentes structures du silicium poreux et spectres de réflectance correspondants (en haut) : (a) double couche, (b) miroir de Bragg et (c) microcavité [93, 137, 131, 138]

L'empilement périodique de couches de silicium poreux d'épaisseurs optiques ( $n_1e_1$  et  $n_2e_2$ ) vérifiant les conditions de Bragg pour un cristal photonique ( $n_1e_1 + n_2e_2 = \lambda_B/2$ ) entraîne la réflexion

totale de la lumière incidente à une longueur d'onde définie ( $\lambda_B$ ). La structure multicouche ainsi obtenue, appelée "miroir de Bragg", se caractérise par la formation d'une bande interdite photonique empêchant les ondes électromagnétiques de se propager à l'intérieur du milieu [139, 140]. La formation de cette bande peut aussi être obtenue suite à la variation sinusoïdale de l'indice de réfraction du silicium poreux autour d'une valeur moyenne  $\bar{n}$ . La structure ainsi obtenue s'appelle "filtre rugate" [141, 142]. La disposition en vis à vis de deux miroirs de Bragg de part et d'autre d'une couche poreuse séparatrice permet l'obtention d'une microcavité (figure 1.23c). La réponse spectrale de cette structure photonique est caractérisée par l'apparition de deux bandes spectrales de réflectivités élevées séparées par un pic (en creux) de résonance situé à une longueur d'onde spécifique (figure 1.9, section 1.3.2) et appelé "pic de Fabry-Pérot" (ou mode de résonance) [139, 143].

Les études sur les structures multicouches à base de silicium poreux pour des applications de biodétection ont débuté en 2003 par les travaux d'Anderson et ces collègues [144]. Le travail de cette équipe portait sur une étude comparative de la sensibilité à détecter la variation d'indice de réfraction du milieu remplissant les pores des structures monocouche, miroir de Bragg et microcavité a été réalisé. Les résultats expérimentaux, relatifs à la variation de la réflectivité de chaque structure en fonction de l'augmentation de l'indice de réfraction (de 1,3330 à 1,3344) d'une solution de saccharose (concentrations massiques de 0 à 1 pc) infiltrant les couches poreuses, ont montré que le silicium poreux structuré en miroir de Bragg permettait une détection plus sensible que celles obtenues avec la monocouche ou la microcavité. Cependant, la même comparaison effectuée par un logiciel de simulation optique (WVASE32) et le modèle de Bruggeman a démontré l'avantage de la microcavité. Quelques années plus tard, cet avantage a été confirmé expérimentalement par d'autres équipes qui ont exploité des microcavités en silicium poreux dans des applications de biodétection par affinité. En effet, des analytes de nature biologique (l'enzyme "glutathion-s-transférase", des immunoglobulines plasmatiques, la protéine bactérienne "intimine") ont pu être analysés à des concentrations allant de 0,01 jusqu'à 40  $\mu\text{M}$  et avec une limite de détection très faible (estimée égale à environ  $5.10^{-11}$  g.mm<sup>-2</sup>) [71, 145, 146] en utilisant ces microcavités.

## 1.6 Application envisagée : Biocapteur optique de glucagon sur silicium poreux

Dans le cadre de la demande mondiale en dispositifs de biodétection, le Groupe Matériaux Nanostructurés et Photonique (GMNP) a été amené à explorer la thématique biocapteur. Ainsi, nous avons débuté le travail dans ce sujet en entreprenant cette thèse avec la perspective de développer une application analytique innovante sur le silicium poreux, matériau habituellement élaboré dans le GMNP pour des applications en optique intégré. Nous avons choisi d'explorer la détection optique de l'hormone hyperglycémiant "glucagon" par des anticorps monoclonaux anti-glucagon de type IgG<sub>1</sub>.

Le glucagon est un polypeptide constitué d'une chaîne de 29 acides aminés et de masse molaire

égale à  $3485 \text{ g.mol}^{-1}$ . Ce peptide est sécrété naturellement par les cellules alpha du pancréas. Le glucagon agit sur la régulation de la concentration du glucose dans le sang (glycémie). En réponse à une augmentation de l'utilisation du glucose (par exemple pendant l'effort physique) ou à un appauvrissement dû à l'insuline, le glucagon agit contre l'hypoglycémie (glycémie  $< 0,7 \text{ g/l}$ ) et permet de restaurer le niveau de glucose en circulation en stimulant sa production dans le foie par glycogénolyse (libération du glucose stocké sous forme de glycogène) [147]. L'altération de cette production physiologique du glucagon chez certains patients nécessite un apport exogène assuré par un médicament injectable (Glucagen<sup>®</sup> du laboratoire pharmaceutique Novo Nordisk) (figure 1.24).

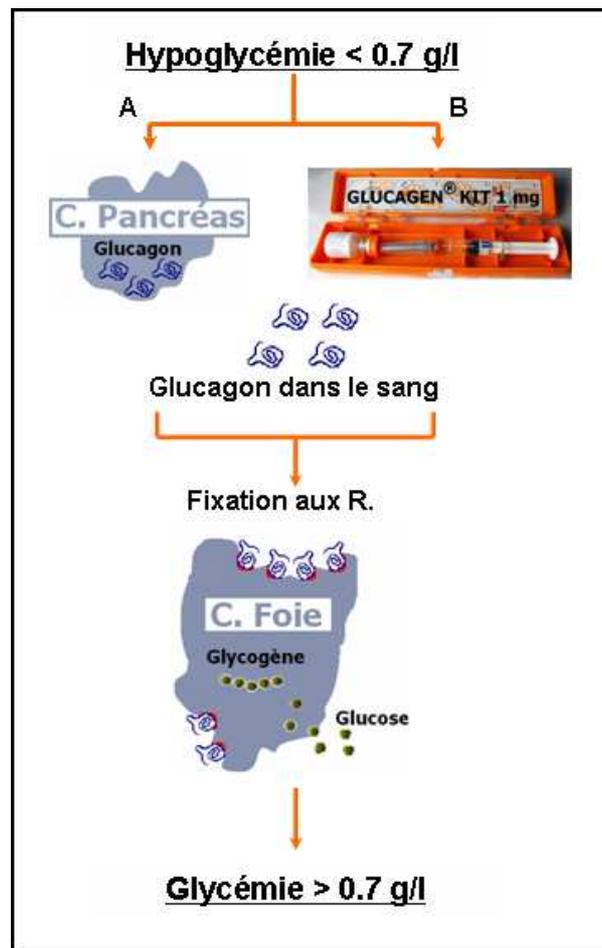


Figure 1.24 – Schéma simplifié du mécanisme d'action du glucagon physiologique (A) et thérapeutique (B)

La détermination de la glucagonémie (concentration du glucagon dans le sang) permet le diagnostic de certaines tumeurs pancréatiques sécrétant du glucagon (glucagonome) et peut être utilisée dans des études physiopathologiques du diabète et de l'hypoglycémie. Actuellement, seul l'emploi d'une méthode d'analyse radioimmunologique mise au point par Unger et ses collaborateurs en 1961 [148] et utilisant des anticorps anti-glucagon et du glucagon marqué à l'iode 125 permet aux laboratoires

d'analyses médicales le dosage plasmatique du glucagon. Cette technique présente les inconvénients d'une détection indirecte par mesure de radioactivité à savoir une contrainte de sécurité relative à l'exposition aux irradiations et une longue durée d'analyse dépassant deux jours. D'où l'intérêt de développer un biocapteur de glucagon permettant un dosage rapide et sans marquage du peptide dans les milieux biologiques. Un tel biocapteur peut aussi trouver son utilité en milieu industriel pharmaceutique pour contrôler la qualité analytique des préparations médicamenteuses à base de glucagon. C'est aussi la disponibilité commerciale des anticorps spécifiques anti-glucagon qui nous a encouragé à choisir cette application de biodétection. Il est en effet indispensable de disposer du biorécepteur afin de concevoir le dispositif analytique sur silicium poreux.

## 1.7 Conclusion

Dans ce chapitre bibliographique nous avons présenté le biocapteur comme un assemblage entre des composants organiques que nous appelons biorécepteurs (ou sonde ou éléments de reconnaissance biologique) et un matériau inorganique constituant le transducteur. Les biorécepteurs peuvent être enzymatiques, immunologiques ou synthétiques.

Historiquement, les enzymes constituent la catégorie la plus ancienne des biorécepteurs. La bonne performance des analyses employant ce type de biorécepteur est essentiellement lié à la spécificité ainsi qu'à la robustesse des réactions enzymatiques. Permettant la biodétection d'analytes à des concentrations supérieures à  $10^{-7}$  M, les biocapteurs enzymatiques ne sont pas adaptés pour effectuer des analyses de haute sensibilité. En plus, ce type de biodétection se limite aux analytes pouvant jouer le rôle de substrat dans une réaction enzymatique. Ainsi des éléments immunologiques, essentiellement les immunoglobulines (ou anticorps), ciblant un nombre plus important d'analytes, ont été utilisés comme biorécepteurs. En effet, les biocapteurs intégrant ces éléments de reconnaissance biologiques sont capables d'analyser des échantillons à des concentrations nanomolaires. Afin d'obtenir des biocapteurs de plus en plus sensible, une nouvelle catégorie de biorécepteurs dite de synthèse s'est largement développée ces dernières années. Certains de ces biorécepteurs permettent d'analyser des concentrations femtomolaires.

Comme pour les biorécepteurs, les transducteurs sont de différents types. Ils sont généralement désignés selon la nature du phénomène physique ou physico-chimique qu'ils exploitent pour détecter la présence de l'analyte. Les principales catégories sont les transducteurs électrochimiques et les transducteurs optiques. Malgré l'importance historique des transducteurs électrochimiques (les premiers utilisés en biodétection), les transducteurs optiques occupent aujourd'hui une place majeure. D'où notre intérêt à ce type de transduction qui rassemble un nombre important de techniques (Ellipsométrie, spectroscopie d'absorption, résonance plasmonique de surface, interférométrie). Considérant l'interférométrie comme le phénomène optique le plus adapté à interagir avec un matériau poreux à indice de réfraction modulable, nous avons présenté dans ce chapitre les principales méthodes inter-

férométriques susceptibles d'intégrer un biocapteur optique à base de silicium poreux. Nous avons ainsi présenté les principes optiques des interféromètres de Mach-Zehnder, de Young, de Hartman, par rétrodiffusion et du Fabry-Pérot.

A nos jours, la méthode utilisant le Fabry-Pérot est pratiquement la seule technique interférométrique qui a exploité le silicium poreux pour la biodétection. Il semble bien que cette technique optique soit la plus adaptée pour la conception de dispositifs biocapteurs à base de silicium poreux. De sensibilité similaire à celle des biocapteurs exploitant les guides d'onde (interféromètres de Mach-Zehnder, Young et Hartman), les biocapteurs à base de microcavité en silicium poreux ne nécessitent pas d'étapes technologiques supplémentaires (comme la photolithographie pour réaliser des guides d'onde) souvent difficiles à reproduire.

Après avoir décrit les différents composants d'un biocapteur, à savoir le biorécepteur et le transducteur, nous avons présenté dans ce chapitre de la thèse les moyens et les techniques utilisés dans la littérature pour l'assemblage de ces deux constituants. Vu la nature irrégulière de la surface de notre matériau, nous avons particulièrement développé les méthodes de la chimie douce. Par ces procédés, au minimum deux étapes sont nécessaires à l'immobilisation des biorécepteurs sur des surfaces inorganiques. Dans le cas d'une surface à base de silice (verre ou silicium hydroxylé), l'étape d'activation chimique est généralement assurée par une réaction de silanisation. La deuxième étape est l'immobilisation des éléments de reconnaissance moléculaires aux surfaces préalablement activées. Souvent cette étape utilise des molécules de couplage assurant un pontage covalent entre la surface activée et les biorécepteurs. Comparé à d'autres méthodes telles que l'immobilisation par affinité avidine/streptavidine ou l'immobilisation par des liaisons ioniques, le couplage covalent permet un assemblage stable et irréversible.

La dernière partie de ce chapitre a été consacré au matériau silicium poreux. Nous avons alors commencé par rappeler le principe de son élaboration par anodisation électrochimique ainsi que ses propriétés structurales, chimiques et optiques. Ensuite, nous avons présenté les principales applications du silicium poreux en biodétection par réflectivité optique, méthode que nous avons choisi d'exploiter dans le cadre de cette thèse. Pour le cas des monocouches, cette méthode permet de mesurer l'épaisseur optique ( $ne$ ) du film poreux avant et après interaction entre l'analyte et son biorécepteur. De cette manière, l'évolution de l'indice de réfraction du milieu est directement liée à la quantité d'analyte dans l'échantillon analysé. Pour les multicouches de silicium poreux, les principales structures étudiées dans la littérature sont les miroirs de Bragg et les microcavités. Avec de telles structures, la présence de substances organiques dans les pores est traduite par le décalage de la longueur d'onde centrale ( $\lambda_0$ ). Le suivi d'un tel déplacement spectral est plus simple avec les microcavités grâce à la présence d'un pic de résonance à  $\lambda_0$ .

Cette étude bibliographique sur les biocapteurs et les applications du silicium poreux dans la biodétection nous a aidé d'une part à choisir l'application biocapteur que nous avons étudié et d'autre part à fixer les objectifs des premiers travaux de notre laboratoire dans ces domaines. Ainsi, en vue de réaliser un biocapteur de glucagon utilisant des biorécepteurs immunologiques et une transduction

optique, nous avons au cours de cette thèse cherché dans un premier temps les conditions expérimentales d'élaboration de monocouches de silicium poreux de diamètre de pores permettant d'accueillir la sonde choisie (anticorps anti-glucagon de taille égale à environ 17 nm). Dans un deuxième temps, notre travail consisté à mettre au point un procédé de biofonctionnalisation visant à fixer cette sonde à la surface du silicium poreux et à caractériser la chimie de surface des nanostructures photoniques (monocouches et microcavités) essentiellement par la méthode d'interférométrie.



## Chapitre 2

# Moyens, conditions d'élaboration et techniques de caractérisation

L'objectif de ce travail étant de réaliser une structure photonique à base de silicium poreux pour la conception d'un biocapteur optique du glucagon, nous avons commencé notre étude par le choix des substrats (types et taux de dopage). Puis, nous avons cherché les conditions expérimentales d'anodisation électrochimique pour chaque substrat, à savoir la composition de l'électrolyte et la gamme de densité de courant à appliquer pour l'obtention de couches simples de silicium poreux (SiP) les plus adaptées à notre application (surface spécifique élevée et pores suffisamment ouverts pour l'infiltration des biomolécules IgG). Ensuite nous avons mis en place un procédé de fonctionnalisation chimique et biologique de la surface interne de ces échantillons. Ce procédé nécessite une silanisation de la surface oxydée des cristallites, puis la fixation d'un agent de couplage aldéhyde et enfin la fixation du biorécepteur (anticorps anti-glucagon).

Dans ce chapitre nous présenterons d'abord la méthode et l'appareillage utilisés pour l'élaboration du silicium poreux. Puis, nous expliquerons le protocole chimique utilisé pour la biofonctionnalisation. Ensuite, nous présenterons les résultats d'une étude préliminaire que nous avons mené dans l'objectif de caractériser la morphologie de silicium poreux élaboré avec des substrats de Si de type P<sup>+</sup>. Enfin, nous décrirons les techniques de caractérisation chimique que nous avons exploitées au cours de cette thèse pour le suivi de la fonctionnalisation du silicium poreux.

### 2.1 Élaboration et biofonctionnalisation des monocouches de silicium poreux

L'obtention du silicium poreux est assurée par un procédé de gravure humide appelé anodisation électrochimique. Ce procédé consiste à appliquer un champ électrique entre une cathode métallique (en or ou en platine) et une anode constituée par le substrat de silicium à graver, l'ensemble est plongé dans une cellule contenant un électrolyte à base d'acide fluorhydrique (HF). Dans des conditions expé-

rimentales particulières (concentration du HF [HF], densité du courant J, température, illumination), cet acide provoque une dissolution du silicium formant une structure poreuse de morphologie bien définie. Ainsi, comme nous le verrons plus loin, les conditions d'anodisation (la densité du courant J et la composition de l'électrolyte), seront optimisées (en fonction du type du substrat de silicium utilisé) pour obtenir des monocouches de silicium poreux avec des surfaces spécifiques importantes et des tailles de pores suffisantes pour permettre la fonctionnalisation. En effet, les principaux paramètres caractérisant la morphologie du silicium poreux sont la porosité, la taille des pores et la surface spécifique. Pour un substrat défini, chacun de ces paramètres est étroitement lié d'une part à la densité du courant et d'autre part à la composition de l'électrolyte en acide fluorhydrique. Quant à l'épaisseur de la couche poreuse, elle n'est fonction que de la durée d'anodisation.

Nous allons maintenant décrire les différents paramètres d'anodisation et le matériel utilisé.

## 2.1.1 Anodisation électrochimique

### a. Type de substrats de silicium

Pour obtenir des couches de silicium poreux avec les caractéristiques physiques les plus adaptées à notre application de biodétection (une surface spécifique élevée et des pores suffisamment ouverts pour introduire des molécules d'albumines (de taille égale à 7 nm environ) ou des anticorps (de taille égale à 17 nm environ)), nous avons expérimenté un type de substrat de silicium ( $P^+$ ) fortement dopé avec des atomes de bore (B), de résistivité comprise entre 3 et  $7 \cdot 10^{-3} \Omega \cdot \text{cm}$  et d'orientation cristalline (100).

### b. Electrolytes d'anodisation

L'anodisation électrochimique du silicium se déroule à température ambiante ( $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) dans une solution hydroalcoolique d'acide fluorhydrique (HF) appelée électrolyte d'anodisation. Cet électrolyte d'anodisation a été préparé à partir des réactifs suivants : une eau désionisée ultrapure (résistivité égale à  $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ) obtenue à partir d'un appareil Aquadem, de l'éthanol à 99 % de qualité MOS (Technic France) et une solution aqueuse d'acide fluorhydrique 50 % (Technic France).

La composition de cet électrolyte a été ajustée afin d'obtenir des échantillons de silicium poreux permettant au mieux l'infiltration et la fixation des molécules biologiques BSA (Bovine Serum Albumin) et anti-glucagon (tableau 2.1).

Composants	Eau	Ethanol	HF
Quantités (%)	50	40	10

Tableau 2.1 – Composition en pourcentage de l'électrolytes d'anodisation. Soit une concentration de HF égale à 10 % ([HF] = 10 %).

### c. Densité du courant

La densité du courant est le rapport entre l'intensité du courant appliquée et la surface du substrat du silicium anodisé (en contact avec l'électrolyte d'anodisation). Plusieurs densités du courant (de 25 à  $53 \text{ mA.cm}^{-2}$ ) ont été expérimentées pour l'élaboration de nos échantillons de silicium poreux.

### d. Cellule d'anodisation

La cellule d'anodisation utilisée (figure 2.1) est en téflon (matériau résistant à l'acide fluorhydrique), de forme cylindrique et permettant de travailler avec deux configurations différentes : (i) cathode en platine horizontale et donc parallèle à la surface du substrat de silicium et (ii) cathode en platine sur le côté et donc perpendiculaire à la surface du substrat Si. Dans la cellule d'anodisation nous avons introduit un agitateur à hélice. Cet agitateur assure l'homogénéité de l'électrolyte en renouvelant la solution au contact du substrat de silicium et en évacuant les bulles de  $H_2$  formées au cours de l'anodisation. Dans cette cellule, nos couches poreuses ont été élaborées sur une surface circulaire égale à  $1 \text{ cm}^2$ .

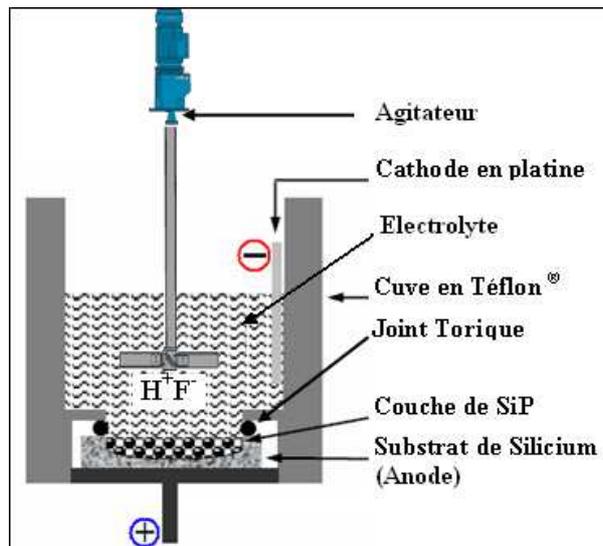


Figure 2.1 – Schéma de la cellule utilisée pour la formation du SiP.

### e. Sources de courant

Durant cette thèse, l'anodisation électrochimique a été réalisée en utilisant deux types de générateurs de courant suivants : le Keithley 228A et le Keithley 2400. Le premier fonctionne en pilotage manuel assuré par une console de programmation digitale et est utilisé pour l'élaboration d'échantillons de silicium poreux à nombre de couches réduit (monocouches, bicouches et tricouches). Le

fonctionnement du second est automatisé par l'intermédiaire d'une carte GPIB pilotée par une interface générée par le logiciel National Instruments LabVIEW 7.1. Il nous a servi pour la réalisation de structures poreuses multicouches, notamment les microcavités, qui nécessitent des couches poreuses de faibles épaisseurs de l'ordre de  $\lambda/4$ .

### f. Gravure RIE (Reactive Ion Etching)

La gravure ionique réactive est une technique de gravure sèche de matériaux. Cette technique consiste à générer un plasma sous basse pression par un ou plusieurs champs électro-magnétiques. Les ions de haute énergie du plasma attaquent physiquement et réagissent chimiquement avec la surface de l'échantillon.

Un bâti de gravure RIE de type NEXTRAL 110 a été utilisé au cours de cette thèse afin d'éliminer la couche superficielle du silicium poreux. Cette couche de faible épaisseur (quelques dizaines de nanomètres) et de porosité réduite, se forme à la surface du substrat du silicium au début du processus d'anodisation électrochimique [107, 149] empêchant ainsi la fonctionnalisation [150]. Les paramètres fixés pour cette gravure sont la nature et le débit du gaz ( $\text{SF}_6$  / 5 sccm), la puissance et la pression du plasma (50 W / 10 mTorr) ainsi que la durée de gravure (30 s).

### 2.1.2 Biofonctionnalisation

La biofonctionnalisation est l'ensemble des traitements appliqués aux échantillons de silicium poreux afin de fixer le biorécepteur immunologique (Anticorps anti-glucagon) à la surface interne des pores. Le procédé que nous avons mis en place au cours de cette thèse est représenté sur la figure 2.2. Ce procédé commence par un traitement thermique pour oxyder la surface interne des pores (SiP  $\rightarrow$  SiP-S1), suivi par une réaction de silanisation (SiP-S1  $\rightarrow$  SiP-S2), puis un couplage di-aldéhyde (SiP-S2  $\rightarrow$  SiP-S3) et enfin un greffage covalent des biomolécules (SiP-S3  $\rightarrow$  SiP-S4).

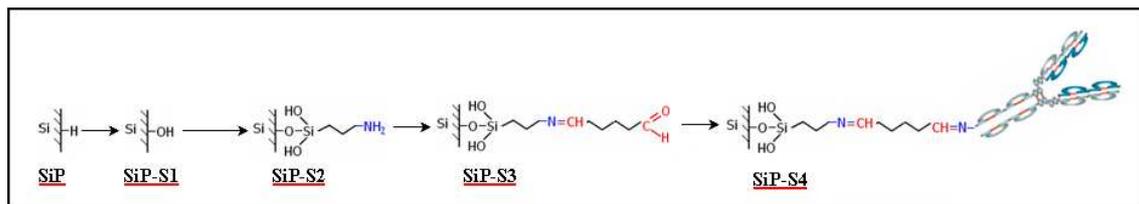


Figure 2.2 – Schéma des différentes étapes de la biofonctionnalisation.

### a. Traitement thermique

Le traitement thermique des échantillons du SiP consiste à les placer à une température élevée et sous flux d'oxygène pendant une certaine durée. L'objectif de cette étape est d'oxyder la surface des cristallites (oxydation partielle) en transformant les groupements hydrophobes -Si-H en groupement hydrophiles Si-OH ou -Si-O-Si- (figure 2.2 étape SiP-S1). Ceci permettra d'une part d'améliorer la mouillabilité des échantillons et ainsi l'infiltration des solutions aqueuses à l'intérieur des pores. D'autre part le traitement thermique permet d'améliorer la stabilité chimique des structures poreuses dans le temps en évitant le processus d'oxydation spontanée.

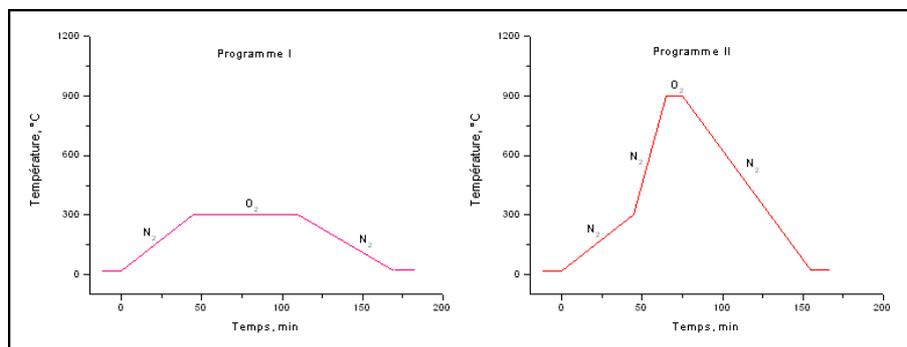


Figure 2.3 – Programmes de traitement thermiques utilisés pour l'oxydation du silicium poreux.

Cette étape utilise un four tubulaire à trois zones (Nabertherm) avec un système de régulation permettant de programmer des paliers et des rampes de températures allant jusqu'à 1200°C. Deux programmes de traitements thermiques ont été utilisés pour l'oxydation de nos échantillons de silicium poreux (figure 2.3) :

- Un programme d'oxydation à basse température (programme I, 300°C/60 minutes) appliqué avec le protocole de silanisation par immersion.
- Un programme d'oxydation à température élevée (programme II, 900°C/10 minutes) appliqué avec le protocole de silanisation par imprégnation.

### b. Réactifs de fonctionnalisation

Des solutions tampons, réactives et de lavage ont été préparées afin de réaliser les différentes étapes de fonctionnalisation des échantillons de silicium poreux. Les réactifs utilisés pour la préparation de ces solutions sont les suivants : eau désionisée ultrapure (18 M $\Omega$ .cm), solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène 30 % (Prolabo), acide sulfurique (Prolabo), (3aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) (Aldrich), méthanol (Prolabo), solution aqueuse de glutaraldéhyde 50 % (Sigma-Aldrich), Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique "HEPES" (Sigma), Chlorure de sodium (Sigma), hydroxyde de sodium (Prolabo), solution aqueuse de cyanoborohydride de Sodium 5 M

contenant du chlorure de sodium 1M (Aldrich), albumine sérique bovine (BSA : Bovine Serum Albumin) (Aldrich), anticorps monoclonal anti-glucagon sous forme de liquide ascitique de souris contenant 10,6 mg/ml d'immunoglobuline IgG (Sigma), Polyéthylène glycol sorbitan monostearate "Tween® 60" (Sigma), solution aqueuse d'acide phosphorique à 85 % (Prolabo), tampon phosphate pH 7,4 contenant du Tween® 20 (Fluka), chlorure d'éthanolamine (Sigma) et azide de sodium (Fluka).

### c. Protocole de fonctionnalisation

Le procédé de fonctionnalisation de la surface interne des pores est composé de trois étapes qui sont successivement :

- La préactivation de la surface de silice par une réaction de silanisation (figure 2.2 étape SiP-S2) :

Cette étape nécessite la présence de groupements silanols (-Si-OH) à la surface des cristallites. Ceci a été assuré par la réaction d'une solution piranha ( $H_2SO_4 : H_2O_2$  à 30 %, 3 : 1) avec l'échantillon oxydé thermiquement pendant 30 minutes. La surface de silice est modifiée après par des molécules de silanes (silanisation) afin de créer des groupements réactifs (-NH<sub>2</sub>). Pour cette réaction nous avons expérimenté deux protocoles différents.

\* Le premier consiste à l'immersion de l'échantillon poreux dans 5 ml d'une solution anhydre (dans du toluène) d'APTES pendant une heure suivie par un séchage prolongé à 150°C pendant 15 heures. Plusieurs concentrations d'APTES ont été testées afin de déterminer l'influence de ce paramètre sur la fixation et l'organisation en monocouche des silanes à la surface des pores.

\* Le deuxième protocole consiste à l'imprégnation de 50 µl d'une solution hydroalcoolique (eau : méthanol, 1 : 1) d'APTES 4 % déposée sur la surface de l'échantillon de silicium poreux pendant 20 minutes dans un environnement saturé en humidité. Cette étape s'achève par un séchage rapide pendant 10 minutes dans une étuve à 100°C.

- La fixation d'un agent de couplage bifonctionnel (figure 2.2 étape SiP-S3) :

L'agent de couplage que nous avons choisi est le glutaraldéhyde. Cette molécule est symétrique et présente deux extrémités aldéhyde (-CH=O). Cette étape consiste à faire réagir une des deux extrémités aldéhyde (-CH=O) du glutaraldéhyde avec le groupement amine primaire (-NH<sub>2</sub>) généré par la silanisation. Pour cela, une solution de 50 µl de glutaraldéhyde à 2,5 % dans un tampon HEPES 20 mM pH 7 contenant 150 mM de chlorure de sodium est déposée. Un µl d'une solution de cyanoborohydrure de sodium 5M dans du NaOH 1M est ensuite rajouté pour réagir avec la solution précédente et l'échantillon pendant 2 heures. Un lavage au tampon HEPES finit cette étape pour éliminer les molécules de glutaraldéhyde n'ayant pas réagi (donc celles qui sont en excès).

- Le greffage de biomolécules (figure 2.2 étape SiP-S4) :

L'immobilisation des protéines, albumine BSA ou immunoglobulines IgG, à la surface des cristallites s'est faite par la réaction des groupements amines lairs contenus dans ces molécules (par la présence d'acides aminés Lysine et Arginine) avec les aldéhydes fixés au cours de l'étape précédente de fonctionnalisation. Pour cette étape, nous avons procédé selon le protocole décrit ci-après : nous avons déposé 50  $\mu\text{l}$  de la protéine en solution (BSA à 10 mg/ml ou l'IgG à 1,06 mg/ml) dans du tampon phosphate 5 mM pH 7 à 150 mM de chlorure de sodium et contenant 0,5 % de Tween® 60 sur la surface de l'échantillon poreux. La durée de réaction est de deux heures. Puis nous avons effectué trois lavages successifs : le premier au tampon phosphate pH 7,4 contenant du Tween® 20, le second au tampon phosphate pH 7 et le dernier avec une solution de chlorure d'éthanolamine 3 M dans du tampon phosphate pH 7 afin d'éliminer les protéines adsorbées (sans fixation covalente) à la surface de l'échantillon.

## 2.2 Caractérisation morphologique du silicium poreux

### 2.2.1 Contexte

Connaissant les variétés morphologiques poreuses pouvant être obtenues par gravure électrochimique du silicium monocristallin [107] (figure 2.4), il est important de prévoir l'aptitude de chacune de ces formes nanométriques à accueillir par capillarité des solutions contenant des molécules organiques de différentes tailles (allant de 7 Å pour la glutaraldéhyde à 17 nm pour l'IgG).

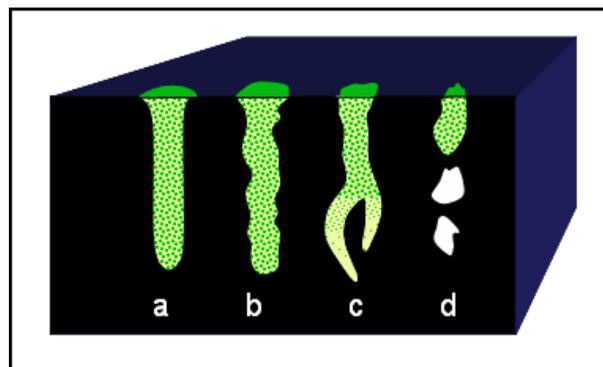


Figure 2.4 – Illustration schématique de la qualité du remplissage par capillarité d'une solution dans des pores en fonction de leurs structures. (a) et (b) Remplissage total et répartition homogène du liquide dans les pores continus non ramifiés, (c) répartition hétérogène du liquide dans le volume des pores ramifiés et (d) remplissage partiel des pores discontinus de formes aléatoires [adaptée de la figure 1.21]

En effet, l'infiltration homogène et rapide de ces solutions lors de la fonctionnalisation du matériau et pendant la biodétection dans tout le volume poreux de l'échantillon nous semble être indispensable

pour la conception du biocapteur immunologique du glucagon. Cette infiltration nécessite d'abord l'absence de volumes poreux isolés comme ceux observés avec les pores discontinus de formes aléatoires (figure 2.4d). La ramification d'un pore, souvent accompagnée d'un rétrécissement de sa section, peut être à l'origine d'un remplissage inhomogène et la rétention préférentielle des substances organiques dans les parties supérieures du volume (figure 2.4c). Ce phénomène est essentiellement prévisible avec les solutions colloïdales de biomolécules de grande taille. L'écoulement d'un liquide dans tout le volume poreux et avec une répartition homogène des substances véhiculées nous semble être possible dans des pores suffisamment ouverts, de forme continue et sans ramifications (figures 2.4a et b). Sachant que l'obtention de l'une ou l'autre morphologie des pores ne dépend que des conditions expérimentales d'élaboration électrochimique du silicium poreux, nous avons effectué une étude morphologique préliminaire. L'objectif de cette étude était de déterminer la densité de courant ainsi que la concentration en acide fluorhydrique de l'électrolyte d'anodisation nécessaires pour obtenir des pores continus sans ramification et de sections assez ouvertes avec des substrats de silicium de type  $P^+$ , dopés avec des atomes de bore (B) et de résistivité comprise entre 3 et  $7.10^{-3}\Omega.cm$ . L'ouverture minimale des pores que nous avons présumée favorable à l'infiltration des anticorps anti-glucagon dans tout le volume poreux et leur répartition homogène par liaisons covalentes à la surface interne du silicium poreux préactivée (silanisée et recouverte de glutaraldéhyde) était de 50 nm. En effet, nous avons supposé que des pores d'ouvertures supérieures ou égales à 50 nm permettrait le passage sans difficulté des molécules d'anticorps anti-glucagon de taille égale à 17 nm même après leur rétrécissement sous l'effet des étapes ultérieures de la fonctionnalisation chimique (traitement thermique, silanisation et fixation de l'agent de couplage).

### 2.2.2 Etude de la morphologie et de la taille des pores

Nous avons commencé notre travail expérimental par une étude préliminaire étudiant la morphologie et la taille des pores du silicium poreux élaboré à différentes conditions de densité de courant. L'objectif principal de cette étude a été l'identification du ou des types de silicium poreux (ramifié, continu ou discontinu) obtenus par anodisation électrochimique de substrat de Si type  $P^+$ . Cette identification structurale a été assurée par des observations en microscopie électronique à balayage des coupes transversales des échantillons de silicium poreux réalisés avec des densités de courant variant de 25 à 50  $mA.cm^{-2}$ . L'appareil utilisé est un MEB HITACHI S-2500 connecté à un ordinateur équipé du Logiciel d'acquisition et de traitement d'image AXONE (NEWTEC). Sur la figure 2.5 sont présentés les résultats des analyses microscopiques réalisées en coupe transversale (figure 2.5-a et b) et sur la surface (figure 2.5-c et d) d'un échantillon de silicium poreux élaboré avec une densité de courant égale à 50  $mA.cm^{-2}$ . Pour toutes les densités de courant étudiées, les parties inférieures des images MEB des coupes transversales des monocouches de silicium poreux révèlent une morphologie continue et sans ramifications. Vraisemblablement à cause du niveau de contraste faible des images prises dans les parties supérieures des couches poreuses, ces observations

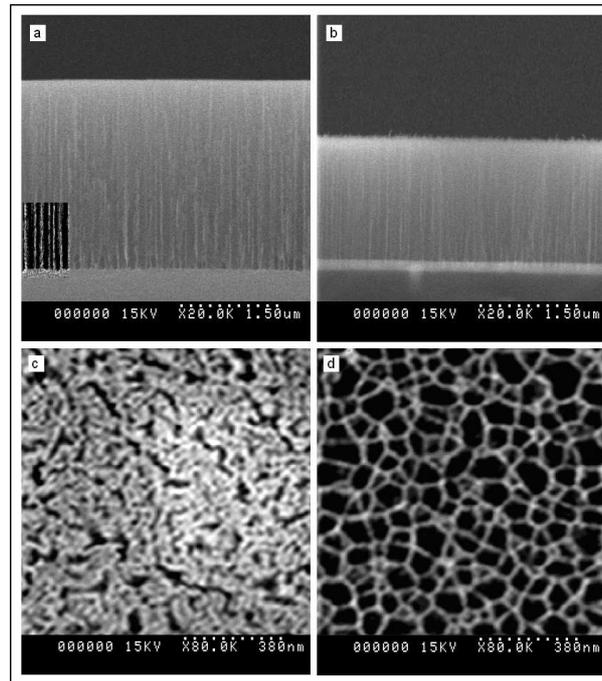


Figure 2.5 – Exemple d'observations microscopiques pour la caractérisation structurale d'une monocouche de silicium poreux. a et b : Micrographies MEB d'une coupe transversale d'un échantillon de silicium poreux avant et après gravure RIE. c et d : Micrographies MEB d'une surface d'un échantillon de silicium poreux avant et après gravure RIE.

n'ont pas permis de confirmer la morphologie continue non ramifiée des pores observée dans les parties inférieures de la couche poreuse.

L'observation microscopique de la surface du silicium poreux obtenue dans ces conditions, nous a révélé la présence de sections de pores de petites dimensions ainsi que des formes creuses et allongées (figure 2.5-c). Ne correspondant pas aux sections des pores observés en profondeur de la coupe transversale de l'échantillon, ces structures superficielles nous semblaient être parasites et susceptibles d'entraver l'infiltration des molécules organiques, et surtout celles de grande taille (les immunoglobulines) dans les parties ouvertes des pores. Ainsi, nous avons employé la gravure RIE afin d'éliminer cette couche de faible porosité. Après gravure RIE d'une partie de l'épaisseur de la couche poreuse, l'échantillon de silicium poreux présente une surface plus homogène composée de sections de pores plus ouvertes et de forme polygonale séparées par les cristallites de silicium (figure 2.5d). Ces observations nous ont permis de déduire que le silicium poreux obtenu dans ces conditions est très probablement constitué de pores en forme de "bouteille". La structuration en forme de bouteille des pores, rapportée dans des travaux japonais dans les années soixante-dix [151, 152], entraîne la formation d'une "couche superficielle" de faible épaisseur contenant les parties supérieures des pores qui sont étroites et de faible porosité [107] (figure 2.6). Durant ma thèse, l'élimination de cette couche de surface, nécessaire pour l'infiltration des molécules organiques dans la couche poreuse, a été assurée par la gravure RIE.

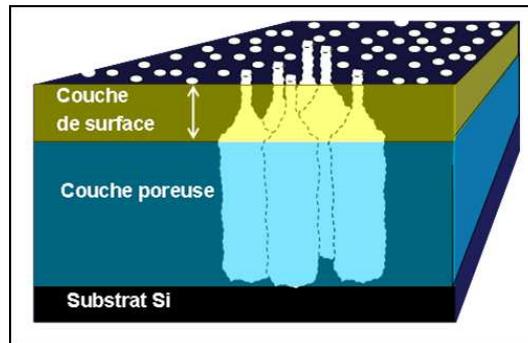


Figure 2.6 – Représentation schématique de la structure en bouteille d'une couche de silicium poreux.

L'analyse des images obtenues par MEB à la surface d'un échantillon de silicium poreux (préalablement gravé par RIE) permet de mesurer les surfaces des sections poreuses ( $A_F$ ) et d'en déduire les diamètres équivalents ( $D$ ) selon la relation 2.1. Ceci nous a permis d'estimer le diamètre moyen ainsi que la distribution de la taille des pores constituant l'échantillon et de formes géométriques assimilées à des cylindres. L'incertitude avec laquelle le diamètre a été estimée dépend de la qualité et de l'agrandissement utilisé de l'image obtenue par MEB.

$$D = \sqrt{\frac{4A_F}{\pi}} \quad (2.1)$$

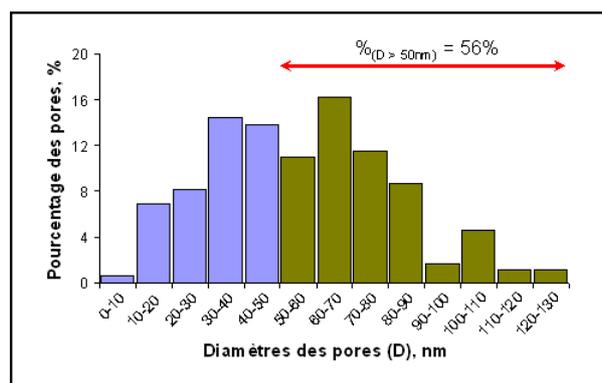


Figure 2.7 – Histogramme représentant la distribution de la taille des pores en surface d'une monocouche de silicium poreux. Conditions d'anodisation : Substrat Si P<sup>+</sup>(B)~4.10<sup>-3</sup> Ω.cm, t = 120 s, [HF] = 10 %.

Par exemple l'analyse de l'image micrographique, présentée sur la figure 2.5.d et considérée représentative de toute la surface de l'échantillon de silicium poreux correspondant, a permis d'obtenir

la distribution de taille des pores portée sur la figure 2.7. On en déduit que la taille des pores de l'échantillon analysé varie entre 9 et 137 nm et que 56 % des pores ont des diamètres supérieurs ou égaux à 50 nm. Le diamètre moyen de ces pores est estimé égal à 56 nm avec une incertitude de 5 nm.

Après avoir identifié la structure générale des couches poreuses, et dans l'objectif de déterminer les conditions d'anodisation électrochimique nécessaires à l'élaboration de monocouches de silicium poreux adaptées pour la mise en oeuvre du protocole de biofonctionnalisation, nous avons étudié l'évolution de la taille des pores du matériau en fonction du courant d'anodisation sur ce type de substrat. Ainsi, nous avons préparé des échantillons de silicium poreux en appliquant des densités de courant variant de 25 à 50 mA.cm<sup>-2</sup>.

<b>Densité du courant (mA.cm<sup>-2</sup>)</b>	25	30	35	40	45	50
<b>Diamètre moyen (nm)</b>	28	30	32	34	53	56
<b>% Diamètre &gt; 50nm</b>	0,3	1,5	3,5	11,11	53,85	56

Tableau 2.2 – Diamètre moyen et pourcentage de pores de taille supérieure à 50 nm pour des monocouches de silicium poreux élaborées à des densités de courants différentes.

Les résultats des observations microscopiques en surface de ces échantillons sont présentés dans le tableau 2.2. Nous constatons que l'augmentation de la densité du courant d'anodisation de 25 à 50 mA.cm<sup>-2</sup> entraîne une augmentation du diamètre moyen des pores de 28 à 56 nm. Le pourcentage de pores de diamètre supérieur à 50 nm a lui aussi augmenté pour passer de 0,3 % pour l'échantillon de silicium poreux élaboré avec une densité de courant égale à 25 mA.cm<sup>-2</sup> à 56 % sous une densité de courant de 50 mA.cm<sup>-2</sup>. Afin de mieux illustrer cette évolution morphologique du silicium poreux nous avons présenté les résultats du tableau 2.2 sous forme de courbes (figure 2.8).

Sur la courbe (I), nous avons constaté que l'évolution du diamètre moyen des pores (Dm) en fonction de l'augmentation de la densité de courant suit une courbe croissante composée de trois phases. Une première phase (25 mA.cm<sup>-2</sup> < J < 40 mA.cm<sup>-2</sup>) faiblement ascendante sur laquelle les ouvertures des pores sont élargies de l'ordre de 0,4 nm par mA.cm<sup>-2</sup>. Les monocouches poreuses formées sous ces densités de courant sont de type mésoporeux (Dm < 50 nm). L'élargissement des pores est beaucoup plus rapide (3,8 nm par mA.cm<sup>-2</sup>) en augmentant la densité de courant de 40 à 45 mA.cm<sup>-2</sup> d'où la forte pente de la courbe à ce niveau. Cette partie de la courbe représente le passage du type mésoporeux au type macroporeux. La troisième partie de la courbe, de pente faible (0,6 nm/mA.cm<sup>-2</sup>), marque la limite de l'élargissement des pores à un diamètre moyen de 56 nm pour une densité de courant égale à 50 mA.cm<sup>-2</sup>. En effet l'application d'une densité de courant égale à 55 mA.cm<sup>-2</sup> a entraîné l'apparition du phénomène d'électropolissage sur une partie de l'échantillon. A 60 mA.cm<sup>-2</sup>, nous n'avons pas obtenu de couche poreuse et l'électropolissage s'est étendu sur toute la surface du substrat de silicium anodisé. La courbe (II) représentant l'évolution du pourcen-

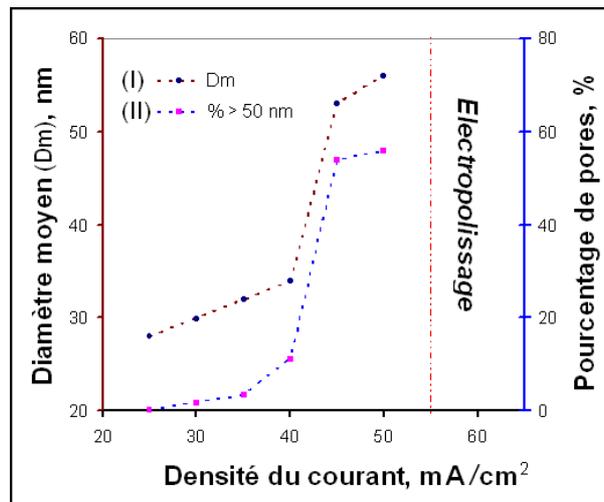


Figure 2.8 – Evolution de la taille des pores en fonction de la densité de courant d’anodisation appliquée lors d’élaboration de monocouches de silicium poreux. Conditions d’anodisation : Substrat Si P<sup>+</sup>(B)  $\rho \approx 4.10^{-3} \Omega.cm$ ,  $t = 120$  s, HF 10 %.

tage de pores de diamètre supérieur à 50 nm en fonction de l’augmentation de la densité de courant appliquée a une allure similaire à la première courbe (I). On distingue en effet deux parties extrêmes correspondant à la formation de monocouches principalement mésoporeuses à des densités de courant inférieures à  $40 \text{ mA.cm}^{-2}$  (le pourcentage des pores de diamètre inférieur à 50 nm est supérieur à 88 %) et l’élaboration de monocouches principalement macroporeuses à des densités de courant supérieures à  $45 \text{ mA.cm}^{-2}$  (le pourcentage des pores de diamètre supérieur à 50 nm est supérieur à 53 %). La partie médiane de la courbe correspond à la transition mésoporeux/macroporeux.

Ayant supposé 50 nm comme taille de pore minimale favorable à notre application de biodétection, la densité de courant d’anodisation qui nous a semblé la plus adaptée pour effectuer les études de fonctionnalisation sur des monocouches de silicium poreux élaborés sur des substrats de type P<sup>+</sup> serait égale à  $50 \text{ mA.cm}^{-2}$ .

En plus de la taille moyenne des pores et de leur morphologie, la porosité ainsi que la surface spécifique des échantillons poreux à fonctionnaliser sont des paramètres critiques dont la détermination permet de mieux définir le critère que doit remplir la structure poreuse pour l’application envisagée. De plus ces différents paramètres sont liés entre eux.

### 2.2.3 Surface spécifique

La surface spécifique généralement élevée que développe le silicium poreux constitue la propriété structurale motivant son utilisation dans la conception des biocapteurs. Pour déterminer la surface spécifique de nos échantillons de silicium poreux, nous avons cherché à établir une relation mathématique simple entre ce paramètre et les autres paramètres structuraux (porosité, diamètre moyen des

pores...etc). Ceci nous a amené à simuler la forme géométrique des pores à des cylindres de dimensions identiques (figure 2.9).

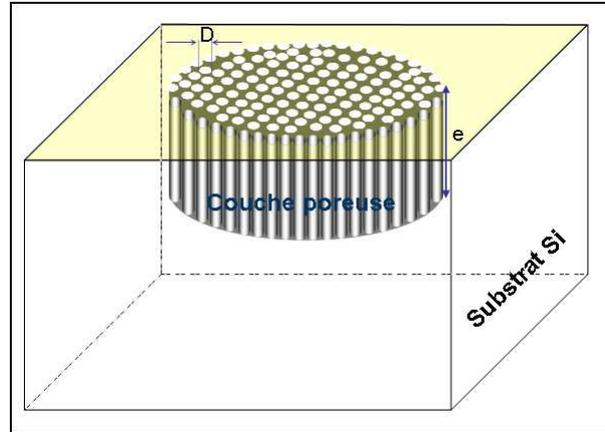


Figure 2.9 – Présentation schématique d'une monocouche de silicium poreux utilisée pour le calcul de la surface spécifique.

Selon ce schéma, la surface totale développée par les cristallites d'une couche poreuse " $A_c$ " peut être exprimée par la relation suivante :

$$A_c = N\pi D e + A_s \quad (2.2)$$

Avec " $N$ " : nombre de pores contenus dans l'échantillon, " $D$ " : diamètre moyen des pores, " $e$ " : épaisseur de la couche poreuse et  $A_s$  : surface de l'échantillon à l'interface air/couche poreuse. En reliant " $N$ " à la porosité de l'échantillon " $p$ " :

$$N = \frac{pA_s}{\pi\left(\frac{D}{2}\right)^2} \quad (2.3)$$

l'équation exprimant la surface " $A_c$ " devient :

$$A_c = \frac{pA_s D e}{\left(\frac{D}{2}\right)^2} + A_s = A_s \left(1 + \frac{4pe}{D}\right) \quad (2.4)$$

Définie comme étant la surface développée par les parois des pores de l'échantillon par unité de volume occupé par la couche poreuse, la surface spécifique " $S_s$ " est équivalente au rapport de la surface  $A_c$  par le volume occupé par la couche poreuse " $V = eA_s$ ". Ainsi, et en négligeant  $A_s$  la surface spécifique " $S_s$ " (en  $m^2.cm^{-3}$ ) peut être exprimée en fonction de la porosité " $p$ " (comprise entre 0 et 1) et le diamètre moyen " $D$ " (en nm) selon la relation suivante :

$$S_s = \frac{A_c}{V} = \frac{4000p}{D} (m^2.cm^{-3}) \quad (2.5)$$

La détermination de la surface spécifique contribue à une caractérisation structurale plus complète des couches poreuses élaborées. Par ailleurs, ce paramètre peut être relié à la fraction volumique des substances organiques contenues dans les pores permettant, comme nous le verrons plus loin, d'estimer l'épaisseur de la couche de silane fixée et la densité de recouvrement des cristallites par des éléments biologiques tels que les anticorps anti-glucagon et des molécules d'albumine.

#### 2.2.4 Détermination de la Porosité

Plusieurs modèles théoriques appelés "modèles du milieu effectif" (Maxwell Garnett, Looyenga, Bruggeman...etc.) [153] ont permis d'établir des relations mathématiques entre la porosité du silicium poreux et son indice de réfraction. Le modèle de Bruggeman est le modèle le plus exploité. L'utilisation de ce modèle permet de calculer la porosité du silicium poreux selon la relation suivante :

$$p = 1 - \left[ \frac{(1 - n_{SiP}^2)(n_{Si}^2 + 2n_{SiP}^2)}{3n_{SiP}^2(1 - n_{Si}^2)} \right] \quad (2.6)$$

Avec  $n_{SiP}$  l'indice effectif de la couche poreuse et  $n_{Si}$  l'indice du silicium massif ( $3,500 \pm 0,057$  dans le proche infrarouge soit entre 900 et 2000 nm). Pour déterminer l'indice  $n_{SiP}$ , des techniques optiques comme la spectroscopie m-lines, l'ellipsométrie et l'interférométrie ont été utilisées dans la littérature. Toutes ces techniques sont non destructives et permettent d'obtenir des valeurs de porosité similaires à celles trouvées par gravimétrie.

Ayant choisi l'interférométrie comme technique de transduction pour notre application de biodétection, nous avons décidé d'exploiter cette même technique pour la détermination de la porosité de nos échantillons de silicium poreux.

### Méthode

La technique interférométrique est une technique spectroscopique exploitant les propriétés de réflectivité optique des films minces. Elle consiste à envoyer un faisceau lumineux monochromatique à la surface du silicium poreux et à récolter par la suite la lumière réfléchiée par cette surface. En faisant varier la longueur d'onde de la lumière incidente, un spectre de réflectance constitué de franges d'interférences caractéristiques des couches situées à la surface de l'échantillon est obtenu.

L'appareillage que nous avons utilisé au cours de cette thèse est un spectromètre UV/VIS/NIR "Lambda 900" (Perkin Elmer) équipé d'un accessoire de réflectance spéculaire (angle 6°) et couvrant la zone spectrale 200 - 2000 nm. Le spot d'illumination utilisé avec cet appareil est rectangulaire de longueur 7 mm et de largeur 4 mm. Cet appareil est piloté par le logiciel UV winLab qui permet aussi l'acquisition des spectres. Malgré l'acquisition lente (34 s/100 nm), cet appareil présente l'avantage de travailler en proche infrarouge (1000 nm à 2000 nm). En effet, sur cette zone spectrale (à partir de 1100 nm), le silicium est transparent. Il en découle une meilleure exploitation du spectre de réflectance pour la détermination de l'indice de réfraction de l'échantillon de silicium poreux analysé.

Dans le cas d'un échantillon de silicium poreux monocouche (figure 2.10), le système se comporte comme une lame à faces planes et parallèles d'indice  $n_1$  placé entre deux milieux d'indices  $n_0$  et  $n_2$ . Ce système est un interféromètre. Il permet l'observation de franges d'égales inclinaisons [154].

Ainsi, le spectre de réflectance d'une monocouche poreuse est constitué de franges d'interférences alternant des pics et des vallées à des longueurs d'onde caractéristiques. L'exploitation de ces longueurs d'onde en proche infrarouge (1100 nm à 2000 nm) permet de calculer l'indice de réfraction de la couche poreuse analysée. En effet, sur cette zone spectrale, le silicium est transparent (la partie réelle de son indice varie très peu alors que la partie imaginaire ( $k_2$ ) est très proche de zéro (figure 2.10.b)) et l'indice de réfraction "n" d'une couche poreuse est quasiment constant. Les maxima  $\lambda_p^m$  sont alors liés au trajet optique "ne" ainsi qu'à l'ordre spectral "m" de la frange d'interférence par la relation de Fabry Pérot :

$$2ne = m\lambda_p^m \pi \quad (2.7)$$

L'ordre d'une frange d'interférence est un nombre entier qui vérifie l'équation suivante :

$$2m < \frac{\lambda_v^{m-0,5}}{\lambda_v^{m-0,5} - \lambda_p^m} < 2(m+1) \quad (2.8)$$

Avec  $\lambda_p^m$  la longueur d'onde du maximum de la frange d'interférence et  $\lambda_v^{m-0,5}$ , la longueur d'onde du minimum situé à droite de  $\lambda_p^m$ . Ainsi, la détermination de "m" et l'application de la relation de Fabry Pérot (équation 2.7) permettent de déduire l'épaisseur optique de la couche poreuse.

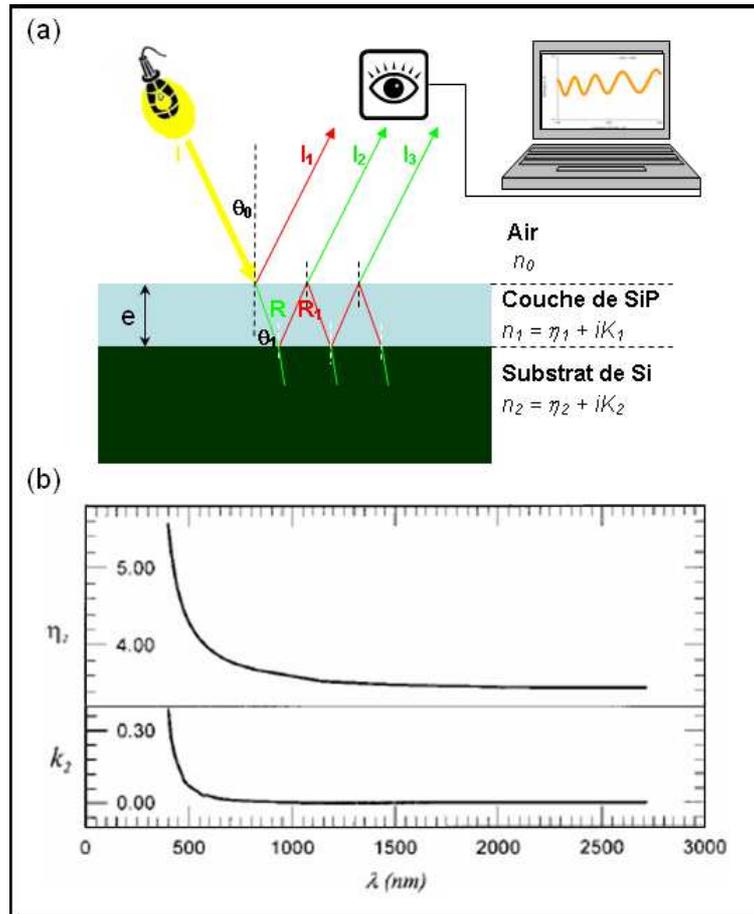


Figure 2.10 – (a) Schéma du principe de la technique interférométrique appliquée sur une monocouche de silicium poreux élaborée sur substrat de silicium et (b) spectres de dispersion de l'indice de réfraction du silicium ( $n_2$ ) et du coefficient d'extinction ( $k_2$ ) [131].

Connaissant l'épaisseur de la couche poreuse de l'échantillon mesurée après analyse au MEB, l'indice est alors calculé et la porosité est déduite par la relation 2.6.

Le champ d'application de cette méthode simple et directe de détermination des paramètres physiques à partir de la relation de Fabry Pérot et l'ordre spectral  $m$  est limité aux monocouches de silicium poreux composés de silicium et de l'air. Ainsi, seuls les échantillons de silicium poreux élaborés dans cette étude morphologique préliminaire ont été caractérisés suivant cette méthode de calcul.

Une autre méthode utilisant un calcul plus complexe sera décrite dans la section 2.3.1 afin de caractériser des structures poreuses chimiquement modifiées intégrant des éléments autres que le silicium et l'air (silice et substances organiques).

## Résultats

Des échantillons de silicium poreux monocouche ont été élaborés dans les mêmes conditions d'anodisation électrochimique. Ces conditions, qui sont celles qui ont été fixées à la fin de la section

2.2.2, permettent d'obtenir dans chaque couche poreuse plus de 50 % des pores de taille supérieure à 50 nm. Tenant compte de l'épaisseur de  $3 \pm 0,1 \mu\text{m}$  mesurée au MEB sur des couches poreuses élaborées avec une durée d'anodisation égale à 120 s, une durée d'anodisation égale à 200 s a été choisie afin d'obtenir des couches poreuses d'épaisseur avoisinant les  $5 \mu\text{m}$ . Chaque échantillon ainsi élaboré a été gravé par RIE dans un plasma de gaz  $\text{SF}_6$  à un débit égal à 5 sccm, une puissance de 50 W, une pression de 10 mTorr et une durée de 30 s. L'analyse au spectromètre de chaque échantillon avant et après gravure RIE, a permis d'obtenir les spectres de réflectance correspondants dans le domaine spectral 200 - 2000 nm (figure 2.11). Les maxima de réflectivité observés constituent les pics des franges d'interférence. Ils sont localisés à des longueurs d'onde  $\lambda_p^m$  situés entre les minima (vallées)  $\lambda_v^{m+0,5}$  et  $\lambda_v^{m-0,5}$ . "m" correspond à l'ordre spectral des franges. Ce paramètre a été déterminé par l'application de l'équation 2.8.

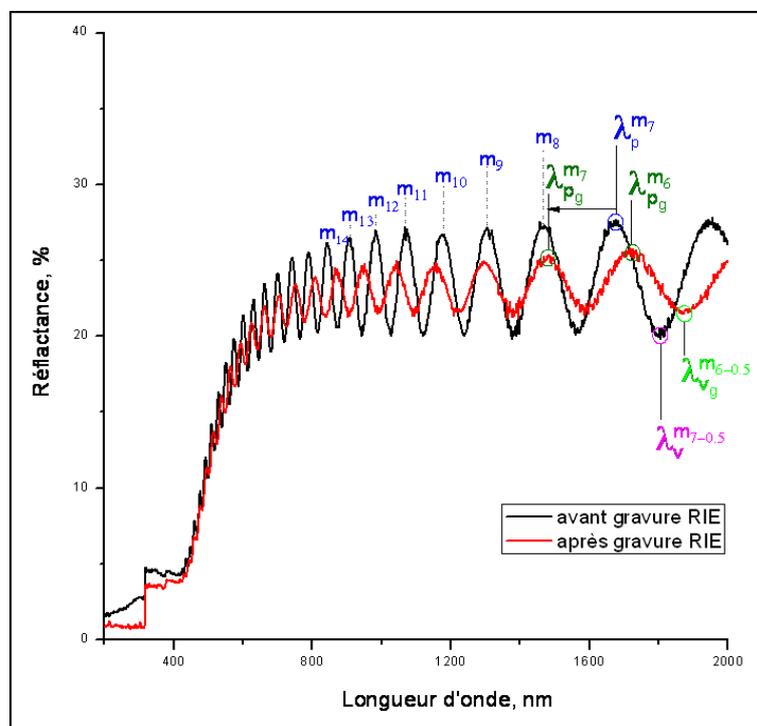


Figure 2.11 – Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux avant et après gravure RIE. Conditions d'anodisation : Substrat Si P<sup>+</sup>(B),  $\rho \approx 4.10^{-3} \Omega.\text{cm}$ ,  $J = 50 \text{ mA.cm}^{-2}$ ,  $t = 200 \text{ s}$ ,  $[\text{HF}] = 10 \%$ . Conditions de gravure : gaz  $\text{SF}_6$ , débit 5 sccm, Puissance 50 W, Pression 10 mTorr et durée 30 s.

Nous avons observé avec tous les échantillons étudiés que la gravure RIE entraînait le déplacement des franges d'interférence de même ordre vers les basses longueurs d'onde. Ce déplacement révèle une diminution de l'épaisseur optique de la couche poreuse. Ce déplacement spectral est accompagné par la diminution de la visibilité des franges d'interférences (différences des réflectances entre les pics et les vallées des franges) très probablement liée à l'augmentation de la rugosité au niveau de l'interface air/couche poreuse. L'épaisseur optique de chaque couche poreuse a été ensuite

déterminée en utilisant les longueurs d'onde du maximum  $\lambda_p^m$  de la dernière frange d'interférence sur le spectre selon la relation de Fabry Pérot (équation 2.7) (section 2.2.2). L'épaisseur optique moyenne des couches poreuses a ainsi été estimée à  $5966 \pm 82$  nm. La mesure de l'épaisseur de la couche poreuse par microscopie électronique à balayage a permis par la suite la détermination de son indice de réfraction. La porosité a été enfin estimée en appliquant la relation 2.6. La gravure RIE, appliquée aux échantillons dans l'objectif d'éliminer la couche de surface, est supposée sans influence sur la porosité du milieu (tableau 2.3).

	n.e (nm)	e (nm)	n	p (%)	D (nm)
<b>Avant gravure RIE</b>	$5966 \pm 82$	$5300 \pm 100$	$1,125 \pm 0,015$	$90,7 \pm 1,0$	/
<b>Après gravure RIE</b>	$5213 \pm 87$	$4631 \pm 62$			$56 \pm 5$

Tableau 2.3 – Caractérisations physiques de couches de silicium poreux effectuées sur plusieurs échantillons élaborés dans les mêmes conditions avant et après gravure RIE.

Contenant des pores de diamètre moyen estimé à 56 nm environ, ces échantillons de silicium poreux développent une surface spécifique calculée selon la relation 2.5 de l'ordre de  $65 \text{ m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$ . La surface totale développée par les parois des pores d'une couche poreuse après gravure RIE serait alors égale à  $300 \text{ cm}^2$ . Comparée à la surface du substrat de silicium avant anodisation ( $1 \text{ cm}^2$ ), la surface développée par la couche poreuse est très importante. Il est à signaler également que la surface spécifique calculée de nos échantillons se situe parmi les valeurs les moins élevées de l'intervalle donné dans la littérature suite à des mesures par la méthode BET (Brunauer-Emmett-Teller) d'adsorption de gaz (entre  $50$  et  $900 \text{ m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$ ) [97]. Ceci est essentiellement lié à la taille des pores. En effet, les valeurs mesurées dans la littérature correspondent le plus souvent aux types microporeux et mésoporeux (diamètre  $< 50$  nm).

### 2.3 Techniques de caractérisation chimique du silicium poreux pour le suivi de la fonctionnalisation

Tout au long de cette thèse nous avons essentiellement utilisé l'interférométrie comme technique optique de caractérisation chimique de nos échantillons de silicium poreux après les différentes étapes de la fonctionnalisation. D'autres techniques telles que la Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR), l'XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) et la spectroscopie RAMAN ont été aussi utilisées.

### 2.3.1 Méthode par modélisation du spectre de réflectance

La méthode par modélisation du spectre de réflectance a pour objectif la détermination des fractions volumiques des différents constituants d'une structure poreuse. Cette méthode consiste à ajuster au spectre expérimental, un spectre théorique calculé en utilisant les matrices de transfert [155] et la loi de Bruggeman [156]. En effet, ces matrices permettent de déterminer la réflectance d'une couche poreuse à partir de son épaisseur et de son indice effectif relié à la composition de la couche par la relation de Bruggeman. Le spectre de réflectance calculé obtenu est comparé au spectre expérimental. La valeur de l'indice est alors ajustée pour que les deux spectres (théorique et expérimental) correspondent bien (fig 2.12). Pour une monocouche de silicium poreux simple (sans aucun traitement thermique et avant fonctionnalisation chimique), cette méthode est équivalente à la méthode de détermination de la porosité exploitant l'ordre spectral  $m$  (relation 2.8) et la relation de Fabry Péro (équation 2.7). Cependant, la modélisation du spectre de réflectance est une méthode plus complète puisqu'elle permet de déterminer la composition du matériau poreux même après oxydation thermique et fonctionnalisation chimique.

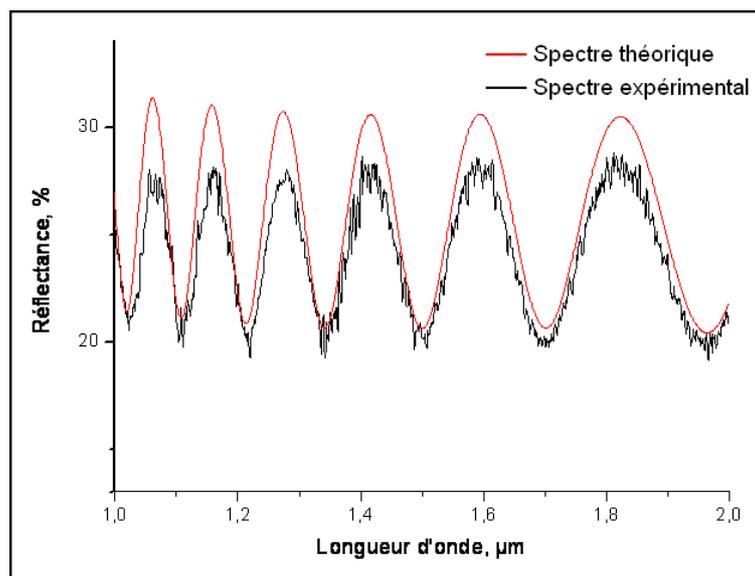


Figure 2.12 – Exemple de spectres de réflectance expérimental et théorique d'une couche de silicium poreux réalisée sur un substrat de type  $P^+$ .

Pour exploiter cette méthode nous avons développé un programme utilisant l'environnement MATLAB. Ce programme permet de simuler la réponse spectrale (réflectance) d'une structure poreuse monocouche ou multicouche (miroir de Bragg et microcavité) en fonction de la composition de chaque couche constituée par les milieux suivants : air, silicium, silice (produit par oxydation du silicium) et substances organiques telles que les molécules d'APTES, de glutaraldéhyde et d'immunoglobulines que nous avons utilisées pour la fonctionnalisation du matériau. L'ajustement des spectres expérimentaux

taux obtenus aux différentes étapes de préparation du silicium poreux aux spectres simulés par ce programme nous a permis d'évaluer la composition chimique du matériau à chaque étape. Le développement de ce programme sera présenté dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

### Appareillage

Pour les monocouches de silicium poreux, les spectres de réflectance ont été obtenus au moyen d'un spectromètre UV/VIS/PIR "Lambda 900" (Perkin Elmer) décrit précédemment.

Les spectres de réflectance des échantillons multicouches ont été obtenus au moyen d'un spectromètre à fibre optique et à haute vitesse de balayage "HR 4000" (Ocean Opics). Ce spectromètre miniaturisé est équipé d'un détecteur CCD linéaire TOSHIBA permettant de travailler dans la gamme spectrale comprise entre 200 nm et 1100 nm. La source de lumière que nous avons utilisée est une lampe halogène au tungstène (20 Watts) Mikropack (HL-2000). La lumière est envoyée en réflexion normale par une fibre sur la surface de l'échantillon à analyser donnant un spot circulaire de 1 mm de diamètre. Le pilotage du spectromètre et l'acquisition des spectres sont assurés par le logiciel SpectraSuite. En plus de l'acquisition rapide, cet appareil présente l'avantage d'être très compact. Il pourra ainsi être utilisé dans un système de biodétection portatif.

## 2.3.2 Autres techniques de caractérisation chimique du silicium poreux

### a. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

Lorsque l'énergie (ou la longueur d'onde) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistre une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise. Le domaine infrarouge utilisé ici varie de  $4000\text{ cm}^{-1}$  à  $400\text{ cm}^{-1}$  (soit une longueur d'onde variant de 2,5 à 25  $\mu\text{m}$ ) et correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon du silicium poreux un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe ainsi que les intensités de l'absorption. La figure 2.13 décrit le schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier.

Le faisceau infrarouge provenant de la source A est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la Séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe,

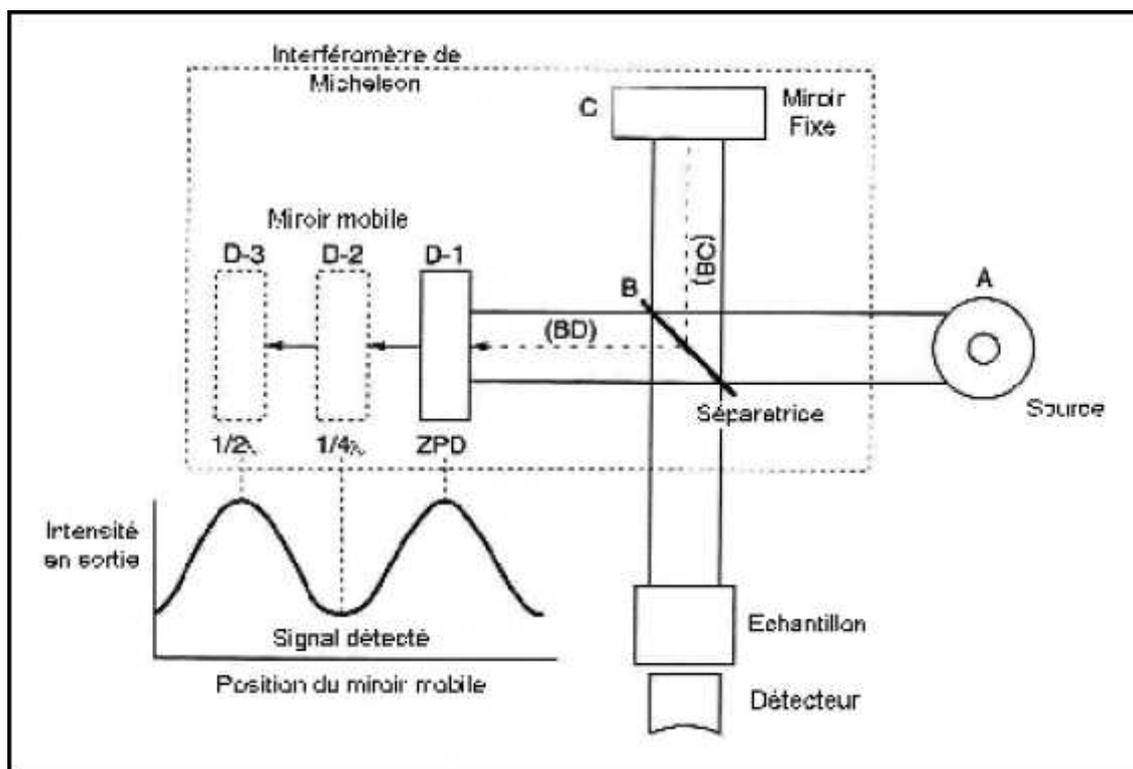


Figure 2.13 – Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier [157].

le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinaient, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi par les deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique. Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme, c'est à dire une signature de l'intensité en fonction de la position du miroir. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau. Cet interférogramme est ensuite converti en un spectre infrarouge par une opération mathématique appelée transformée de Fourier. Un exemple de spectre ainsi obtenu pour une couche de silice est montré sur la figure 2.14.

Les informations tirées des spectres sont de deux sortes :

- Informations qualitatives : Les longueurs d'onde auxquelles l'échantillon absorbe, sont caractéristiques des groupes chimiques présents dans le matériau analysé. Des tables permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques présents. Un même groupe peut donner lieu à plusieurs types de vibrations et donc à des absorptions à différentes fréquences. Ainsi le silicium lié à 4 atomes d'oxygène de la silice donne trois types de vibrations : Si-O stretching à  $1080\text{ cm}^{-1}$  (vibration de valence asymétrique), Si-O bending à  $805\text{ cm}^{-1}$  (vibration de déformation dans le plan), Si-O rocking à  $450\text{ cm}^{-1}$  (balancement) comme le montre la figure 2.14.

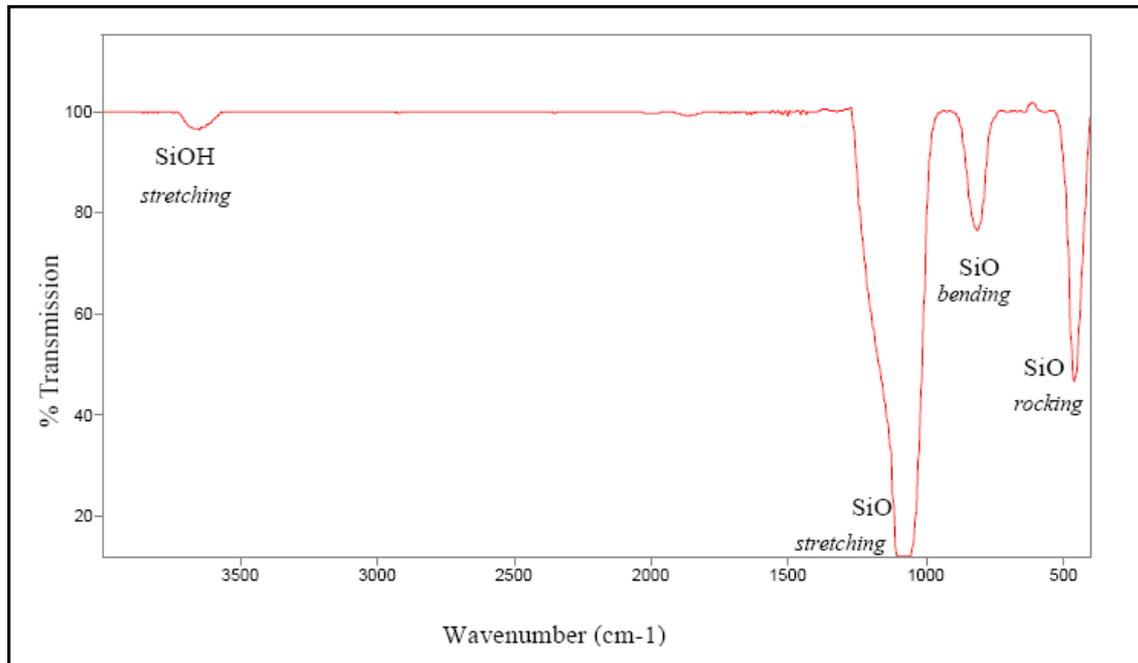


Figure 2.14 – Exemple de spectre infrarouge d'une couche de type silice

– Informations quantitatives : L'intensité de l'absorption à la longueur d'onde caractéristique est reliée à la concentration du groupe chimique responsable de l'absorption. En mesurant l'aire du signal caractéristique on peut, si on connaît l'épaisseur de la couche, comparer la proportion d'un groupement chimique donné dans plusieurs échantillons ou si on a une composition constante avoir une idée de l'épaisseur des films les uns par rapport aux autres. Pour avoir une mesure absolue il convient d'étalonner auparavant les couches par une autre technique pour pouvoir établir une relation expérimentale entre intensité du signal et proportion ou épaisseur. Pour le silicium poreux l'analyse est effectuée en profondeur sur toute l'épaisseur de la couche poreuse. Les analyses IR effectuées dans ce travail ont été réalisées avec un spectromètre FTIR 100 de Perkin-Elmer.

## b. XPS

### *principe*

L'XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) ou spectroscopie ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) est basée sur la photo émission. Lors de l'irradiation par des photons X, les atomes d'un solide émettent, par effet photoélectrique, des électrons appelés photoélectrons. Le principe de la spectroscopie ESCA consiste à analyser en énergie cinétique ( $E_{Cin}$ ) les électrons photo émis lors de l'irradiation par un faisceau mono énergétique de photons X. Le diagramme énergétique du phénomène est alors représenté sur la figure 2.15 :

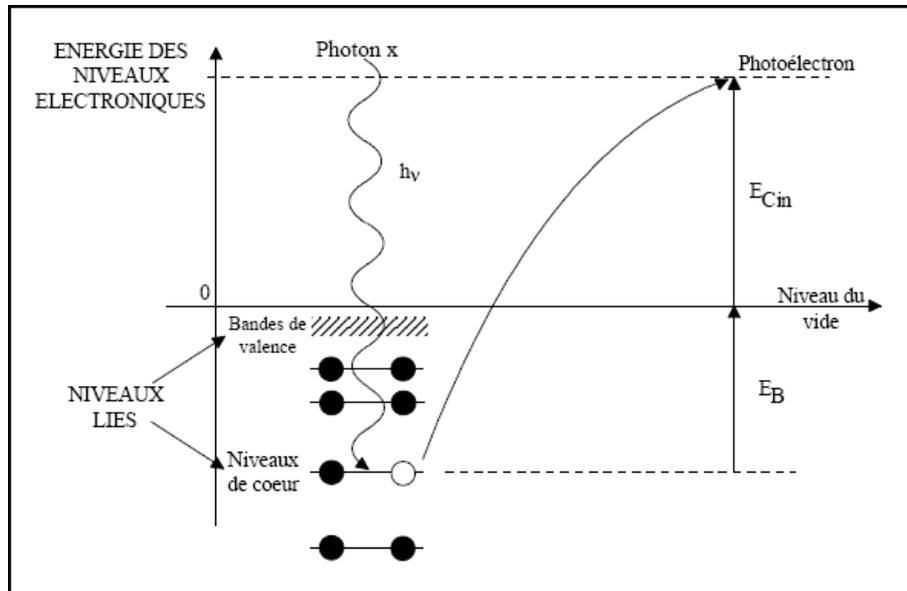


Figure 2.15 – Diagramme énergétique de la photo émission

L'énergie de liaison  $E_B$  caractérisant un électron d'un niveau électronique donné, est directement accessible par la simple relation de conservation de l'énergie :

$$E_B = h\nu - E_{Cin} \quad (2.9)$$

où  $h\nu$  est l'énergie des photons X incidents et  $E_{Cin}$  l'énergie cinétique mesurée. Tout électron des couches électroniques de coeur ou de valence dont l'énergie de liaison est inférieure à  $h\nu$  peut être extrait. Le spectre des énergies de liaisons des électrons de coeur est spécifique d'un atome ce qui permet son identification et son dosage dans un composé donné. Tous les atomes possédant des niveaux de coeur (tous sauf H) sont détectables. L'ESCA est une méthode d'analyse élémentaire.

Lors du transfert de l'électron vers la surface à travers le solide, celui-ci peut subir des interactions inélastiques qui se traduisent par l'existence d'un libre parcours moyen. Ce libre parcours moyen joue un rôle prépondérant en limitant l'épaisseur analysée :  $\lambda$  dépend de l'énergie cinétique de l'électron et du matériau (composition, densité) et est de l'ordre de 1 à 5 nanomètres. Le transfert des électrons dans la matière suit une loi d'absorption exponentielle et l'on montre que 98 % du signal provient d'une profondeur inférieure à  $3\lambda \sin\theta$ . L'ESCA est donc une méthode d'analyse de surface.

**Les spectres**

L'XPS est une technique d'analyse à la fois qualitative et quantitative ;

- Analyse qualitative : Les spectres des photoélectrons sont représentés directement en énergie de liaison et l'identification des éléments présents en surface du matériau est effectuée à partir des pics photoélectriques qui apparaissent sur le spectre de survol (grande fenêtre en énergie) :

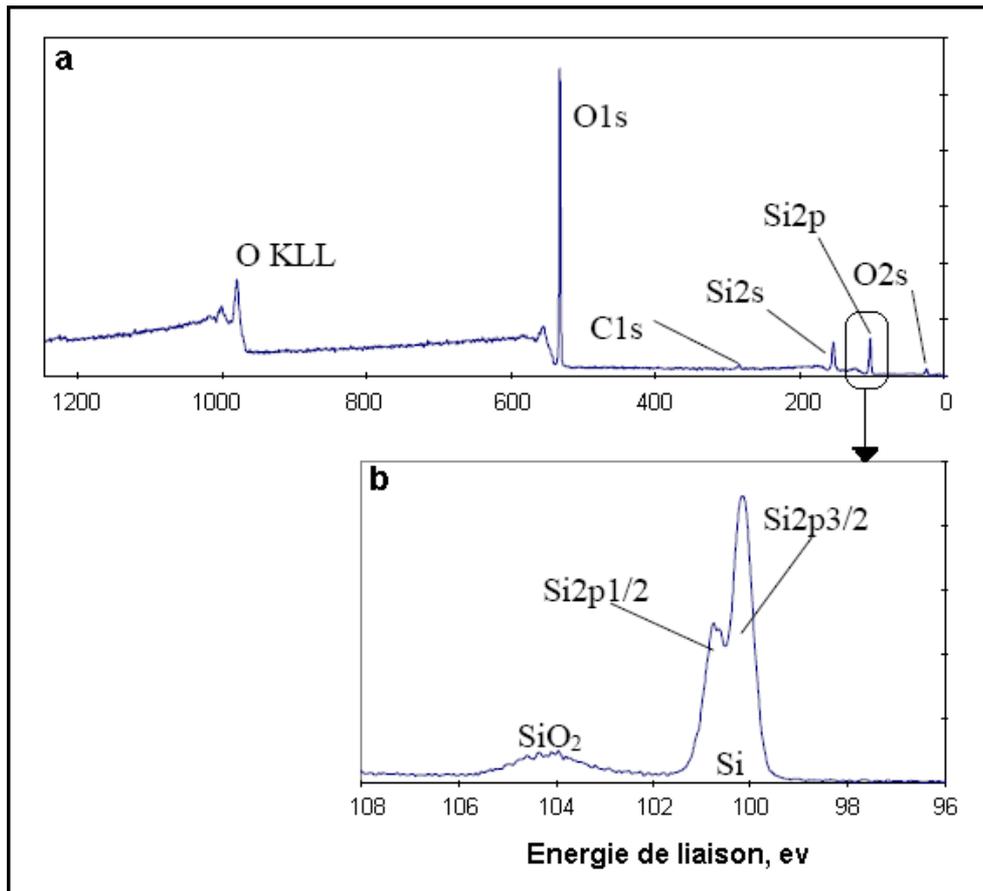


Figure 2.16 – a. Spectre de survol de  $\text{SiO}_2$ , b. Déplacement chimique du spectres  $\text{Si}2p$

La figure 2.16.a, correspondant au spectre de la silice, illustre parfaitement le type de spectres obtenus : une série de pics apparaît, ceux-ci reflètent directement la structure électronique des atomes. Les pics sont indexés de la même façon que les couches électroniques dont sont issus les photoélectrons. Ils sont repérés par les nombres quantiques  $n, l, j$ . Les niveaux  $p, d, f$  sont dédoublés par l'interaction spin-orbite, les rapports d'intensité des doublets  $p(1/2, 3/2)$ ,  $d(3/2, 5/2)$  et  $f(5/2, 7/2)$  sont respectivement  $1/2$ ,  $2/3$  et  $3/4$ . L'écart entre les raies d'un doublet varie de quelques eV à quelques dizaines d'eV (cf. cas du silicium avec les pics  $\text{Si}2p_{3/2}$  et  $\text{Si}2p_{1/2}$  sur la figure 2.16.b).

- Analyse quantitative : L'intensité  $I$  d'un pic photoélectrique permet de réaliser la quantification

d'un élément ou d'une espèce chimique émettrice et de déterminer les stoechiométries avec une exactitude pouvant être meilleure que 5 %. L'ESCA est une méthode d'analyse quantitative. Cette intensité, mesurée sur un spectre particulier après soustraction du bruit de fond, dépend de la concentration atomique  $N$  de l'élément considéré (dans le cas d'une couche homogène d'épaisseur infinie) selon la relation :

$$I = KN\sigma\lambda \left[ 1 - \exp\left(-\frac{z}{\lambda \sin\theta}\right) \right] \quad (2.10)$$

$K$  est une constante qui dépend de l'appareillage et notamment de la fonction de transmission de l'appareil qui nécessite d'être connue dans la gamme d'énergie étudiée.  $\delta$  est la section efficace de photoionisation (probabilité d'ionisation du niveau de cur considéré). Les valeurs de  $\delta$  ont été calculées pour la plupart des niveaux électroniques excités par la raie K de l'aluminium (tables de Scofield).  $\lambda$  est le libre parcours moyen de l'électron. Dans une première approche, pour les énergies cinétiques supérieures à 100 eV, il est admis que le libre parcours moyen de l'électron varie comme la racine carrée de l'énergie cinétique :  $\lambda = (E_{cin})^{1/2}$ .  $\theta$  et  $z$  sont respectivement l'angle d'analyse et la profondeur d'analyse.

Ainsi, il est possible d'établir très facilement les rapports atomiques de deux éléments A et B d'après la formule :

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{\sigma_B(E_B)^{1/2}}{\sigma_A(E_A)^{1/2}} \quad (2.11)$$

La limite de détection de la technique dépend bien évidemment de la section efficace de photoionisation de l'élément considéré : celle-ci peut être meilleure que 0,1 % d'une monocouche atomique dans le cas des éléments les plus sensibles.

### **Appareillage**

L'ESCA est une technique qui nécessite l'emploi de l'ultravide ( $10^{-9}$  -  $10^{-10}$  mbar), en effet, il convient d'éviter aux électrons d'être diffusés par les molécules de l'atmosphère résiduelle au cours de leur trajet jusqu'au détecteur.

Les principaux éléments d'un spectromètre de photoélectrons sont :

- une source de RX
- un analyseur permettant la mesure de l'énergie cinétique des électrons
- un système de détection et de comptage (associé à une informatique d'acquisition)

Pour utiliser cette technique nous avons collaboré avec l'institut de physique de Rennes (IPR) qui dispose d'un appareil ESCALAB MKII (VG Instrument). Cet appareil est un dispositif expérimental sous ultravide composé de trois chambres ; (i) un sas d'introduction des échantillons, (ii) une chambre de préparation et (iii) une chambre d'analyse sous  $10^{-10}$  mbar. Le spectromètre est lié à un ordinateur équipé du logiciel Eclipse (VG scientific) permettant l'acquisition et le traitement des données.

### c. RAMAN

La spectroscopie Raman est une technique d'analyse non destructive, basée sur la détection des photons diffusés inélastiquement suite à l'interaction de l'échantillon avec un faisceau de lumière monochromatique. La différence de fréquence entre photon exciteur et photon diffusé renseigne sur la nature chimique de la molécule à l'origine de la diffusion.

En spectrométrie Raman, l'analyse se fait par excitation du matériau. Porté à un niveau énergétique virtuel par une puissante source lumineuse monochromatique de type laser, il réémet ensuite une radiation qui est collectée puis analysée par un détecteur adéquat (figure 2.17). Cette radiation comporte deux types de signaux. Le premier très majoritaire correspond à la diffusion Rayleigh : la radiation incidente est diffusée élastiquement sans changement d'énergie donc de longueur d'onde. Toutefois, des photons dans un nombre très limité de cas peuvent interagir avec la matière. Celle-ci absorbe (ou cède) de l'énergie aux photons incidents produisant ainsi les radiations Stokes (ou anti-Stokes). La variation d'énergie observée sur le photon nous renseigne alors sur les niveaux énergétiques de rotation et de vibration de la molécule concernée.

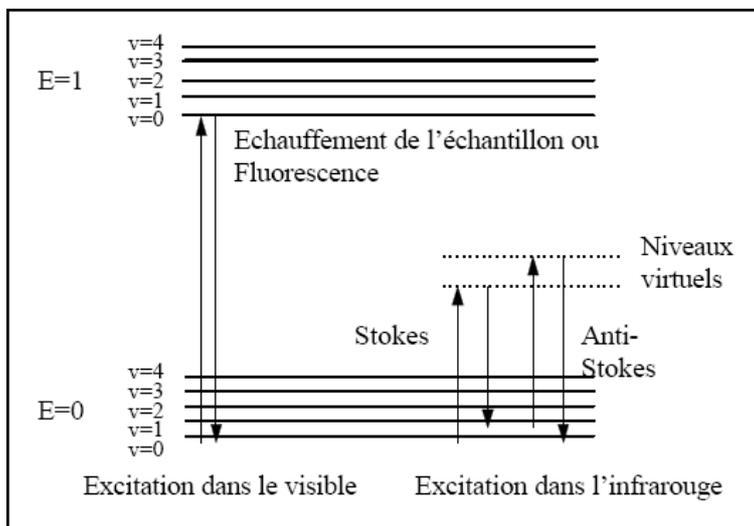


Figure 2.17 – Diagramme de Jablonski : Evolution de l'énergie de vibration d'un atome stimulé par un laser.

Dans le cadre de la spectrométrie Raman, on s'intéresse aux énergies de vibration et de rotation, très faibles, en comparaison de celles des photons incidents. Comme l'indique la figure 2.17 cette

dernière ne correspond pas à un saut entre deux niveaux énergétiques et l'explication du phénomène Raman doit faire intervenir des niveaux énergétiques virtuels. Pourtant une molécule ne peut à priori absorber un photon pour passer à un état plus excité que si l'énergie de ce dernier correspond à l'écart entre le niveau énergétique actuel de la molécule et un autre niveau "permis". C'est le système de la quantification des niveaux d'énergie. Or, ici, on observe que la molécule absorbe quand même une partie du rayonnement incident, juste ce qu'il faut pour sauter sur un niveau d'énergie possible. Du point de vue quantique, on peut l'expliquer en faisant intervenir l'interaction de l'onde incidente avec les vibrations moléculaires de la matière. La conservation de l'énergie impose deux relations possibles :

$$\hbar W_p = \hbar W_v + \hbar W_S \quad (2.12)$$

Ou bien

$$\hbar W_p = \hbar W_{AS} - \hbar W_v \quad (2.13)$$

La molécule peut donc utiliser une partie de l'énergie incidente. Le photon qui a cédé une fraction de son énergie a maintenant une énergie  $h\nu - E$ , où  $E$  représente un saut énergétique entre deux niveaux vibrationnels (de rotation ou de vibration translation). Il est donc caractérisé par une fréquence plus faible (raies Stokes).

Le phénomène aboutissant à la formation des raies Anti-Stokes est similaire. Lorsqu'une molécule est dans un état excité - ce qui est très peu probable - elle peut se désexciter en donnant de l'énergie à un photon incident. Le photon a alors l'énergie  $h\nu + E$ . Ce qui se traduit en terme spectral par l'apparition de raies symétriques à celles de Stokes (par rapport à celle de Rayleigh c'est à dire la longueur d'onde incidente). Leur amplitude est toutefois faible (inférieure à celle des raies Stokes notamment) car conformément à la loi de répartition de Boltzmann la probabilité de présence des états excités est très faible

La figure 2.18 schématise le principe du spectromètre Raman. Les radiations d'une source laser puissante sont conduites dans une fibre optique jusqu'à l'échantillon à analyser et provoquent son excitation. La lumière produite est recueillie par un capteur, puis acheminée par une fibre optique jusqu'au séparateur. Couplé à un détecteur celui-ci fournit alors des données sur l'échantillon qui n'ont plus qu'à être traitées informatiquement.

Tous les matériaux peuvent être analysés par spectroscopie Raman, quel que soit l'état sous lequel ils

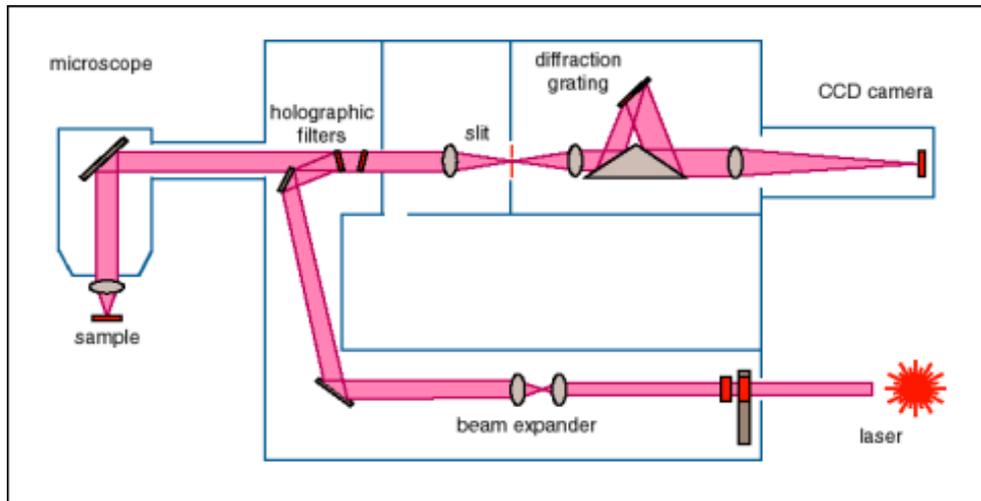


Figure 2.18 – Schéma de principe d'un spectromètre Raman.

se présentent (solide, liquide ou gazeux) et sans préparation préalable particulière.

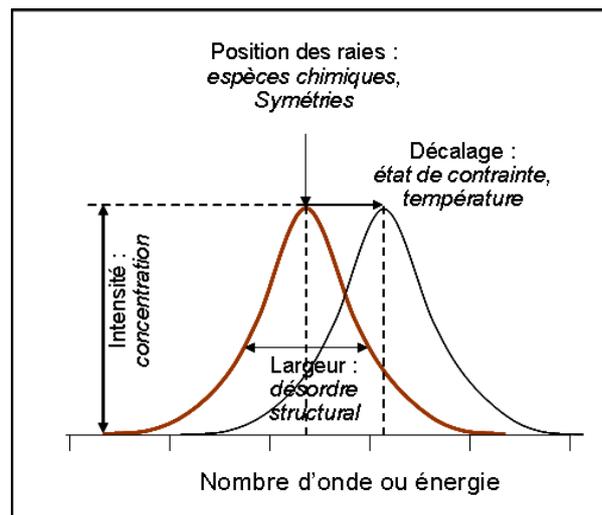


Figure 2.19 – Informations qualitatives et quantitatives fournies par une raie Raman.

Les informations obtenues d'un spectre Raman sont multiples (figure 2.19) :

- la position des raies (valeur de l'énergie ou fréquence) renseigne sur les espèces chimiques en présence dans l'échantillon,
- la largeur des pics à mi hauteur fournit des informations sur la structure de l'échantillon,
- l'intensité d'un pic peut être reliée à la concentration de l'espèce,
- le déplacement des pics est fonction de l'état de contrainte et/ou de la température.

Pour effectuer les mesures RAMAN durant ma thèse nous avons utilisé un spectromètre HR 800 (Horiba / Jobin-Yvon) de la plate-forme ONIS située à l'université de Rennes 1. Les deux sources d'excitation utilisées pour ces mesures sont un Laser à gaz He-Ne émettant à 633 nm et une diode laser solide émettant à 785 nm. L'objectif de cette étude était le suivi du greffage moléculaire en profondeur des couches du silicium poreux. Un microscope confocal est associé au spectromètre.

## **2.4 Conclusion**

Dans ce chapitre nous avons présenté l'ensemble des conditions d'anodisation et des moyens de caractérisation que nous avons utilisé au cours de cette thèse. Nous avons également présenté les résultats d'une étude que nous avons menée dans l'objectif de rechercher les conditions d'élaboration de monocouches en silicium poreux avec des caractéristiques physiques (taille des pores et surface spécifique) adaptées à notre application biocapteur. Enfin nous avons décrit les techniques que nous avons utilisées pour la caractérisation chimique des couches poreuses après les différentes étapes de biofonctionnalisation. Avant de présenter les résultats de cette caractérisation (pour le suivi de la fonctionnalisation) nous développons dans le chapitre suivant du manuscrit les éléments essentiels que nous avons utilisés pour mettre en place un programme permettant de simuler la réponse spectrale des structures poreuses monocouches et multicouches à différentes étapes de leur préparation.



## **Chapitre 3**

# **Simulation de spectres de réflectance de structures optiques à base de silicium poreux**

### **3.1 Introduction**

Afin d'exploiter au mieux les propriétés de réflectivité optique de silicium poreux dans la caractérisation physico-chimique des structures optiques que nous avons élaborées à base de ce matériau, nous avons développé un programme permettant de simuler la réponse spectrale de ces structures à différentes étapes de leur préparation [158]. Ce programme calcule la réflectance d'une structure poreuse monocouche ou multicouche en appliquant le formalisme des matrices de transfert [155] et en partant des indices reliés à la composition des milieux effectifs par le modèle de Bruggeman [156]. Ainsi, l'ajustement des spectres théoriques simulés par ce programme aux spectres expérimentaux permettra l'estimation de la composition de la structure poreuse analysée par réflectométrie. Dans ce chapitre nous présentons le principe d'application du formalisme des matrices de transfert pour la détermination de la réflectance d'une structure optique à base de silicium poreux. Ensuite nous introduisons le modèle de Bruggeman.

### **3.2 Application du formalisme des matrices de transfert dans une structure à base de silicium poreux constituée d'une seule couche**

A la fin de son élaboration par anodisation électrochimique, une monocouche de silicium poreux est uniquement composée de cristallites de silicium séparés par des interstices que nous appelons "pores" et qui sont remplis d'air. Cette composition binaire (silicium + air) peut évoluer suite à une oxydation thermique incorporant des atomes d'oxygène dans les cristallites ou un traitement chimique

remplaçant une fraction de l'air contenu dans les pores par d'autres éléments (solvants et substances organiques). Pour toutes ces compositions, la couche poreuse (figure 3.1) peut être considérée comme un milieu effectif 1 d'indice moyen égale à  $n_1$  et délimité par les deux interfaces 0/1 et 1/3 qu'il forme respectivement avec les milieux 0 (air) d'indice  $n_0$  et le milieu 3 (silicium) d'indice  $n_3$ . Pour un rayon issu du milieu 0 et se propageant à travers la couche poreuse, la matrice de transfert  $T(\lambda)$  s'écrit selon l'équation suivante :

$$T(\lambda) = M_{31} \cdot P_1 \cdot M_{10} \quad (3.1)$$

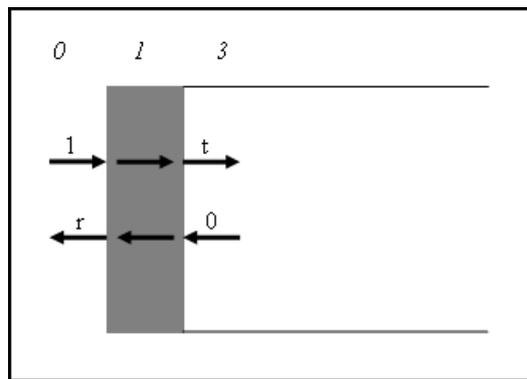


Figure 3.1 – Schéma de la matrice de transfert  $T(\lambda)$  pour une monocouche de silicium poreux (milieu 1 délimité par les milieux 0 = air et 3 = silicium).

avec  $M_{ij}$  les matrices de passage aux interfaces  $i/j$  et  $P_1$  la matrice de propagation dans la couche poreuse (milieu 1).

Pour  $r_{ij}$  et  $t_{ij}$ , respectivement les coefficients de réflexion et de transmission pour un rayon issu du milieu  $i$  et arrivant en incidence normale à l'interface  $ij$ , la matrice de passage  $M_{ij}$  du milieu  $i$  (d'indice  $n_i$ ) vers le milieu  $j$  (d'indice  $n_j$ ) se définit par :

$$M_{ij} = \frac{1}{t_{ij}} \begin{bmatrix} 1 & r_{ij} \\ r_{ij} & 1 \end{bmatrix} \quad (3.2)$$

Les coefficients de réflexion et de transmission sont exprimés par les relations 3.3 et 3.4

$$r_{ij} = \frac{n_i - n_j}{n_i + n_j} \quad (3.3)$$

$$t_{ij} = \frac{2n_i}{n_i + n_j} \quad (3.4)$$

La matrice de propagation  $P_1$  dans la couche poreuse (milieu 1) d'épaisseur  $e$  se définit par :

$$P_1 = \begin{bmatrix} \phi_1 & 0 \\ 0 & \overline{\phi_1} \end{bmatrix} \quad (3.5)$$

avec :

$$\phi_1 = \exp(i \cdot n_1 \cdot \frac{2\pi}{\lambda} \cdot e) \quad (3.6)$$

Le coefficient de réflexion  $r$  s'obtient à partir du calcul du rapport des composantes 2-1 et 2-2 de la matrice de transfert  $T(\lambda) \begin{bmatrix} 1 \\ r \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} t \\ 0 \end{bmatrix}$  :

$$T_{1,1} + T_{1,2} \cdot r = t$$

$$T_{2,1} + T_{2,2} \cdot r = 0$$

avec  $T(\lambda) = \begin{bmatrix} T_{1,1} & T_{1,2} \\ T_{2,1} & T_{2,2} \end{bmatrix}$  d'où :

$$r = -\frac{T_{2,1}}{T_{2,2}} \quad (3.7)$$

Enfin, la réflectance  $R(\lambda)$  est reliée aux éléments  $T_{2,1}$  et  $T_{2,2}$  de la matrice  $T(\lambda)$  par la relation suivante :

$$R = \left| \frac{T_{2,1}}{T_{2,2}} \right|^2 \quad (3.8)$$

$R$  en amplitude est alors égale à :

$$R(\lambda) = r(\lambda) \cdot \overline{r(\lambda)} \quad (3.9)$$

$\overline{r(\lambda)}$  : coefficient de réflexion conjugué)

### 3.3 Application du formalisme des matrices de transfert dans une structure multicouche à base de silicium poreux

#### 3.3.1 Principe

Le formalisme des matrices de transfert peut être développé dans le cas de structures multicouches en tenant compte de la succession des couches considérées et en utilisant les matrices de passage et de propagation associées à ces couches.

Ainsi, dans le cas d'une structure composée de l'empilement de  $(f-1)$  couches poreuses (milieux 0, 1, 2, ...,  $(f-1)$  d'indices respectifs  $n_0, n_1, n_2, \dots, n_{(f-1)}$ ), la matrice de transfert  $T(\lambda) \begin{bmatrix} 1 \\ r \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} t \\ 0 \end{bmatrix}$  pour un rayon issu du milieu 0 (air) délimité par l'interface 0/1 et se propageant jusqu'au milieu  $(f-1)$  délimité par l'interface  $(f-1)/f$  (figure 3.2) s'écrit :

$$T(\lambda) = M_{f(f-1)} \cdot P_{(f-1)} \cdot M_{(f-1)(f-2)} \cdot P_{(f-2)} \cdots \cdots M_{10} \quad (3.10)$$

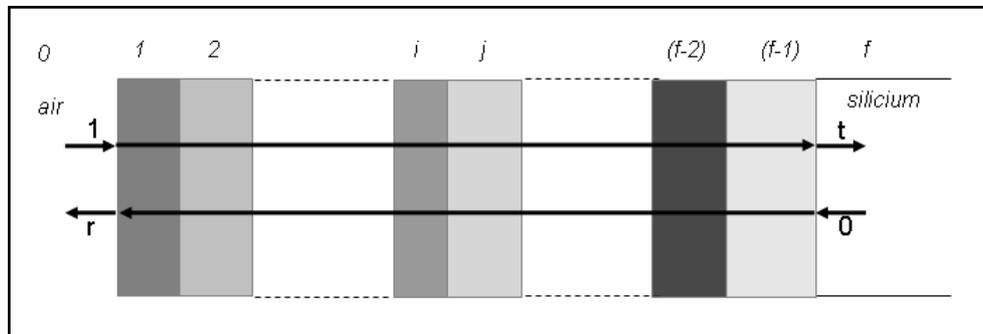


Figure 3.2 – Schéma de la matrice de transfert  $T(\lambda)$  pour une structure multicouche de silicium poreux délimitée par la milieu 0 (air) et le milieu  $f$  (silicium).

L'application de ce formalisme est notamment intéressante lors de la conception de structures multicouches à réponse optique particulière comme les miroirs de Bragg et les microcavités que nous décrivons dans les paragraphes suivants.

### 3.3.2 Miroir de Bragg

Un miroir de Bragg à base de silicium poreux est une structure photonique constituée de l'empilement vertical périodique de deux couches d'indices de réfraction différents  $n_1$  et  $n_2$  et d'épaisseurs optiques égales ( $n_1 e_1 = n_2 e_2$ ) (figure 3.3.a). L'élaboration d'une telle structure par anodisation électrochimique de silicium est assurée par l'application de deux densités de courant  $J_1$  et  $J_2$  alternées  $N$  fois pendant des durées  $t_1$  et  $t_2$  (figure 3.3.b).

La matrice de transfert  $T(\lambda)$  pour un rayon issu du milieu 0 (air) délimité par l'interface 0/1 et se propageant successivement dans l'alternance des milieux 1 (couche d'indice  $n_1$ ) et 2 (couche d'indice  $n_2$ ) jusqu'à l'interface 2/3 entre les milieux 2 et 3 (figure 3.4) est donnée dans ce cas par la relation suivante :

$$T(\lambda) = M_{32} \cdot (P_2 \cdot M_{21} \cdot P_1 \cdot M_{12})^{N-1} \cdot P_2 \cdot M_{21} \cdot P_1 \cdot M_{10} \quad (3.11)$$

avec :

- $M_{ij}$  les matrices de passage aux interfaces  $ij$
- $P_i$  les matrices de propagation dans les milieux  $i$

Une telle structure photonique entraîne la réflexion totale de la lumière incidente à la longueur d'onde  $\lambda_B$  égale à quatre fois l'épaisseur optique ( $4ne$ ) des monocouches de silicium poreux consti-

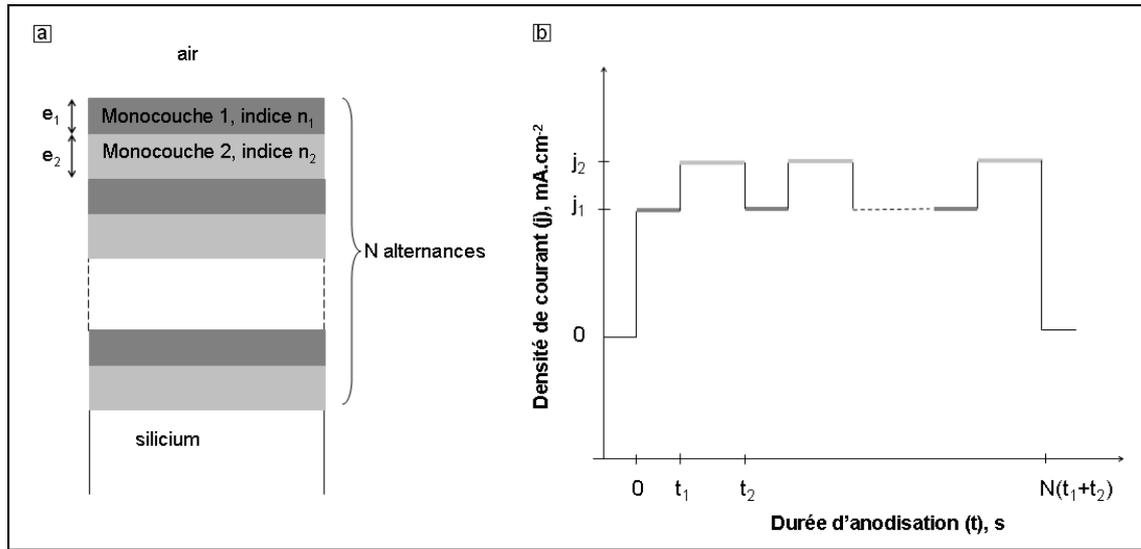


Figure 3.3 – Schéma d’un miroir de Bragg à base de silicium poreux (a) et principe de son élaboration par anodisation électrochimique (b).

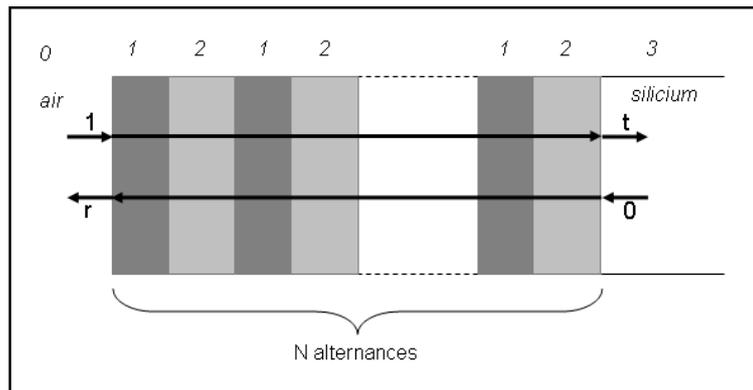


Figure 3.4 – Schéma de la matrice de transfert  $T(\lambda)$  pour un miroir de Bragg à base de silicium poreux délimité par la milieu 0 (air) et le milieu 3 (silicium).

tuant le miroir de Bragg (relation 3.12).

$$\lambda_B = 4(n_1e_1) = 4(n_2e_2) \tag{3.12}$$

Un exemple de spectre d’un miroir de Bragg simulé par l’application de ce formalisme à base de matrices de transfert est représenté sur la figure 3.5. Conçu avec une alternance  $N$  égale à 10 de deux couches poreuses d’indices de réfraction égaux à 2,002 et 1,601 (à 2000 nm) et d’épaisseurs respectivement égales à 148 nm et 186 nm, ce miroir de Bragg se caractérise par la formation d’une

bande interdite photonique centrée à 1200 nm empêchant les ondes électromagnétiques de se propager à l'intérieur du milieu.

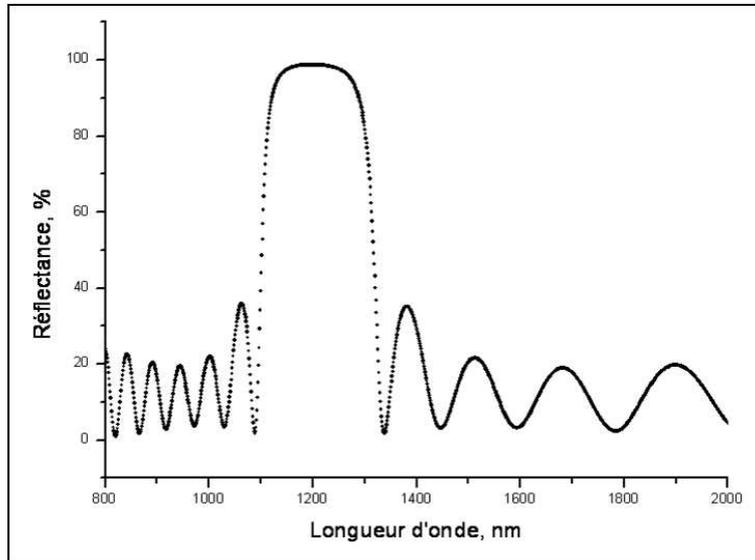


Figure 3.5 – Spectre de réflectance théorique d'un miroir de Bragg en silicium poreux centré à 1200 nm.

La largeur de cette bande spectrale  $\Delta\lambda$ , est donnée par la relation suivante :

$$\Delta\lambda = \frac{2\lambda_0\Delta n}{\pi n} \quad (3.13)$$

avec  $\Delta n = n_2 - n_1$  et  $n = (n_2 + n_1)/2$

et où  $n_1$  est l'indice de réfraction de la première couche, constituant le motif, d'épaisseur  $e_1$  et  $n_2$  est l'indice de réfraction de la deuxième couche, constituant le motif, d'épaisseur  $e_2$ .

La réflectance à ce niveau est alors maximale et peut être reliée aux indices de réfraction  $n_1$  et  $n_2$  par la relation suivante :

$$R_{max} = \frac{\left[ \left( \frac{n_2}{n_1} \right)^{2N} - 1 \right]^2}{\left[ \left( \frac{n_2}{n_1} \right)^{2N} + 1 \right]^2} \quad (3.14)$$

### 3.3.3 Microcavité

Une microcavité est une structure verticale constituée comme le montre la figure 3.6 de deux miroirs de Bragg (Miroir A et Miroir B) séparés par une couche d'épaisseur optique multiple de  $\lambda_0/2$  appelée couche active (CA) pour une structure luminescente qui est un milieu effectif d'indice  $n_1$  et d'épaisseur  $e_C$ . Le miroir A est constitué d'une alternance de couches qui sont des milieux d'indices effectifs  $n_1$  et  $n_2$  et d'épaisseurs  $e_1$  et  $e_2$ , répétée  $N_A$  fois alors que le miroir B est constitué d'une alternance de couches de milieux d'indices effectifs  $n_2$  et  $n_1$  et d'épaisseurs  $e_2$  et  $e_1$  répétée  $N_B$  fois. L'épaisseur  $e_C$  de la couche active est égale au double de l'épaisseur  $e_1$  de la couche d'indice  $n_1$ .

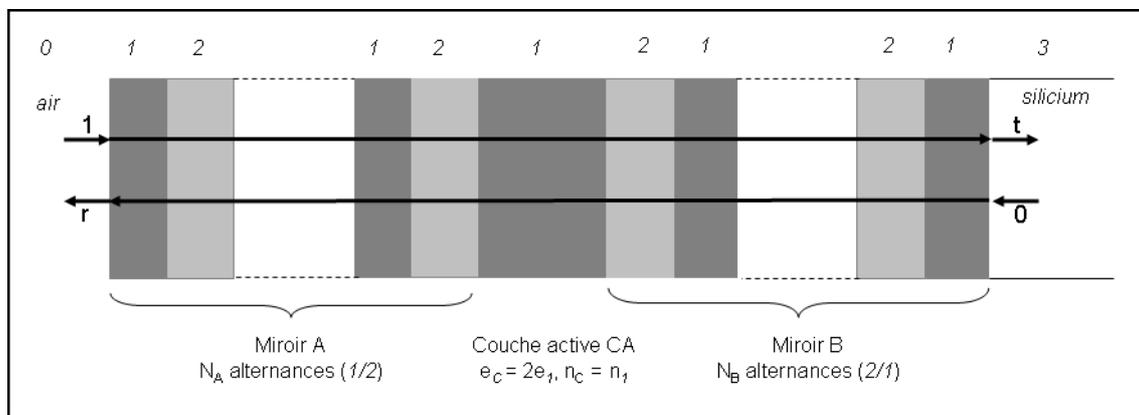


Figure 3.6 – Schéma de la matrice de transfert  $T(\lambda)$  pour une microcavité.

La matrice de transfert  $T(\lambda)$  pour un rayon issu du milieu 0 délimité par l'interface 0/1 et se propageant successivement dans l'alternance de milieux 1 et 2 définis dans la figure 3.6 jusqu'à l'interface 1/3 entre les milieux 1 et 3 est donnée dans ce cas par la relation suivante :

$$T(\lambda) = M_{31} \cdot (P_1 \cdot M_{12} \cdot P_2 \cdot M_{21})^{N_B} \cdot P_{CA} \cdot (M_{12} \cdot P_2 \cdot M_{21} \cdot P_1)^{N_A} \cdot M_{10} \quad (3.15)$$

avec :

- $M_{ij}$  les matrices de passage aux interfaces  $ij$
- $P_i$  les matrices de propagation dans les milieux  $i$  :

La matrice de propagation  $P_1$  dans le milieu 1 se définit par :

$$P_1 = \begin{bmatrix} \phi_1 & 0 \\ 0 & \frac{1}{\phi_1} \end{bmatrix} \quad (3.16)$$

avec :

$$\phi_1 = \exp(i \cdot n_1 \cdot \frac{2\pi}{\lambda} \cdot e_1) \quad (3.17)$$

La matrice de propagation  $P_2$  dans le milieu 2 se définit par :

$$P_2 = \begin{bmatrix} \phi_2 & 0 \\ 0 & \frac{1}{\phi_2} \end{bmatrix} \quad (3.18)$$

avec :

$$\phi_2 = \exp(i \cdot n_2 \cdot \frac{2\pi}{\lambda} \cdot e_2) \quad (3.19)$$

Et la matrice de propagation  $P_C$  dans la couche active (milieu 1 d'épaisseur double) se définit par :

$$P_C = \begin{bmatrix} \phi_C & 0 \\ 0 & \frac{1}{\phi_C} \end{bmatrix} \quad (3.20)$$

avec :

$$\phi_C = \exp(i \cdot n_1 \cdot \frac{2\pi}{\lambda} \cdot e_C) \quad (3.21)$$

et :

$$e_C = 2 \cdot e_1$$

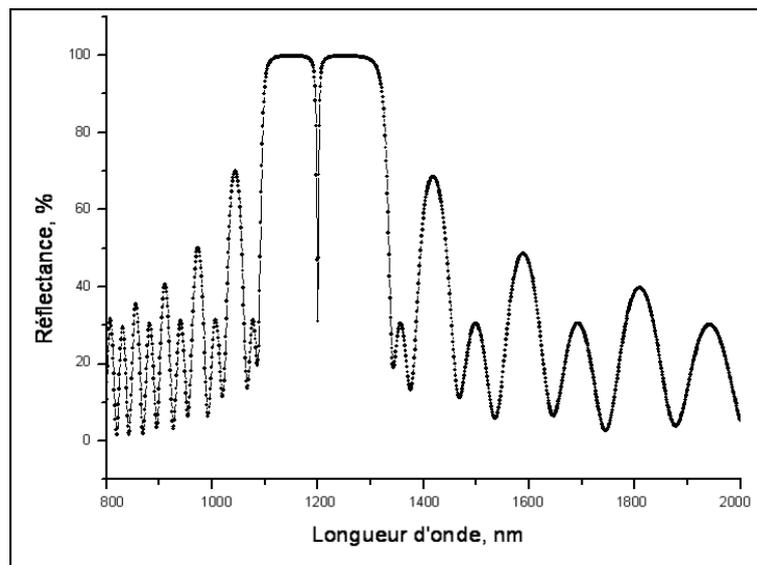


Figure 3.7 – Spectre de réflectance théorique d'une microcavité en silicium poreux centré à 1200 nm.

La simulation de la réflectance d'une telle structure (figure 3.7) montre la présence de deux bandes spectrales de réflectivités élevées séparées par un pic (en creux) de résonance appelé "pic de Fabry Pérot" ou aussi "mode de Fabry-Pérot" (mode de résonance) et situé à une longueur d'onde spécifique. Etant reliée aux épaisseurs optiques ( $n_1 e_1$  et  $n_2 e_2$ ), des couches poreuses constituant la structure multicouche, cette longueur d'onde est vraisemblablement sensible aux variations d'indice de réfraction de ces couches. La figure 3.8 représente la simulation de l'influence d'une variation d'indice de réfraction des couches poreuses de l'ordre de  $10^{-2}$  sur la longueur d'onde du mode de Fabry Pérot.

Une différence de 15 nm a été obtenue. En associant la variation de l'indice à un changement dans la composition du milieu, le déplacement du pic de Fabry Pérot peut servir d'indicateur dans le suivi physico-chimique d'une telle structure poreuse.

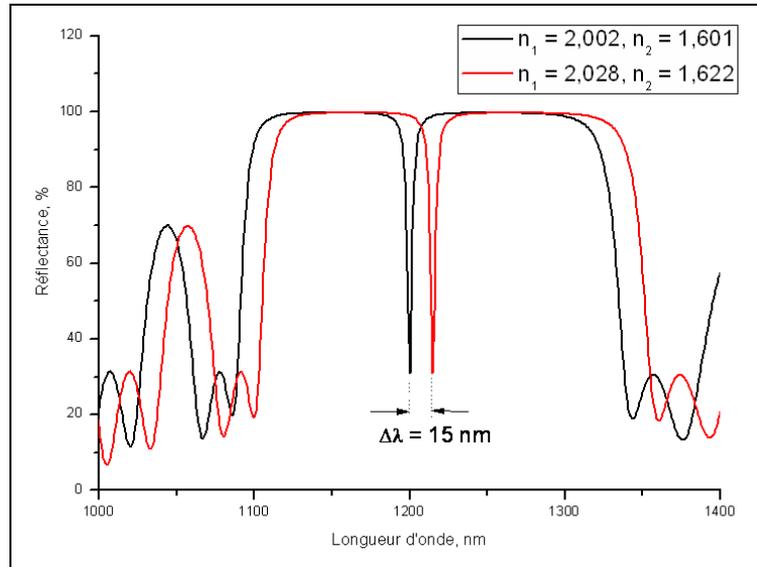


Figure 3.8 – Déplacement du spectre de réflectance théorique d'une microcavité en silicium poreux entraînée par une variation d'indice du milieu de l'ordre de  $10^{-2}$ .

### 3.4 Modèle de Bruggeman

Par ailleurs, dans le formalisme à base de matrice de transfert, il nous faut connaître la dispersion de l'indice de réfraction des couches poreuses. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de Bruggeman qui considère chaque couche poreuse comme un milieu effectif d'indice de réfraction relié à la composition des éléments qui le constituent par la relation suivante :

$$\sum_i C_i \frac{(\epsilon_i - \epsilon)}{(\epsilon_i + 2\epsilon)} = 0 \quad (3.22)$$

avec :

- $\epsilon_i = n_i^2$ ,  $n_i$  étant l'indice du constituant  $i$
- $\epsilon = n^2$ ,  $n$  étant l'indice du milieu effectif
- $C_i$  : fraction volumique des constituants  $i$ .

et

$$\sum_1 C_i = 1; \quad (3.23)$$

Nécessitant plusieurs étapes de traitement thermique et chimique pour sa préparation à une application de biodétection, une monocouche de silicium poreux peut ainsi être considérée comme un milieu composé de silicium, d'air, de silice et de matière organique à des proportions variables en fonction du stade de préparation de l'échantillon. La matière organique contenue dans la couche poreuse doit être introduite par fonctionnalisation chimique du matériau poreux (préalablement oxydé) selon le schéma réactionnel (figure 2.2) composé des trois étapes que sont (i) la silanisation, (ii) le couplage du glutaraldéhyde et (iii) la fixation des anticorps anti-glucagon.

Soit  $C_{Si}$ ,  $C_{air}$ ,  $C_{SiO_2}$ ,  $C_{mol_1}$ ,  $C_{mol_2}$  et  $C_{mol_3}$  respectivement les fractions volumiques des éléments suivants : silicium, air, silice, silane, glutaraldéhyde greffé et anticorps, le milieu effectif relié au modèle de Bruggeman regroupe l'ensemble de ces fractions dans un volume constant tout en négligeant les modifications chimiques à la surface externe de la couche poreuse (figure 3.9).

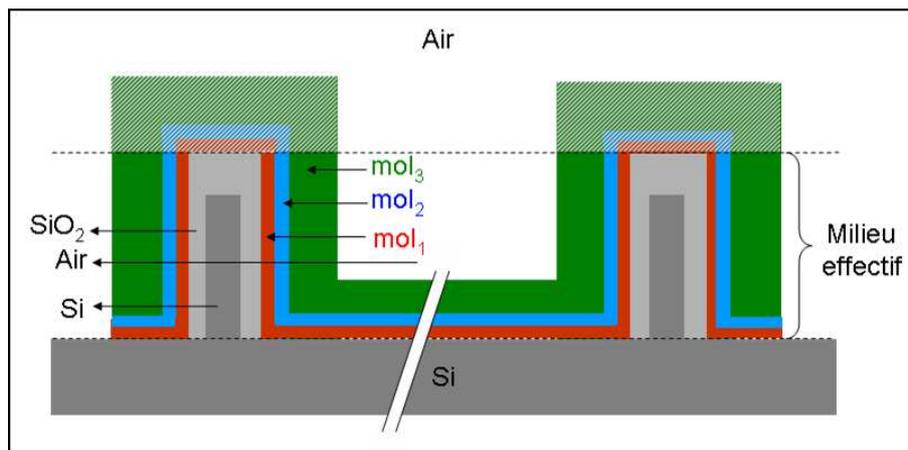


Figure 3.9 – Schéma du milieu effectif appliqué à une couche poreuse fonctionnalisée.

Selon ce modèle, nous avons :

$$C_{air} + C_{Si} + C_{SiO_2} + C_{mol_1} + C_{mol_2} + C_{mol_3} = 1$$

et

$$C_{air} \frac{1 - \epsilon}{1 + 2\epsilon} + C_{Si} \frac{\epsilon_{Si} - \epsilon}{\epsilon_{Si} + 2\epsilon} + C_{SiO_2} \frac{\epsilon_{SiO_2} - \epsilon}{\epsilon_{SiO_2} + 2\epsilon} + C_{mol_1} \frac{\epsilon_{mol_1} - \epsilon}{\epsilon_{mol_1} + 2\epsilon} + C_{mol_2} \frac{\epsilon_{mol_2} - \epsilon}{\epsilon_{mol_2} + 2\epsilon} + C_{mol_3} \frac{\epsilon_{mol_3} - \epsilon}{\epsilon_{mol_3} + 2\epsilon} = 0$$

Il faudra donc résoudre cette équation pour connaître  $\epsilon$  et donc  $n$  en tenant compte des différentes fractions volumiques des milieux.

### 3.5 Détermination de l'indice de réfraction d'un milieu effectif constitué de 6 éléments différents dans le cas de monocouches

La méthode de détermination de l'indice effectif de la monocouche de silicium poreux fonctionnalisée consiste à utiliser le modèle de Bruggeman après chaque étape de l'élaboration et de la fonctionnalisation du silicium poreux partiellement oxydé de manière à n'avoir qu'un seul paramètre inconnu : la fraction volumique du constituant  $i$  après l'étape  $i$ . En fixant initialement et de manière arbitraire ce paramètre, l'indice  $n$  du milieu effectif peut être calculé. La réflectance théorique pour chaque longueur d'onde peut alors être également calculée grâce à la méthode des matrices de transfert appliquée au système à une couche. Un spectre de réflectance théorique est alors obtenu et est comparé au spectre de réflectance expérimental. Le paramètre (la fraction volumique du constituant  $i$  après l'étape  $i$ ) est alors ajusté pour que les spectres théorique et expérimental coïncident. Nous détaillons ci-après la méthode appliquée aux différentes étapes.

#### Etape 0 : après élaboration du silicium poreux

Les constituants à cette étape sont l'air et le silicium. On a donc :

$$C_{air} + C_{Si} = 1$$

et l'équation de Bruggeman s'écrit :

$$C_{air} \cdot \frac{1 - n^2}{1 + 2n^2} + C_{Si} \cdot \frac{n_{Si}^2 - n^2}{n_{Si}^2 + 2n^2} = 0$$

A partir de ces 2 équations, l'indice de la couche poreuse  $n$  peut s'exprimer en fonction d'une seule inconnue :  $C_{air}$  ; l'épaisseur mesurée par MEB étant fixé.

Pour une valeur de  $C_{air}$  donnée, connaissant l'évolution de  $n_{Si}$  en fonction de la longueur d'onde, on peut donc déterminer l'évolution de l'indice du silicium poreux ( $n$ ) en fonction de la longueur d'onde. Un spectre théorique de réflectance de la couche poreuse peut donc être calculé. Celui-ci est comparé au spectre expérimental. On cherche alors la valeur de  $C_{air}$  qui permet d'ajuster les 2 spectres. On en déduit ensuite la valeur de  $C_{Si}$  à partir de la première équation.

#### Etape 1 : après gravure RIE

Ayant pour objectif l'ouverture des pores à la surface de l'échantillon, la gravure RIE élimine la fine couche de surface sans modifier la composition de la couche poreuse. Ainsi, les constituants à cette étape sont l'air et le silicium. Les équations appliquées pour l'étape précédente sont alors valables pour celle-ci. En supposant que la gravure RIE est sans effet sur la porosité de la couche de silicium poreux, l'ajustement entre le spectre théorique et expérimental s'effectue alors en diminuant l'épaisseur utilisée dans l'étape 0.

### Etape 2 : Oxydation partielle du silicium poreux

Les constituants à cette étape sont l'air, le silicium et la silice :

Soit  $C$ , la fraction du silicium qui s'oxyde. La nouvelle fraction du silicium est alors  $C_{Si} - C$ . L'oxydation du silicium s'accompagne d'une augmentation de volume. Le taux d'expansion de la transformation du silicium en silice est de 2,27 [159].

Ainsi, la fraction volumique de silice formée est égale à  $C_{SiO_2} = 2,27 \cdot C$ . La porosité diminue alors d'une fraction volumique égale à  $1,27 \cdot C$ .

L'équation de Bruggeman s'écrit alors :

$$(C_{air} - 1,27C) \cdot \frac{1 - n^2}{1 + 2n^2} + (C_{Si} - C) \cdot \frac{n_{Si}^2 - n^2}{n_{Si}^2 + 2n^2} + 2,27 \cdot C \cdot \frac{n_{SiO_2}^2 - n^2}{n_{SiO_2}^2 + 2n^2} = 0$$

$C_{air}$  et  $C_{Si}$  ayant été déterminées à l'étape précédente, la seule inconnue dans cette équation est la fraction de silicium s'oxydant :  $C$ .

En fixant une valeur de  $C$  et en résolvant l'équation de Bruggeman, on en déduit l'indice de la couche de silicium poreux partiellement oxydée. On définit le taux d'oxydation par le rapport  $\tau = \frac{C}{C_{Si}}$ .

Le taux ajustant les spectres expérimental et théorique permet d'en déduire la fraction de silicium oxydée  $C$  et les nouvelles fractions volumiques d'air  $C'_{air}$  et de silicium  $C'_{Si}$  :

$$C'_{air} = 1 - C_{SiO_2} - (C_{Si} - C) = 1 - 2,27C + C - (1 - C_{air}) = C_{air} - 1,27C$$

$$C'_{Si} = C_{Si} - C$$

### Etape 3 : Silanisation

Les constituants à cette étape sont l'air, le silicium, la silice et l'APTES (molécule 1). On a alors :

$$C''_{air} + C'_{Si} + C_{SiO_2} + C_{mol_1} = 1$$

avec :

$$C''_{air} = C'_{air} - C_{mol_1}$$

L'équation de Bruggeman s'écrit alors :

$$C''_{air} \cdot \frac{1 - n^2}{1 + 2n^2} + C'_{Si} \cdot \frac{n_{Si}^2 - n^2}{n_{Si}^2 + 2n^2} + C_{SiO_2} \cdot \frac{n_{SiO_2}^2 - n^2}{n_{SiO_2}^2 + 2n^2} + C_{mol_1} \cdot \frac{n_{mol_1}^2 - n^2}{n_{mol_1}^2 + 2n^2} = 0$$

$C'_{air}$ ,  $C'_{Si}$  et  $C_{SiO_2}$  ayant été déterminées à l'étape précédente, la seule inconnue dans cette équation est la fraction volumique d'APTES ( $C_{mol_1}$ ) dans les pores lors de la silanisation en connaissant l'indice de réfraction  $n_{mol_1}$  (égal à 1,423 selon [160]) supposé constant dans la gamme de longueur

d'onde utilisée. Pour une valeur de  $C_{mol_1}$ , en résolvant l'équation de Bruggeman, l'indice de la couche de silicium poreux partiellement oxydée et silanisée est calculé. A partir de la valeur de  $C_{mol_1}$  permettant d'ajuster les spectres expérimental et théorique, on en déduit la fraction volumique d'APTES  $C_{mol_1}$  ainsi que la nouvelle fraction volumique d'air  $C_{Air}'''$  (les fractions volumiques de silicium et de silice restent constantes).

#### Etape 4 : Couplage aldéhyde

Les constituants à cette étape sont l'air, le silicium, la silice, l'APTES (molécule 1) et le glutaraldéhyde (molécule 2).

On a alors :

$$C_{air}''' + C_{Si}' + C_{SiO_2} + C_{mol_1} + C_{mol_2} = 1$$

avec :

$$C_{air}''' = C_{air}'' - C_{mol_1} - C_{mol_2} = C_{air}'' - C_{mol_2}$$

L'équation de Bruggeman s'écrit alors :

$$C_{air}''' \cdot \frac{1 - n^2}{1 + 2n^2} + C_{Si}' \cdot \frac{n_{Si}^2 - n^2}{n_{Si}^2 + 2n^2} + C_{SiO_2} \cdot \frac{n_{SiO_2}^2 - n^2}{n_{SiO_2}^2 + 2n^2} + C_{mol_1} \cdot \frac{n_{mol_1}^2 - n^2}{n_{mol_1}^2 + 2n^2} + C_{mol_2} \cdot \frac{n_{mol_2}^2 - n^2}{n_{mol_2}^2 + 2n^2} = 0$$

$C_{Air}''$ ,  $C_{Si}'$ ,  $C_{SiO_2}$  et  $C_{mol_1}$  ayant été déterminées à l'étape précédente, la seule inconnue est ici la fraction volumique de glutaraldéhyde  $C_{mol_2}$  dans les pores lors du couplage.

Pour une valeur de  $C_{mol_2}$ , en résolvant l'équation de Bruggeman, l'indice de la couche de silicium poreux partiellement oxydée, silanisée et ayant subi l'opération de couplage est calculé en connaissant l'indice de réfraction  $n_{mol_2}$  (égal à 1,4338 selon [161]) supposé constant dans la gamme de longueur d'onde utilisée. A partir de la valeur de  $C_{mol_2}$  permettant d'ajuster les spectres expérimental et théorique, on en déduit la fraction volumique de glutaraldéhyde  $C_{mol_2}$  ainsi que la nouvelle fraction volumique d'air  $C_{Air}'''$ .

#### Etape 5 : Greffage des anticorps anti-glucagon ou autre substance protéique

Les constituants à cette étape sont l'air, le silicium, la silice, l'APTES (molécule 1), le glutaraldéhyde (molécule 2) et la protéine (molécule 3).

On a alors :

$$C_{air}''' + C_{Si}' + C_{SiO_2} + C_{mol_1} + C_{mol_2} + C_{mol_3} = 1$$

avec :

$$C_{air}'''' = C_{air}' - C_{mol1} - C_{mol2} - C_{mol3} = C_{air}'' - C_{mol3}$$

L'équation de Bruggeman est alors égale à :

$$C_{air}'''' \cdot \frac{1 - n^2}{1 + 2n^2} + C_{Si}' \cdot \frac{n_{Si}^2 - n^2}{n_{Si}^2 + 2n^2} + C_{SiO_2} \cdot \frac{n_{SiO_2}^2 - n^2}{n_{SiO_2}^2 + 2n^2} + C_{mol1} \cdot \frac{n_{mol1}^2 - n^2}{n_{mol1}^2 + 2n^2} + C_{mol2} \cdot \frac{n_{mol2}^2 - n^2}{n_{mol2}^2 + 2n^2} + C_{mol3} \cdot \frac{n_{mol3}^2 - n^2}{n_{mol3}^2 + 2n^2} = 0$$

$C_{Air}''''$ ,  $C_{Si}'$ ,  $C_{SiO_2}$ ,  $C_{mol1}$  et  $C_{mol2}$  ayant été déterminées à l'étape précédente, la seule inconnue dans cette équation est la fraction volumique de l'immunoglobuline IgG (ou autre substance protéique comme l'albumine) dans les pores en connaissant l'indice de réfraction  $n_{mol3}$  (égal à 1,46 selon [162]) supposé constant dans la gamme de longueur d'onde utilisée. Pour une valeur de  $C_{mol3}$ , en résolvant l'équation de Bruggeman, l'indice de la couche de silicium poreux partiellement oxydée et fonctionnalisée est calculé. A partir de la valeur de  $C_{mol3}$  permettant d'ajuster les spectres expérimental et théorique, on en déduit la fraction volumique d'IgG,  $C_{mol3}$ , ainsi que la nouvelle fraction volumique d'air  $C_{Air}''''$ .

L'ensemble de ces formalismes, dans les cas de monocouches et multicouches, sera utilisé dans un premier temps pour une étude théorique sur l'influence des facteurs de mérite (porosité, diamètre des pores et degré d'oxydation), sur la réponse optique de structures photoniques à base de silicium poreux lors de la fonctionnalisation (section 3.6) et dans un deuxième temps pour exploiter les résultats d'une étude expérimentale et le suivi physico-chimique du silicium poreux à partir des spectres expérimentaux et en les ajustant aux spectres théoriques (chapitre 4).

### 3.6 Etude des facteurs de mérite pour la fonctionnalisation de structures photoniques à base de silicium poreux

Dans l'objectif de prévoir l'évolution de la réponse spectrale des structures monocouches et multicouches en fonction des étapes de traitement thermique et chimiques du silicium poreux, nous avons effectué une étude théorique sur l'influence de certains paramètres tels que le diamètre des pores, la porosité et le taux d'oxydation sur la réponse spectrale de la réflectance calculée par le formalisme des matrices de transfert et faisant intervenir le modèle de Bruggeman décrit auparavant. Les résultats de cette étude sont présentés et discutés dans la publication annexée à la fin du manuscrit (voir Annexe : Publications et posters). Nous décrivons dans cette section assez brièvement les principaux résultats obtenus.

### 3.6.1 Cas des monocouches de silicium poreux

Avec les monocouches en silicium poreux, nous nous sommes intéressés particulièrement à étudier l'effet du diamètre des pores et du degré d'oxydation par traitement thermique sur la réflectivité du milieu effectif constitué par ces couches avant et après fonctionnalisation complète. Ainsi, pour des monocouches de fortes porosité (80 %) et d'épaisseur égale à  $2 \mu\text{m}$ , nous avons simulé la variation de l'indice effectif du milieu en fonction du diamètre moyen des pores et ce pour des degrés d'oxydation respectivement égaux à 0, 50, et 100 % (figure 3.10). Les diamètres des pores utilisés sont compris entre 50 et 400 nm. Dans cet intervalle de taille de pores, nous estimons qu'il est possible d'obtenir un revêtement moléculaire homogène d'une épaisseur égale à 18,5 nm (longueur totale de l'assemblage APTES + glutaraldéhyde + anticorps) après fonctionnalisation de la couche poreuse. D'ailleurs, cet intervalle inclut le diamètre moyen (56 nm) de la monocouche poreuse que nous avons choisi d'utiliser pour la conception de notre application de biodétection (section 2.2.2, chapitre 2).

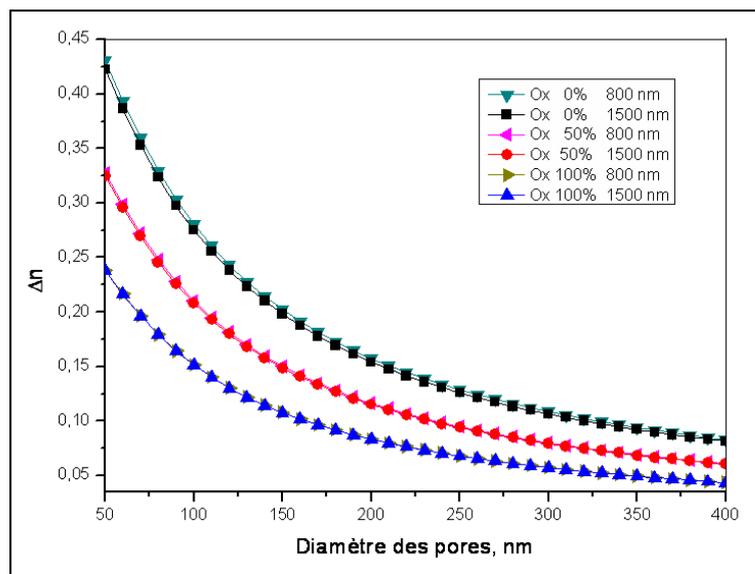


Figure 3.10 – Simulation de l'évolution de la variation de l'indice de réfraction ( $\Delta n$ ) d'une monocouche de silicium poreux ( $p = 0,8$  et  $e = 2 \mu\text{m}$ ) engendrée par la fonctionnalisation chimique en fonction du diamètre des pores et du degré d'oxydation.

En tenant compte de la dispersion de l'indice de réfraction de chacun des composants, silicium (Si) et silice ( $\text{SiO}_2$ ), la variation de l'indice de réfraction de la couche poreuse entraînée par le recouvrement de la surface des pores par le film de matière organique a été calculée aux deux longueurs d'onde 800 nm et 1500 nm. Pour un diamètre des pores bien défini et un taux d'oxydation déterminé, la différence entre les variations d'indice de réfraction à ces longueurs d'onde est très peu visible sur les courbes de la figure 3.10. De très faible amplitude, cette différence est comprise entre une valeur minimale égale à  $10^{-4}$  (pour un diamètre des pores égal à 400 nm et un degré d'oxydation égal à

100 %) et une valeur maximale égale à  $8 \times 10^{-3}$  (pour un diamètre des pores égal à 50 nm et un degré d'oxydation égale à 0 %). Ainsi, nous constatons que la variation de l'indice de réfraction relevée à 800 nm est toujours supérieure à celle relevée à 1500 nm.

Concernant l'effet du traitement thermique, nous observons que la fonctionnalisation chimique de la couche poreuse entraîne des variations d'indice de réfraction d'autant plus importante que le degré d'oxydation est faible. Par exemple pour un diamètre des pores égale à 50 nm, et un degré d'oxydation égal à zéro,  $\Delta n_{1500nm}$  est égal à 0,4227. Pour la même valeur de diamètre et des degrés d'oxydation égaux à 50 et 100 %, les variations d'indice de réfraction sont respectivement égales à 0,3248 et 0,2381.

Quant à l'influence du diamètre des pores sur la variation de l'indice de réfraction de la couche poreuse suite à sa fonctionnalisation chimique, les résultats permettent de déduire que les deux paramètres n'évoluent pas dans le même sens. En effet, indépendamment du degré d'oxydation, l'augmentation des ouvertures des pores serait accompagnée par une diminution de  $\Delta n$  calculée à 800 ou à 1500 nm. A condition de laisser infiltrer des molécules biologiques de grandes tailles comme les anticorps, les pores de faibles diamètres sont alors favorables pour une biodétection plus sensible.

### 3.6.2 Cas des multicouches de silicium poreux

Sur la base des résultats obtenus avec les monocouches, nous avons effectué une étude théorique sur la fonctionnalisation du silicium poreux structuré en miroir de Bragg et en microcavité. Le facteur de mérite choisi lors de cette étude est la porosité. En effet nécessitant l'utilisation de deux couches d'indice de réfraction différents, ces structures sont composées de la répétition d'une bicouche altérant deux porosités  $P_1$  et  $P_2$ . Les trois couples de porosités que nous avons choisi d'étudier sont 95 %/80 %, 95 %/65 % et 80 %/65 %. A ces couples de porosités correspondent les miroirs de Bragg respectifs 1, 2 et 3 et les microcavités respectives 1, 2 et 3. Les épaisseurs des couches ont été choisies de telle manière que les réponses spectrales de ces multicouches à base de silicium poreux soient centrées à 800 nm. Les diamètres moyens des pores attribués aux valeurs de porosités 65, 80 et 95 % sont respectivement 51, 57 et 60 nm. Le nombre d'alternances des bicouches  $P_1/P_2$  a été calculé de façon à obtenir pour chacune des structures une épaisseur totale égale à 5  $\mu\text{m}$ .

#### a. Miroirs de Bragg

Sur la figure 3.11 nous présentons l'évolution du déplacement spectral " $\Delta \lambda_0$ " entraîné par la bio-fonctionnalisation complète (silanisation, couplage aldéhyde et fixation des anticorps) de chacun des miroirs 1, 2 et 3 en fonction du degré d'oxydation. Nous constatons que l'amplitude de la réponse spectrale à la fonctionnalisation est d'autant plus importante que le degré d'oxydation est faible. Etant liée à l'évolution de la variation de l'indice de réfraction des couches poreuses constituant la structure multicouche, ce résultat est complémentaire à ce que nous avons déduit lors de l'étude des mono-

couches. Nous pouvons ainsi conclure que la sensibilité de la réponse spectrale des monocouches ou des multicouches de type miroir de Bragg à base de silicium poreux à la présence de substance organique suite à la biofonctionnalisation ou pour une étape ultérieure de biodétection est d'autant plus importante que le degré d'oxydation est faible.

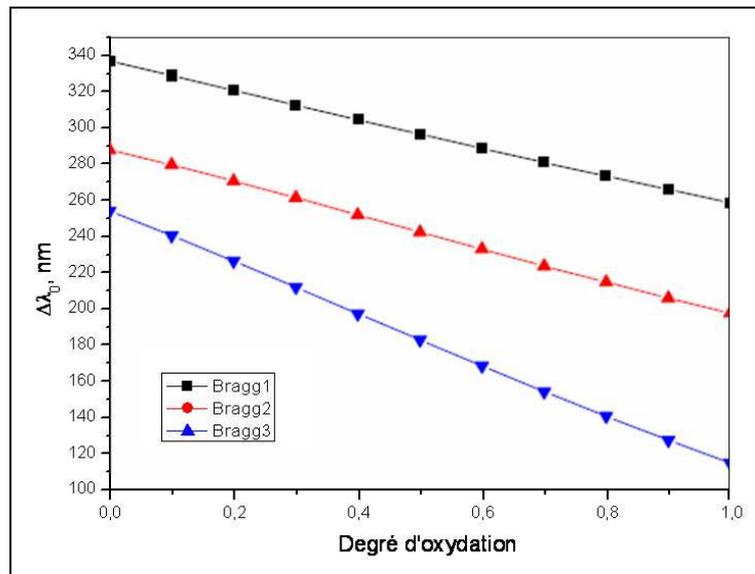


Figure 3.11 – Simulation de l'évolution du déplacement spectral ( $\Delta\lambda_0$ ) entraîné par la fonctionnalisation chimique de trois miroirs de Bragg en fonction du degré d'oxydation.

Sur la même figure, la comparaison entre les déplacements spectraux simulés pour les trois miroirs de Bragg 1, 2 et 3 montre l'avantage du couple de porosité 95 %/80 % par rapport aux couples 80 %/65 % et 95 %/65 %. En effet, avec tous les degrés d'oxydation, le déplacement spectral " $\Delta\lambda_0$ " dû à la fonctionnalisation est plus important avec le miroir de Bragg 1. Ce miroir composé de couches les plus poreuses peut alors être considéré comme le plus sensible des trois structures pour détecter la présence de substances organiques au sein de ces couches poreuses.

### b. Microcavités

Avec des microcavités obtenues à partir des miroirs de Bragg 1, 2 et 3, nous avons simulé le déplacement du pic de résonance du spectre de réflectance de chaque structure en fonction de l'épaisseur du film organique tapissant les pores. Ce film correspondrait aux molécules de glucagon détectées par les anticorps spécifiques lors d'une étape supplémentaire survenant après la biofonctionnalisation.

Les résultats obtenus (figure 3.12) confirment l'avantage de l'utilisation des fortes porosités et montrent que la microcavité contenant les bicouches de silicium poreux de porosités  $P_1$  et  $P_2$  res-

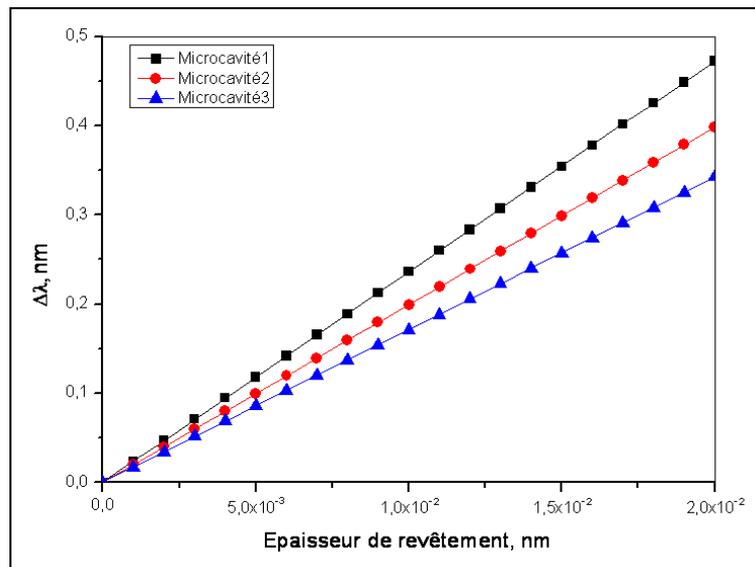


Figure 3.12 – Simulation de l'évolution du déplacement du pic de résonance ( $\Delta\lambda_0$ ) entraîné par la détection d'espèces chimiques dans trois microcavités en fonction de l'épaisseur du film organique formé.

pectivement égales à 95 et 80 % est la structure la plus sensible. Pour une résolution du système de détection égale à 0,1 nm, cette microcavité est capable de détecter une quantité d'analyte formant un film de substances organiques d'épaisseur équivalente à  $4.10^{-3}$  nm. La limite de détection d'un système de biodétection intégrant cette microcavité serait égal à  $\simeq 12$  ng/nm.

### 3.7 Conclusion

Cette étude sur les facteurs de mérite lors de la fonctionnalisation de silicium poreux nous a permis d'exploiter les outils de simulation que nous avons développés au cours de cette thèse afin de prévoir l'influence de certains paramètres sur la sensibilité de la réponse optique des monocouches, miroirs de Bragg et microcavités à base de silicium poreux. Ainsi nous avons déduit que :

- La variation de l'indice de réfraction d'une monocouche poreuse suite à l'incorporation de substances organiques dans ses pores est d'autant plus importante que le diamètre de ces interstices est faible.
- L'importance de la réponse spectrale d'une monocouche ou d'une multicouche structurée en miroir de Bragg à base de silicium poreux à la fonctionnalisation chimique dépend du degré d'oxydation du matériau.

- Les multicouches à base de silicium poreux structurées en microcavité peuvent rentrer dans la constitution de biocapteurs de haute sensibilité surtout en utilisant des couches de forte porosité.
- Exprimé par le rapport de la porosité sur le diamètre moyen des pores, selon la relation 2.5 (section 2.2.3 du chapitre 2), la surface spécifique d'une structure poreuse est en fait le paramètre critique dans l'évaluation de la sensibilité de biodétection sur silicium poreux. En effet cette sensibilité est meilleure lorsque la surface spécifique est importante (donc avec une porosité élevée et un diamètre des pores faible).

L'ensemble de ces résultats théoriques donne une grande importance aux paramètres morphologiques tels que le diamètre moyen des pores, la porosité et la surface spécifique du silicium poreux lors de la réalisation de biocapteur à base de ce matériau. Expérimentalement, l'importance de ces paramètres sera approuvée dans le chapitre suivant de la thèse qui porte sur la caractérisation physico-chimique du silicium poreux et la mise en oeuvre d'un procédé de biofonctionnalisation de monocouches et de microcavités.



## Chapitre 4

# Caractérisations physico-chimiques du silicium poreux pour la mise en oeuvre d'un procédé de biofonctionnalisation du matériau

Pour des applications de biodétection, il est important de choisir un procédé de biofonctionnalisation permettant un assemblage de stabilité élevée entre les biorécepteurs et la surface active du transducteur afin de prévoir une utilisation multiple de cette surface et donc un coût réduit de l'analyse. Ainsi, l'immobilisation par liaisons covalentes des biomolécules sur des surfaces inorganiques activées via un procédé de la chimie douce nous semblait être une orientation adaptée à notre objectif d'exploiter le silicium poreux dans une application optique de biodétection immunologique du glucagon. Nous avons alors choisi le schéma protocolaire à trois étapes qui vise à fixer les anticorps monoclonaux anti-glucagon (biorécepteurs) par leurs groupements amines ( $-NH_2$ ) sur des surfaces préalablement silanisées via l'agent de couplage homobifonctionnel, le glutaraldéhyde. Afin de mettre en place les conditions opératoires correspondant à chaque étape nous avons mené au cours de cette thèse une étude physico-chimique sur la biofonctionnalisation du silicium poreux par des éléments protéiques (immunoglobulines et albumine). Cette étude a essentiellement exploité des monocouches élaborées selon les conditions d'anodisation électrochimique établies dans la section 2.2 du chapitre 2. Des multicouches structurées en microcavité ont été aussi biofonctionnalisées à la fin de cette étude. En plus des substrats de silicium de type  $P^+$ , des substrats de type  $N^+$  ont été utilisés pour l'élaboration de couches poreuses avec des propriétés morphologiques différentes de celles que nous avons obtenu avec les premiers (substrats de type  $P^+$ ).

## 4.1 Mise en oeuvre du procédé de silanisation et biofonctionnalisation du silicium poreux monocouche

### 4.1.1 Contexte

La silanisation par des molécules d'APTES ((3aminopropyl)triethoxysilane) est le procédé chimique que nous avons choisi pour immobiliser le premier revêtement organique sur la surface des pores des échantillons de silicium poreux. En plus de son rôle principal de fixer l'agent de couplage glutaraldéhyde afin d'immobiliser les anticorps anti-glucagon, cette étape de fonctionnalisation du matériau doit permettre l'amélioration de la mouillabilité de la surface poreuse en la couvrant par des groupements fonctionnels polaires (-NH<sub>2</sub>) [163]. En effet la surface des cristallites d'un échantillon de silicium poreux fraîchement élaboré par anodisation électrochimique est principalement recouverte de liaisons peu polaires Si-H [164]. Ces liaisons sont hydrophobes et leur présence peut empêcher le remplissage par capillarité des pores avec des solutions aqueuses. Nous avons confirmé la prédominance de ces groupements hydrogénosilanes par l'analyse spectroscopique FTIR (Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier) en mode transmission d'une couche de silicium poreux détachée de son substrat. Cette couche poreuse a été obtenue en appliquant les conditions opératoires d'anodisation électrochimique et d'électropolissage mises en place par R. Liu [165] sur un substrat de silicium de type  $P^+$ , dopé avec des atomes de bore (B) et de résistivité moyenne égale à  $4.10^{-3} \Omega.cm$ . La durée d'anodisation a été adaptée afin d'obtenir une couche poreuse d'épaisseur égale à  $90 \mu m$ .

Sur la figure 4.1 est reporté le spectre infrarouge présentant la variation de l'intensité lumineuse absorbée par l'échantillon en fonction du nombre d'onde (figure 4.1) était principalement composé de bandes d'allongement ( $\nu$ ) et de déformation ( $\delta$ ) des liaisons Si-H<sub>x</sub> ( $\nu$ (Si-H) à  $2137 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu$ (Si-H<sub>2</sub>) à  $2110 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu$ (Si-H<sub>3</sub>) à  $2088 \text{ cm}^{-1}$  et  $\delta$ (Si-H<sub>x</sub>) à  $912 \text{ cm}^{-1}$  et entre  $615$  et  $671 \text{ cm}^{-1}$ ). La présence très réduite de matière organique dans cet échantillon poreux est indiquée sur le spectre par deux bandes de faible intensité  $\nu$ (C=O) à  $1653 \text{ cm}^{-1}$  et  $\delta$ (C-H<sub>x</sub>) à  $807 \text{ cm}^{-1}$ . Une bande plus large mais de faible intensité située à  $1062 \text{ cm}^{-1}$  correspond au mode d'élongation des liaisons Si-O-Si. La présence de ce groupement siloxane (Si-O-Si) est en faveur d'une oxydation spontanée, faible et superficielle des cristallites du silicium survenue après l'élaboration de l'échantillon poreux et due à la présence d'oxygène (O<sub>2</sub>) dans son environnement.

Afin de bloquer cette évolution spontanée de la composition du matériau et d'améliorer sa stabilité chimique dans le temps, une oxydation provoquée par un traitement thermique sous oxygène sera effectuée pour les échantillons de silicium poreux avant silanisation. Suivi par une immersion dans une solution piranha (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 %, 3 : 1), l'oxydation thermique des échantillons doit aussi permettre le revêtement de la surface des cristallites de silicium oxydé par des groupements silanols (-Si-OH) indispensables à la fixation des silanes. En effet la condensation en couche organisée des silanes sur les parois des cristallites nécessite l'abondance des groupements silanols ainsi que la pré-

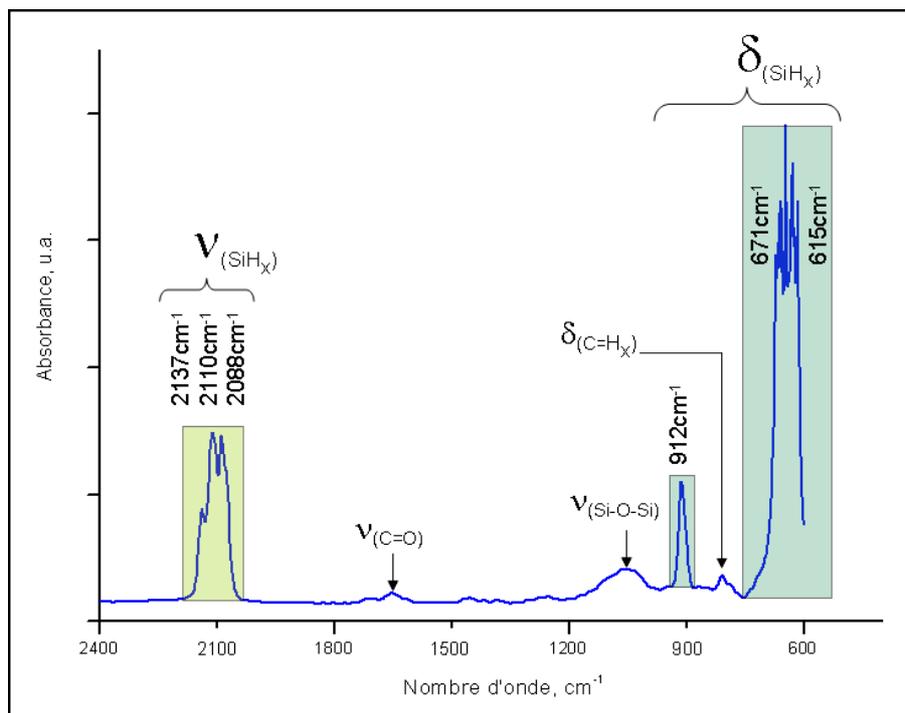


Figure 4.1 – Spectre FTIR d'une couche détachée de silicium poreux préparée par anodisation électrochimique sur une épaisseur de  $90 \mu\text{m}$ . Conditions d'anodisation : Substrat  $\text{Si P}^+(\text{B}) \sim 4.10^{-3} \Omega.\text{cm}$ ,  $t = 60 \text{ min}$ ,  $[\text{HF}] = 37,5 \%$

sence en quantité suffisante du réactif de silanisation (APTES) à cette surface.

Ainsi, dans l'objectif d'établir un protocole de silanisation nous avons suivi l'évolution physico-chimique du silicium poreux monocouche après chaque étape de sa préparation (anodisation, gravure RIE, oxydation et silanisation) en exploitant les propriétés de réflectivité optique d'une monocouche de silicium poreux. Deux protocoles de silanisation, l'un par immersion et l'autre par imprégnation ont été étudiés et sont décrits ci-dessous.

## 4.1.2 Etude de la silanisation par immersion

### a. Protocole de silanisation

Dans les années quatre-vingts, la diversification des conditions expérimentales appliquées par les chimistes dans les protocoles de silanisation des surfaces solides a fait apparaître des procédés de silanisation en milieux aqueux [166] ou anhydres [167], à des températures ambiantes [168] ou élevées [169] et avec des durées de réaction plus au moins longues (de quelques minutes [170] à quelques heures [169]). Quelques années plus tard, l'intérêt porté à ces procédés dans des applications "pointues" comme la conception des biocapteurs, a amené certains chercheurs à réaliser des études comparatives afin d'évaluer l'implication de chaque paramètre expérimental (quantité de ré-

actif de silanisation, type de solvant, température et durée de la réaction, température et durée du séchage) dans l'obtention de couches de silanes homogènes, régulières et de faible épaisseur (épaisseur la plus proche de celle d'une monocouche moléculaire) [85, 171, 172]. Ces études ont souvent utilisé l'APTES comme réactif de silanisation. Les surfaces traitées étaient celles des substrats polis de silicium et des gels de silice mésoporeux. Le traitement consistait généralement à immerger ces matériaux dans une quantité de solution suffisante pour tremper tout l'échantillon. D'après ces études : (i) la quantité du réactif de silanisation doit être en excès par rapport à la quantité d'hydroxyl recouvrant la surface à traiter, (ii) l'utilisation d'un solvant organique favorise l'organisation homogène de la couche de silane en évitant l'adsorption électrostatique des molécules d'APTES par leurs groupements ionisés  $\text{NH}^{3+}$  à la surface oxydée du matériau traité, (iii) le déroulement de la réaction de silanisation à température ambiante et sur des durées non prolongées ( $< 2$  h) favorise la formation d'un revêtement de silanes organisés en monocouche et (iv) le recuit thermique prolongé à des températures avoisinant  $150^\circ\text{C}$  permet la désorption des molécules d'APTES n'ayant pas réagi et la stabilisation de la couche de silane fixée à la surface par des liaisons covalentes.

Moyennant cette lecture, nous avons déduit les conditions expérimentales d'un procédé de silanisation par immersion des échantillons de silicium poreux. Ce procédé consiste tout d'abord à oxyder thermiquement (oxydation partielle) les cristallites de l'échantillon poreux à une température de  $300^\circ\text{C}$  durant une heure sous flux d'oxygène ( $\text{O}_2$ ). Les échantillons de silicium poreux sont ensuite trempés dans une solution piranha ( $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2$  à 30 %, 3 : 1) pendant 30 minutes afin d'augmenter le niveau d'hydroxylation (taux de recouvrement en groupement hydroxyl -OH) de la surface oxydée des cristallites. A la fin de cette étape, les échantillons ont été rincés à l'eau et séchés sous flux d'azote. Chaque échantillon de silicium poreux a été par la suite immergé dans 5 ml d'une solution d'APTES de concentration définie (entre  $5 \cdot 10^{-4}$  % et 1 %) dans du toluène pur. L'ensemble (silicium poreux et solution d'APTES) a été maintenu en contact pendant une heure, à température ambiante et sous une agitation de faible vitesse dans un flacon en téflon monté sur un agitateur de type Vortex. A la fin de cette réaction de silanisation, chaque échantillon de silicium poreux a été rincé à l'éthanol, ensuite séché sous un flux d'azote pour subir enfin un recuit de 15h dans une étuve à  $150^\circ\text{C}$ . L'efficacité de ce procédé de silanisation a été évaluée après estimation par réflectométrie de la couche de silane tapissant les parois des pores pour chaque concentration d'APTES utilisée.

## b. Résultats

Le protocole de silanisation par immersion, décrit ci-dessus, a été appliqué sur cinq échantillons de silicium poreux élaborés par anodisation électrochimique du silicium type  $\text{P}^+$  dans les conditions prédéfinies à la fin de l'étude préliminaire (section 2.2) et pour une durée d'anodisation égale à 120 s. L'analyse spectroscopique des échantillons à chaque étape de préparation (après anodisation, après gravure, après oxydation et après silanisation) et l'ajustement des spectres de réflectance ainsi obtenus aux spectres théoriques simulés a permis la caractérisation des échantillons. Dans le tableau 4.1 sont

présentés les paramètres physico-chimiques que nous avons déterminé à chaque étape de la fonctionnalisation par ajustement du spectre de réflectance théorique (simulé à l'aide du programme décrit dans le chapitre 3) au spectre expérimental de la couche poreuse. Les valeurs de l'épaisseur de la couche poreuse avant et après gravure RIE ainsi que les valeurs d'indice de réfraction et de porosité avant silanisation correspondent aux moyennes des valeurs obtenues avec les cinq échantillons de silicium poreux.

Avant gravure RIE, la couche poreuse fraîchement préparée par anodisation électrochimique a une

		e (nm)	n	p (%)	$C_{APTES} = C_{mol_1}$ (%)
<b>Après anodisation</b>		*3000	1,111	91,5	0
<b>Après gravure RIE</b>		2110			
<b>Après oxydation</b>			1,081	81,7	
<b>Après silanisation</b>	C <sub>0</sub>		1,082	80,0	
	C <sub>1</sub>		1,113	72,3	5
	C <sub>2</sub>		1,122	72,3	5
	C <sub>3</sub>		1,109	78,9	8
	C <sub>4</sub>	1,103	75,0	8	

\*valeur mesurée après observations MEB.  $C_{APTES}$  : Fraction volumique d'APTES.

C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub> correspondent aux concentrations de la solution de silanisation 0 %,  $5.10^{-4}$  %,  $5.10^{-2}$  %, 0,5 % et 1 % respectivement.

Tableau 4.1 – Caractérisation des monocouches de silicium poreux avant et après silanisation par immersion.

épaisseur mesurée par MEB égale à 3000 nm  $\pm$  100 nm. La porosité de cette couche poreuse estimée par ajustement des spectres est égale à 91,5 %  $\pm$  0,5 %. A cette valeur de porosité correspond un indice de réfraction égal à  $1,111 \pm 7.10^{-3}$ .

Les spectres de réflectance de la couche poreuse de l'échantillon silanisée avec la concentration d'APTES la plus faible (C<sub>1</sub> =  $5.10^{-4}$  %) sont présentés sur la figure 4.2 pour chaque étape de la fonctionnalisation.

#### – Effet de la gravure

L'observation directe du spectre de réflectance de la couche poreuse après gravure RIE montre une diminution du nombre de franges d'interférence accompagnée par une réduction de leur visibilité. Comme nous l'avons expliqué précédemment, ceci est dû à l'augmentation de la rugosité de l'échantillon au niveau de l'interface couche poreuse/air et la diminution de l'épaisseur optique de la monocouche analysée. La simulation théorique de cette transformation spectrale révèle, en effet, une diminution de l'épaisseur optique de la couche poreuse d'environ 1  $\mu$ m et la réduction de son épaisseur d'environ 900 nm. La faible épaisseur de la couche de surface peu poreuse (environ 100 nm) et la forte porosité de la couche poreuse (supérieure à 90 %) laissent supposer que l'indice de réfraction et la porosité, respectivement égaux à  $1,111 \pm 7.10^{-3}$  et 91,5 %  $\pm$  0,5 %, ne subissent aucune variation après gravure RIE.

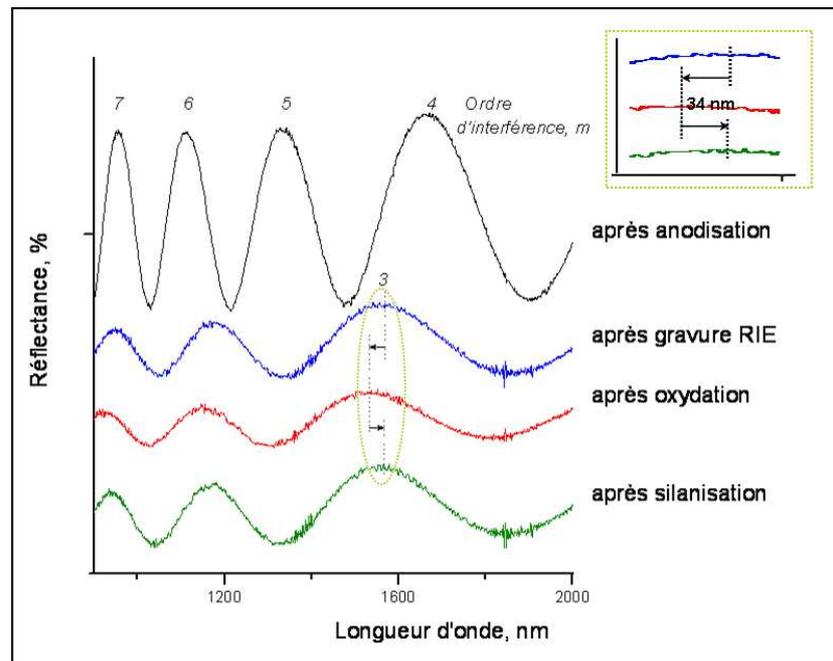


Figure 4.2 – Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux aux différentes étapes de sa préparation.

– Effet de l'oxydation thermique

Après traitement thermique des échantillons de silicium poreux ( $300^{\circ}\text{C}/1\text{h}$ ), la transformation spectrale observée se limite à un déplacement des franges d'interférences d'une trentaine de nanomètres vers les plus basses longueurs d'onde (figure 4.2). Ce déplacement a été relié à une diminution de l'épaisseur optique de la couche poreuse (de 2345 à 2278 nm). Cette variation est due à la transformation d'une proportion des cristallites de silicium séparant les pores en silice. Etant donné que la silice a un indice de réfraction ( $n = 1,46$  à  $\lambda = 2 \mu\text{m}$ ) plus faible que celui du silicium ( $n = 3,47$  à  $\lambda = 2 \mu\text{m}$ ) l'indice de réfraction de la couche poreuse diminue après oxydation thermique. Cependant, cette diminution est très faible (de l'ordre de  $3 \cdot 10^{-2}$ ) malgré un taux d'oxydation estimé à  $87\% \pm 13\%$ . Ceci est très probablement lié à la grande porosité initiale de la couche poreuse ( $91,5\% \pm 0,5\%$ ) et donc à la quantité réduite de silicium dans ce milieu (environ 9%). Occupant un volume plus important (2,7 fois) que le silicium, la silice ainsi formée réduit la proportion de l'air dans la couche poreuse et entraîne une diminution de la porosité de l'échantillon de l'ordre de 10% (tableau 4.1). Ces observations se sont basées sur un modèle d'expansion volumique reliant la nouvelle porosité " $p_{ox}$ " à la porosité initiale " $p$ " par la relation suivante [159] :

$$p_{ox} = 1 - [(1 - p)(1 + 1,27\tau)] \quad (4.1)$$

Avec " $\tau$ " (compris entre 0 et 1) égal au taux d'oxydation de la couche poreuse.

Ce phénomène d'expansion volumique serait aussi responsable d'un rétrécissement de l'ouverture des pores. Ainsi une nouvelle valeur de diamètre moyen " $D_{ox}$ " sera attribuée aux échantillons de silicium poreux à ce stade de préparation. " $D_{ox}$ " serait relié au diamètre initial par la relation suivante :

$$D_{ox} = D \sqrt{\frac{p_{ox}}{p}} \quad (4.2)$$

Cette relation a été établie à partir de la relation 2.3 (chapitre 2) exprimant le nombre de pores (N) contenus dans l'échantillon en supposant que ce nombre reste constant après traitement thermique. Ainsi le diamètre moyen des pores initialement évalué à 56 nm devient après oxydation égale à 53 nm.

#### – Effet de la silanisation

Après oxydation thermique, les cinq échantillons de silicium poreux ont été silanisés en utilisant des solutions contenant de l'APTES à des concentrations différentes :  $C_0 = 0$  % (témoin négatif),  $C_1 = 5.10^{-4}$  %,  $C_2 = 5.10^{-2}$  %,  $C_3 = 0,5$  % et  $C_4 = 1$  %. Excepté le traitement chimique utilisant la première solution ( $C_0$ ), chacun des autres traitements a provoqué un déplacement du spectre de réflectance de la couche poreuse correspondante vers les longueurs d'onde les plus élevées. Ce déplacement est associé à une augmentation de l'épaisseur optique des couches poreuses. En supposant que ces traitements n'avaient pas d'effet sur l'épaisseur physique de la couche poreuse, les variations subies par l'épaisseur optique seraient dues à l'augmentation de l'indice de réfraction de la couche poreuse (tableau 4.1). Cette augmentation d'indice est évaluée à environ  $2.10^{-2}$  pour les faibles concentrations ( $C_1$  et  $C_2$ ) et à  $4.10^{-2}$  pour les fortes concentrations. En utilisant le modèle de Bruggeman comme décrit dans le chapitre 3, ces variations d'indices ont été traduites en fractions volumiques d'APTES introduites dans les pores. Ainsi, les concentrations  $C_1$  et  $C_2$  ont permis l'introduction d'une quantité équivalente d'APTES de l'ordre de 5 % du volume de la couche poreuse. Les concentrations  $C_3$  et  $C_4$  ont aussi permis l'introduction de quantités d'APTES similaires avoisinantes les 8 %.

En supposant que la réaction de silanisation s'est déroulée de façon homogène sur toute la surface développée par les pores, nous avons attribué le paramètre physique " $e_{APTES}$ " représentant l'épaisseur de la couche de silane tapissant les parois des pores. Ce paramètre est égal au

rapport de la fraction volumique de l'APTES " $C_{APTES}$ " par la surface spécifique de la couche poreuse " $S_s$ ". En utilisant la relation 2.5 (chapitre 2), " $e_{APTES}$ " (en nm) peut être exprimée par la relation suivante :

$$e_{APTES} = \frac{C_{APTES} \cdot D_{ox}}{4P_{ox}} \quad (4.3)$$

Avec  $P_{ox}$  la porosité de la couche poreuse après oxydation thermique et  $D_{ox}$  le diamètre moyen. L'évaluation de ce paramètre, " $e_{APTES}$ ", peut nous renseigner sur l'efficacité du protocole de silanisation. En effet, l'organisation des silanes tapissant les parois des pores est d'autant plus homogène que la valeur de " $e_{APTES}$ " se rapproche de la taille des molécules d'APTES ( $\simeq 8$  Å). Pour les concentrations  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  et  $C_4$ , les valeurs des " $e_{APTES}$ " correspondantes sont respectivement égales à 8 Å, 8 Å, 13 Å et 14 Å. Gravitant autour de la taille d'une molécule d'APTES sans atteindre une épaisseur équivalente à deux couches superposées de silanes (16 Å), ces résultats sont en faveur d'un assemblage moléculaire assez homogène pour toutes les solutions actives  $C_{1-4}$ . Un avantage peut tout de même être attribué aux concentrations faibles comprises entre  $5 \cdot 10^{-4}$  % et  $5 \cdot 10^{-2}$  %. Dans cet intervalle de concentration, nous pouvons caractériser davantage la silanisation de notre matériau poreux par la détermination du taux de recouvrement " $R_{Si-R}$ " de la surface oxydée des cristallites par les silanes. Expriment le nombre de molécules d'APTES greffé par unité de surface silanisée, ce paramètre peut être relié à la masse des silanes " $m_{Si-R}$ " par la relation suivante :

$$R_{Si-R} = \frac{m_{Si-R} \cdot N_A}{M_{Si-R} \cdot A_c} \quad (4.4)$$

Avec  $N_A$  : nombre d'Avogadro,  $M_{Si-R}$  : masse molaire des silanes et  $A_c$  : la surface totale développée par les cristallites d'une couche poreuse.

En exprimant la masse des silanes " $m_{Si-R}$ " en fonction de la fraction volumique " $C_{APTES}$ " par la relation 4.5, le taux de recouvrement " $R_{Si-R}$ " peut être déterminé selon l'équation 4.6.

$$m_{Si-R} = \rho_{Si-R} C_{APTES} A_s e \quad (4.5)$$

$$R_{Si-R} = \frac{\rho_{Si-R} D_{ox} C_{APTES} N_A}{4p_{ox} M_{Si-R}} \quad (4.6)$$

Avec " $\rho_{Si-R}$ " : la masse volumique des silanes, " $A_s$ " : la surface de l'échantillon à l'interface

air/couche poreuse égale à  $1 \text{ cm}^2$  et "e" l'épaisseur de la couche poreuse.

En supposant que les silanes (Si-R) greffés à la surface des pores ont les mêmes propriétés chimiques que les molécules d'APTES utilisées (Réactif fourni par Aldrich), la masse  $m_{Si-R}$  calculée à partir de la valeur de  $C_{APTES}$  égale à 5 %, serait égale à environ  $10 \mu\text{g}$ . Le taux de recouvrement correspondant serait alors égal à  $\simeq 2,1 \text{ Si-R/nm}^2$ . Cependant, commençant par l'hydrolyse des groupements éthane ( $3x(-\text{C}_2\text{H}_5)$ ) de chaque molécule d'APTES mise en réaction, la silanisation comme décrite par F. Luderer et U. Walschus [79] (Figure 4.3) ne se limite pas à la condensation des alkoxy-silanes à la surface hydroxylée.

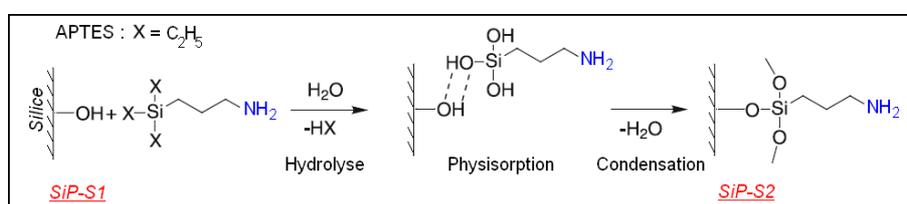


Figure 4.3 – Mécanisme réactionnel de la silanisation avec du (3aminopropyl)triéthoxysilane (APTES).

Selon ce mécanisme réactionnel, la couche de silanes greffés est composée d'assemblage de fragments moléculaires de formule chimique  $(-\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ . Etant égale à  $134 \text{ mg/ml}$ , la masse moléculaire de ces fragments est très différente de celle de l'APTES ( $221,37 \text{ mg/ml}$ ). Les autres propriétés chimiques de ces fragments de silanes, comme la masse volumique, seraient aussi différentes de celles du (3-Aminopropyl)triéthoxysilane ( $\rho_{APTES} = 0,946 \text{ g/mol}$ ). La correction des valeurs de la masse de la couche de silane et du taux de recouvrement par l'utilisation de la masse molaire calculée des fragments R-Si ( $134 \text{ mg/ml}$ ) et la masse volumique d'une substance chimique de masse moléculaire équivalente ( $1,6 \text{ g/mol}$  pour l'acide malique) permet d'ajuster " $m_{Si-R}$ " à  $\simeq 17 \mu\text{g}$ . Le taux de recouvrement " $R_{Si-R}$ " calculé selon la relation 4.6 et à partir des valeurs de  $p_{ox}$ ,  $D_{ox}$  et  $C_{APTES}$  déjà déterminés par le modèle est égal à  $\simeq 5,8 \text{ Si-R/nm}^2$ . Ce taux de recouvrement est alors de même ordre de grandeur que celui mesuré par D. G. Kurth et T. Bein [163] ( $5,3 \text{ molécules par nm}^2$  mesurées par microbalance à quartz) après dépôt en phase vapeur de fines couches d'APTES (épaisseur égale à  $5 \pm 1 \text{ \AA}$ ) sur une surface plane et anhydre.

#### 4.1.3 Etude de la silanisation par imprégnation

Utilisant des quantités assez importantes de solvant nocif et écotoxique, le protocole de silanisation par immersion dans du toluène permet un traitement chimique de tout l'échantillon de silicium poreux. Alors que seule la surface poreuse du matériau nécessite ce traitement. En effet, étant confinée

dans un volume très réduit, il a été démontré que cette surface peut être fonctionnalisée par imprégnation d'une faible quantité de solution dans le volume poreux de l'échantillon [71]. La fonctionnalisation ciblant ainsi les parois des pores peut être réalisée par le dépôt de quelques dizaines de microlitres (50  $\mu\text{l}$ ) de la solution active sur la surface circulaire (1  $\text{cm}^2$ ) de l'échantillon poreux. Dans ce cas, l'infiltration de la solution dans les pores est assurée par la force capillaire engendrée spontanément par l'affinité polaire à l'interface liquide/solide. Afin de mieux contrôler cette infiltration, certains travaux ont développé une cellule à flux continu [130]. Ainsi, dans l'objectif d'établir un protocole de silanisation permettant une fonctionnalisation efficace et limitant l'exposition aux solvants organiques toxiques, un procédé par imprégnation a été mis en oeuvre. Comme pour le procédé par immersion, le contrôle des différentes étapes de fonctionnalisation a été effectué par réflectométrie.

#### a. Protocole de silanisation

Ce procédé de silanisation commence par une oxydation thermique de la couche poreuse suivant un programme de traitement thermique permettant d'appliquer une température de 900°C pendant 10 min dans une atmosphère sous flux d' $\text{O}_2$ . L'échantillon de silicium poreux est ensuite trempé dans une solution "piranha" ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30 %, 3 : 1) pendant 30 minutes afin d'activer les groupements silanols (-Si-OH) à la surface des pores. Après rinçage à l'eau et séchage sous flux d'azote de la couche poreuse, la surface externe de celle-ci reçoit 50  $\mu\text{l}$  d'une solution hydroalcoolique (eau : méthanol, 1 : 1) d'APTES 4 %. Après une durée de réaction égale à 20 minutes dans un environnement saturé en humidité, l'échantillon est séché pendant 10 minutes dans une étuve à 100°C.

#### b. Résultats

Le protocole de silanisation par imprégnation décrit ci-dessus, a été appliqué sur une monocouche poreuse d'un échantillon élaboré par anodisation électrochimique d'un substrat de silicium de type  $\text{P}^+$  durant 200 s. Toutes les autres conditions d'anodisation et de gravure RIE sont identiques à celles appliquées pour élaborer les échantillons qui ont été expérimentés avec le protocole de silanisation par immersion.

Dans le tableau 4.2, sont présentés les paramètres physiques déterminés à chaque étape de la fonction-

	e (nm)	n	p (%)	$C_{mol_1}$ (%)
<b>Après anodisation</b>	*5300	1,128	90,5	0
<b>Après gravure RIE</b>	4620			
<b>Après oxydation</b>	4540	1,088	78,5	
<b>Après silanisation</b>		1,117	71,5	

\*valeur mesurée après observations MEB

Tableau 4.2 – Caractérisation des monocouches de silicium poreux avant et après silanisation par imprégnation.

nalisation à partir de l'ajustement des spectres de réflectance expérimentaux aux spectres théoriques

simulés par le programme décrit dans le chapitre 3 de cette thèse. Sur la figure 4.4 sont présentés les spectres expérimentaux correspondant aux différentes étapes de préparation de l'échantillon silanisé par imprégnation.

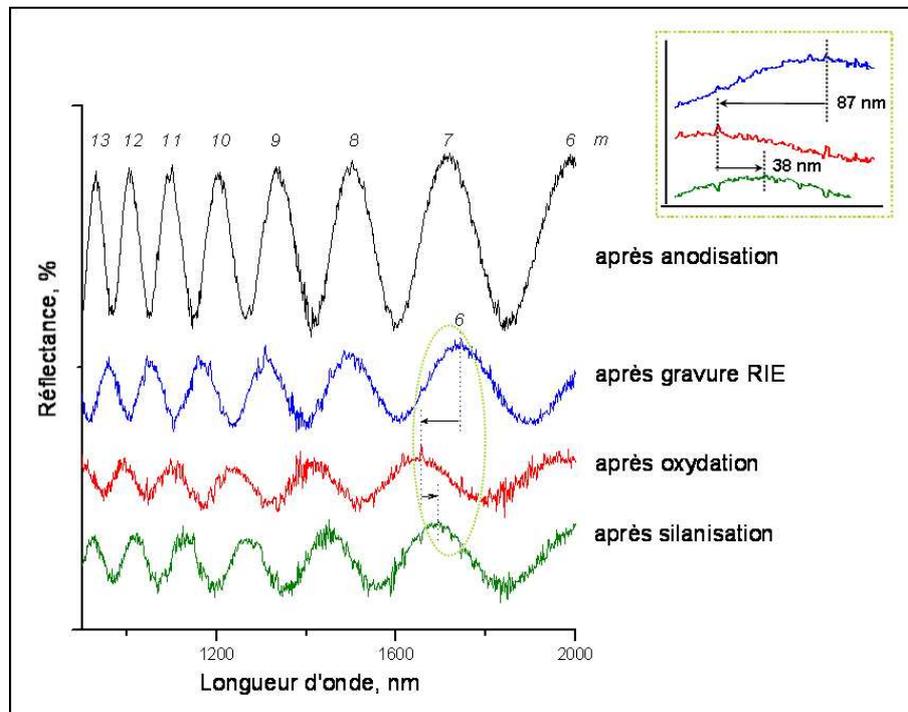


Figure 4.4 – Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux à différentes étapes de sa préparation.

– Effet de la gravure RIE

Les conséquences de la gravure RIE sur le spectre de réflectance de la couche poreuse sont similaires à celles obtenues auparavant. En effet nous observons d'une part la réduction de la largeur du spectre liée à l'augmentation de la rugosité au niveau de l'interface couche poreuse/air, et d'autre part la diminution de nombre de franges d'interférence liée à l'élimination d'une partie de l'épaisseur poreuse d'environ 700 nm. (figure 4.4).

– Effet de l'oxydation thermique

Le traitement thermique utilisant des conditions expérimentales différentes (900°C/10 min) de celles employées avec la série d'échantillons silanisés par immersion (300°C/1h), a entraîné un déplacement spectral de même signe (vers les plus basses longueurs d'onde) mais de valeur plus importante (100 ± 30 nm). Par simulation, ce déplacement spectral a été associé à une oxydation totale ( $\tau = 100\%$ ) de la couche poreuse accompagnée d'une légère réduction de son

épaisseur ( $\approx 100$  nm). Sur d'autres échantillons élaborés et oxydés dans les mêmes conditions, cette variation de l'épaisseur a atteint 200 nm. Ces résultats laissent supposer que l'expansion volumique des cristaux de silicium situés au niveau de l'interface couche poreuse/substrat serait responsable d'une obstruction des pores dans la partie inférieure de la couche poreuse. Dans ce qui suit concernant les études de fonctionnalisation, et afin d'éviter un tel effet de l'oxydation sur la structure poreuse, nous avons employé le traitement thermique le moins oxydant avant le protocole de silanisation par immersion.

#### – Effet de la silanisation

L'effet de la réaction de silanisation selon le protocole par imprégnation est similaire à celui que nous avons observé avec le protocole d'immersion. En effet, un déplacement du spectre de réflectance d'environ +38 nm (calculé entre les franges d'interférence d'ordre "m" égal à 6) a été obtenu après cette étape de fonctionnalisation. Cette transformation correspond à une fraction volumique d'APTES ( $C_{APTES} = C_{mol_1}$ ) estimée égale à 7 %. L'épaisseur de la couche de silane déterminée en appliquant la relation 4.3 est d'environ 12 Å. Le taux de recouvrement correspondant est d'environ 8,2 molécules par nm<sup>2</sup>. Ces résultats sont en adéquation avec celles mesurées par ellipsométrie ( $11 \pm 1$  Å) et microbalance à quartz (8 molécules par nm<sup>2</sup>) après dépôt en phase vapeur de l'APTES sur la surface hydratée [163]. Ainsi, nous pouvons conclure que, sur le plan chimique, les deux protocoles de silanisation par immersion et par imprégnation sont d'efficacité équivalente. Cependant, étant plus rapide à réaliser et utilisant de faibles quantités de solvant organique toxique, le protocole de silanisation par imprégnation nous a semblé être plus avantageux. Seules les conditions de traitement thermique seront remplacées par celles utilisées avec le protocole d'immersion afin d'éviter une réduction imprévisible de l'épaisseur de la couche poreuse après oxydation.

Après avoir établi les conditions expérimentales permettant une silanisation efficace du silicium poreux, nous avons mis en place un procédé chimique permettant de compléter la fonctionnalisation du matériau par une première réaction fixant l'agent de couplage "glutaraldéhyde" et une deuxième réaction immobilisant les anticorps anti-glucagon. Les résultats de caractérisations physico-chimiques de la monocouche de silicium poreux lors de sa fonctionnalisation sont présentés dans la partie suivante de ce chapitre.

## 4.2 Biofonctionnalisation du silicium poreux monocouche

### 4.2.1 Protocole de biofonctionnalisation

Biofonctionnaliser une surface consiste à la recouvrir d'un revêtement de nature biologique en utilisant la fonctionnalisation chimique. Dans le domaine des biocapteurs, la biofonctionnalisation

constitue la méthode par laquelle le biorécepteur est attaché au transducteur. Ayant choisi l'anticorps anti-glucagon "IgG" comme biorécepteur pour notre application de biodétection sur silicium poreux, nous avons mis en place un protocole de fonctionnalisation permettant dans un premier temps la fixation des molécules de couplage bifonctionnelles "glutaraldéhyde" et dans un deuxième temps l'immobilisation des immunoglobulines sur une surface poreuse préalablement silanisée. Comme pour l'étape de silanisation, ce protocole emploie l'imprégnation comme procédé d'infiltration des solutions actives dans les pores des échantillons. Les conditions expérimentales relatives à ces deux étapes de fonctionnalisation sont présentées dans le chapitre 2 de cette thèse (paragraphe 2.1.2.c). Ces conditions ont été établies en se basant sur des travaux assez avancés dans le domaine de fixation par liaisons covalentes de substances protéiques sur des surfaces de silice planes et poreuses [71, 173, 174, 175]. L'efficacité de l'ensemble des traitements chimiques appliqués dans l'objectif d'immobiliser les anticorps anti-glucagon a été évaluée dans un premier temps par spectroscopie RAMAN et dans un deuxième temps par réflectométrie.

#### 4.2.2 Résultats des caractérisations par spectroscopie RAMAN

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'aptitude du procédé de fonctionnalisation (silanisation et biofonctionnalisation) décrit précédemment pour assurer le greffage moléculaire en profondeur des couches du silicium poreux. Ayant une composition biochimique (assemblage d'acides aminés) proche de celle des immunoglobulines, l'albumine (BSA) a été la substance biologique que nous avons utilisée dans la dernière étape de biofonctionnalisation. Une monocouche de silicium poreux de porosité et d'épaisseur respectivement égales à  $91 \pm 1 \%$  et  $4630 \pm 100$  nm après gravure RIE a été oxydée thermiquement à  $300^\circ\text{C}$  pendant une heure puis fonctionnalisée. Les analyses RAMAN de cette monocouche avant et après silanisation (étapes SiP-S1 et SiP-S2), après couplage aldéhyde (SiP-S3) et après réaction de l'albumine (SiP-S4) ont été réalisées en volume à une distance d'environ  $1,5 \mu\text{m}$  de la surface de l'échantillon. Les spectres correspondant à ces analyses dans l'intervalle de fréquences comprises entre  $800$  et  $1800 \text{ cm}^{-1}$  sont représentés sur la figure 4.5. Sur cette zone spectrale une raie de forte intensité caractéristique du mode vibrationnel associé à la déformation des liaisons Si-O apparaît entre  $930$  et  $1000 \text{ cm}^{-1}$ . Cette raie présente sur tous les spectres, témoigne de la forte oxydation qu'a subi le silicium contenu dans la couche poreuse. Suite à l'étape de silanisation, nous avons observé la formation d'une faible raie à  $1450 \text{ cm}^{-1}$ . L'intensité de cette raie s'est amplifiée après couplage glutaraldéhyde et atteint un maximum après la réaction des protéines "BSA". Associée au mode vibrationnel par déformation des liaisons C-H<sub>x</sub>, cette raie révèle l'infiltration des pores par des substances organiques. La croissance de son intensité est l'indice d'un greffage moléculaire efficace en volume des produits (APTES, glutaraldéhyde et albumine) mis en réaction à chaque étape de fonctionnalisation de la couche poreuse. La fixation de l'albumine est particulièrement marquée par l'émergence de deux raies spécifiques aux amides tertiaires. Situées à  $1310 \text{ cm}^{-1}$  et  $1660 \text{ cm}^{-1}$ , ces deux raies sont attribuées aux modes vibrationnels respectifs des liaisons chimiques C-N et C=O

contenues dans les liaisons peptidiques de l'albumine.

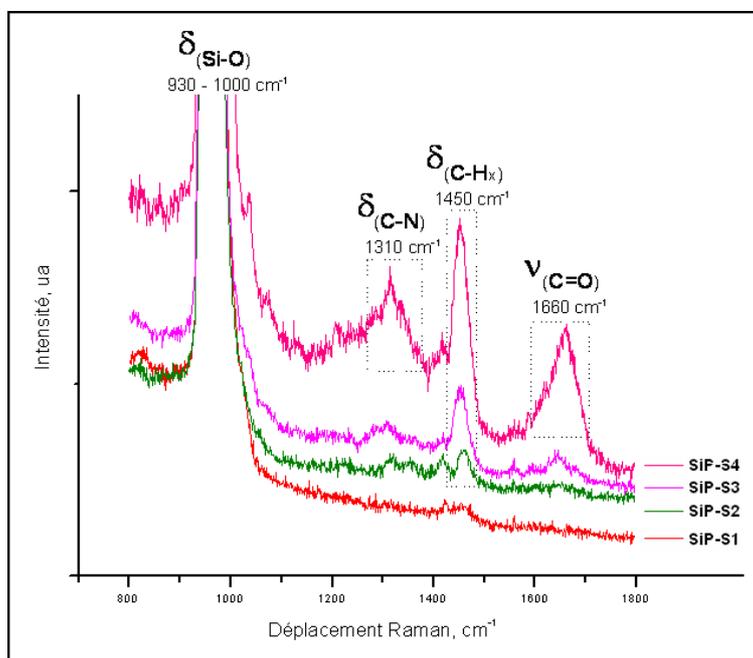


Figure 4.5 – Spectres RAMAN d'une couche de silicium poreux à différentes étapes de sa biofonctionnalisation.

Afin d'attester du greffage de cette protéine sur toute la surface interne des cristallites, nous avons étudié l'évolution des trois raies, C-N, C-H<sub>x</sub> et C=O dans tout le volume poreux. Pour cela, trois régions respectivement situées en haut, au milieu et en bas de la couche poreuse ont été analysées. Les spectres RAMAN ainsi obtenus sont présentés sur la figure 4.6.

Nous constatons la persistance des trois signaux relatifs aux liaisons à base de carbone dans les trois spectres. Une légère diminution de la visibilité des signaux caractéristiques des liaisons peptidiques est tout de même remarquée sur le spectre issu de l'analyse la plus profonde (figure 4.6.c). Ceci est probablement dû à l'intégration d'une partie du substrat de silicium dans cette région d'analyse. Ces résultats affirment ainsi une présence protéique dans tout le volume de la couche poreuse. Ayant pris toutes les précautions opératoires nécessaires pour empêcher l'adsorption non covalente de l'albumine à la surface poreuse (addition d'un agent tensioactif non ionique "Tween® 60" à la solution active limitant la fixation par adsorption des protéines et lavage spécifique éliminant les molécules qui n'ont pas réagi), cette présence protéique prouve la formation de liaisons covalentes entre les molécules de l'albumine et la surface poreuse recouverte de groupements aldéhydes lors de la dernière étape de la biofonctionnalisation.

Ainsi, nous pouvons conclure que les résultats des analyses RAMAN que nous avons réalisées

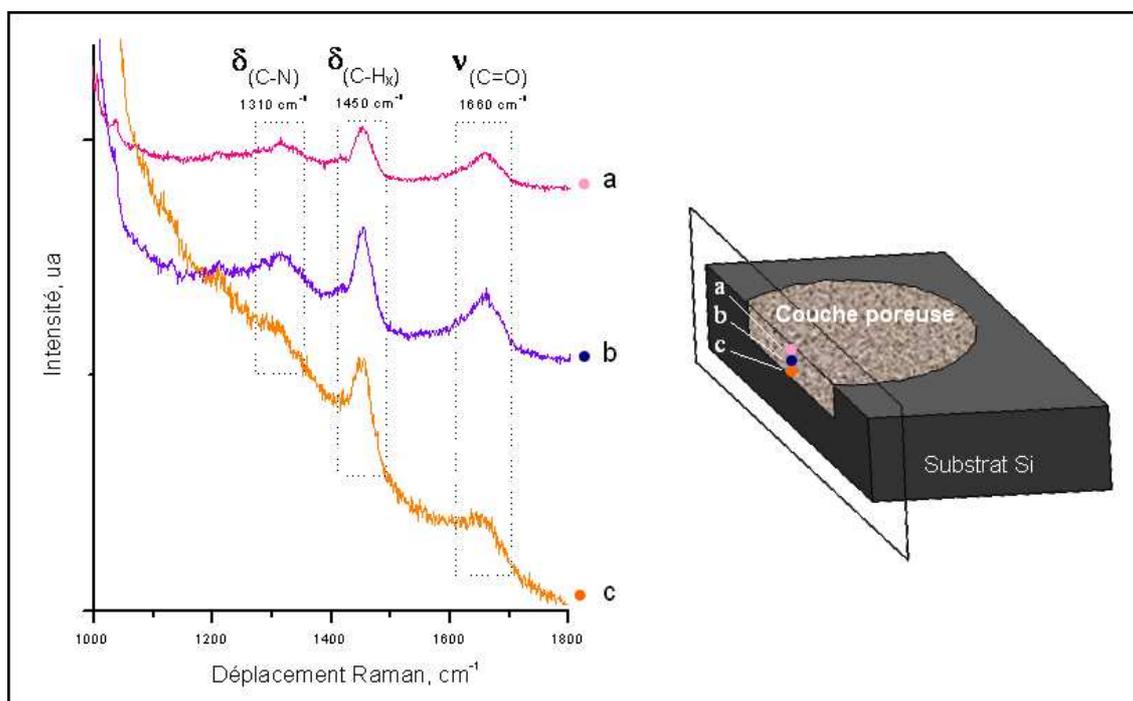


Figure 4.6 – Analyse RAMAN en volume et à différentes régions (a. haut, b. milieu et c. bas) d’une couche de silicium poreux biofonctionnalisé avec de l’albumine.

après chaque étape de traitement chimique de la monocouche de silicium poreux (figure 4.5) et à différentes distances de la surface de l’échantillon (figure 4.6) sont en faveur d’une fonctionnalisation efficace dans tout le volume poreux du matériau. Notre protocole de fonctionnalisation comportant une oxydation thermique du silicium poreux à 300°C pendant une heure suivie par les trois étapes de fonctionnalisation par imprégnation est alors validé. Il sera maintenant appliqué afin d’immobiliser les biorécepteurs immunologiques que nous avons choisi pour notre application de biodétection. Afin de déterminer le taux de recouvrement de la surface poreuse par les anticorps anti-glucagon, nous avons analysé la réponse spectrale en réflectance d’une monocouche poreuse à chaque étape de sa fonctionnalisation.

### 4.2.3 Résultats par réflectométrie

Après avoir exploité les propriétés de réflectivité optique d’une monocouche poreuse dans l’évaluation de l’aptitude des protocoles de silanisation par immersion et par imprégnation à recouvrir sa surface interne par une couche de silane homogène et organisée, nous allons maintenant par la même méthode contrôler le déroulement des deux dernières étapes de la fonctionnalisation qui sont le couplage glutaraldéhyde et le greffage des anticorps anti-glucagon.

Pour la fonctionnalisation complète du matériau, nous avons préparé une monocouche de silicium poreux avec les mêmes conditions d'anodisation électrochimique et de gravure RIE que celles utilisées pour préparer l'échantillon silanisé par imprégnation (section 4.2.3). Après traitement thermique à 300°C pendant une heure, les réactions de silanisation, de couplage aldéhyde et de fixation d'immunoglobulines ont été successivement réalisées suivant la méthode décrite précédemment. L'analyse spectroscopique par réflectométrie de l'échantillon à chaque étape de sa préparation nous a permis de suivre l'évolution physico-chimique de la couche poreuse. Les spectres expérimentaux ainsi obtenus sont présentés en même temps que les spectres théoriques correspondants dans la figure 4.7. En raison de l'importance des fluctuations parasites observées sur les spectres expérimentaux, le déplacement de la frange d'interférence d'ordre "m" égale à 6 a été mesuré à partir des spectres théoriques.

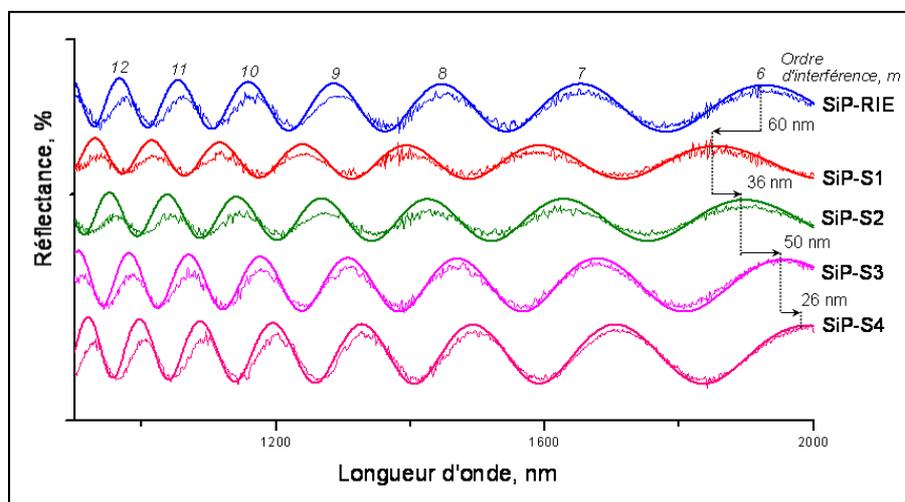


Figure 4.7 – Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux à différentes étapes de sa biofonctionnalisation.

Les indices de réfraction ( $n$ ) de la couche poreuse associés aux fractions volumiques totales ( $C_{orga.} = C_{mol_1} + C_{mol_2} + C_{mol_3}$ ) des substances organiques incorporés dans le matériau après les différentes étapes de fonctionnalisation sont présentés dans la figure 4.8 et le tableau 4.3.

	SiP-RIE	SiP-S1	SiP-S2	SiP-S3	SiP-S4
$n$	1,133	1,091	1,116	1,150	1,169
$C_{orga.}$	0%		6 %	15 %	19 %

Tableau 4.3 – Evolution de l'indice de réfraction et de la fraction volumique en matière organique d'une couche poreuse (élaborée sur un substrat de silicium de type P<sup>+</sup> et avec une densité de courant et une concentration de HF respectivement égales à 50 mA.cm<sup>-2</sup> et 10 %) aux différentes étapes de sa fonctionnalisation.

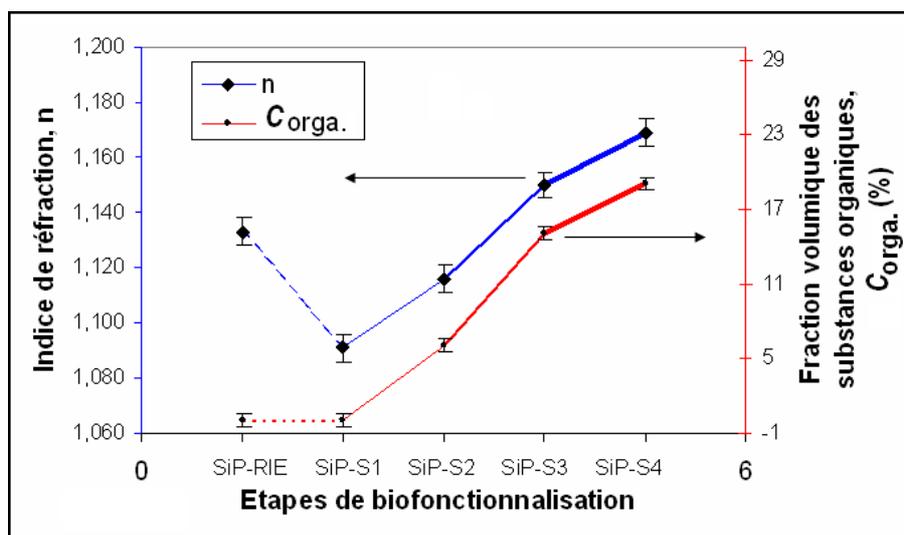


Figure 4.8 – Evolution de l'indice de réfraction (courbe en bleu) de la couche poreuse associée aux fractions volumiques des substances organiques (courbe en rouge) incorporés dans le matériau après chaque étape de fonctionnalisation.

Ainsi, nous constatons que la diminution de l'indice de réfraction de la couche poreuse après oxydation thermique de l'ordre de  $4.10^{-2}$  a entraîné un déplacement du spectre de réflectance de 60 nm vers les plus basses longueurs d'onde. Ce déplacement spectral correspond à un taux d'oxydation simulé égal à 100 %. Après oxydation, nous retrouvons le même effet de la silanisation que nous avons observé précédemment, soit un déplacement du spectre de réflectance d'environ +36 nm. A ce déplacement spectral, une augmentation de l'indice de réfraction de la couche poreuse de l'ordre de  $2,5.10^{-2}$  a été calculée. La fraction volumique de silane correspondant à cette étape de fonctionnalisation a été ajustée à 6 %. Le taux de recouvrement de silanes a été alors estimé égal à 7,2 molécules par  $\text{nm}^2$ . Comparés aux valeurs obtenues après la silanisation par imprégnation de la couche poreuse précédente, ces résultats confirment la reproductibilité du procédé de fonctionnalisation. Après silanisation, l'étape de fixation du glutaraldéhyde, que nous avons aussi réalisée par imprégnation, a entraîné un deuxième déplacement spectral de signe positif. Mesuré à partir des spectres ajustés aux spectres expérimentaux, ce déplacement égal à  $\simeq +50$  nm a été associé à une augmentation de l'indice de réfraction de la couche poreuse d'environ  $3,4.10^{-2}$  et une fraction volumique de l'agent de couplage de l'ordre de 8 %. Ceci correspond à un taux de recouvrement de 7,0 molécules par  $\text{nm}^2$  calculé par application de la relation 4.6 à une couche moléculaire de glutaraldéhyde greffée ( $d_{R-COH} = 0,7$  g/ml et  $M_{R-COH} = 84$  g/mol) selon la réaction [SiP-S2  $\rightarrow$  SiP-S3] de la figure 4.9.

La similitude entre ce taux et celui obtenu pour les fragments de silanes (7,2 Si-R par  $\text{nm}^2$ ) est en faveur d'une réaction "mole à mole" entre les groupements fonctionnels  $\text{NH}_2$  de la surface silanisée et les molécules de glutaraldéhyde qui ont infiltré les pores. De cette manière, les extrémités -COH secondaires de l'agent de couplage bifonctionnel étaient présentées à la surface poreuse dans

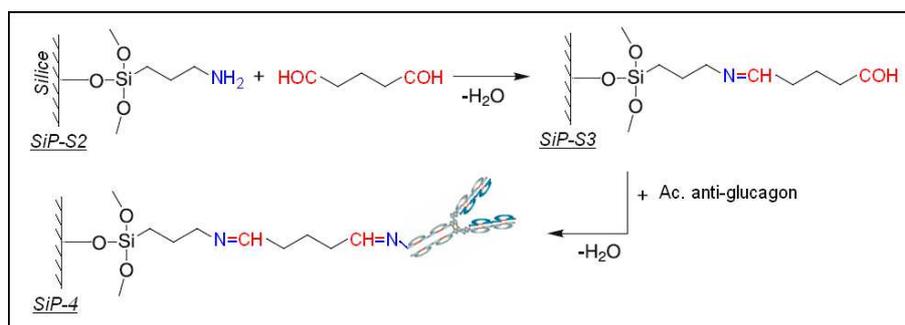


Figure 4.9 – Réaction de fixation de l'agent de couplage glutaraldéhyde suivie par le greffage biomoléculaire des anticorps anti-glucagon.

la configuration adéquate (non liées aux silanes) pour le greffage covalent des anticorps anti-glucagon par leurs résidus aminés lors de la dernière étape de biofonctionnalisation. Ceci a été confirmé par les résultats obtenus à la fin de cette étape, à savoir un déplacement spectral de +26 nm relié à une augmentation de l'indice de réfraction de la couche poreuse de  $\simeq 2.10^{-2}$  et une fraction volumique d'immunoglobulines estimée égale à 4 %. Le calcul de la masse protéique immobilisée à la surface des pores en appliquant la relation 4.5 aux anticorps anti-glucagon ( $\rho_{Ac.} = 1,41 \text{ g/ml}$ ) nous a permis d'estimer une quantité immobilisée de ces biorécepteurs égale à  $28,7 \mu\text{g}$ . Le taux de recouvrement relatif à cette quantité de matière organique introduite dans la couche poreuse est égal à  $0,4 \cdot 10^{12} \text{ IgG}$  par  $\text{cm}^2$ . Ce taux est compris entre la valeur expérimentale déterminé par A. W. Flounders [173] après greffage des IgG anti-thiabendazole ( $0,2 \cdot 10^{12}$  molécules par  $\text{cm}^2$ ) sur une surface plane de silicium oxydé et la valeur théorique simulée par P. Esser [176] pour une adsorption maximale en monocouche d'anticorps à une surface en polystyrène (entre 1 et  $2 \cdot 10^{12}$  molécules par  $\text{cm}^2$ ). La masse des éléments immunologiques que nous avons alors greffés sur les parois des pores est égale à  $28,7 \mu\text{g}$ . Correspondant à environ la moitié de la quantité d'anticorps contenue dans la solution active que nous avons mise en réaction lors de cette étape de fonctionnalisation ( $53 \mu\text{g}$ ), le taux de recouvrement peu élevé de  $0,4 \cdot 10^{12} \text{ IgG}$  par  $\text{cm}^2$  peut être associé à une infiltration incomplète du volume poreux par ces biomolécules (une molécule sur 2). Ayant estimé le pourcentage de pores de diamètre favorable à l'introduction des immunoglobulines égal à 56 % (figure 2.7, chapitre 2), nous pouvons supposer que les pores de diamètre inférieur à 50 nm (44 % des pores) n'ont pas accueilli d'anticorps anti-glucagon. De cette manière, le taux de recouvrement dans ces pores serait égal à zéro. Le taux de recouvrement  $R_{IgG}$  des parois des pores de diamètre supérieur à 50 nm serait ainsi supérieur à  $0,4 \cdot 10^{12}$  molécules par  $\text{cm}^2$ . Considéré dans les biocapteurs comme un facteur limitant l'efficacité de la détection, cette hétérogénéité dans la distribution des éléments de reconnaissance moléculaire doit être réduite. Etant impossible d'augmenter davantage la taille des pores obtenus par anodisation électrochimique des substrats de type  $\text{P}^+$  (électropolissage, figure 2.8), nous avons décidé d'étudier le silicium de type  $\text{N}^+$ . Des substrats de silicium dopé avec des atomes d'antimoine (Sb) et de résistivité comprise entre 8 et  $12.10^{-3} \Omega.\text{cm}$  ont été alors utilisés dans l'objectif d'élaborer une couche poreuse avec des pores

de taille favorisant l'introduction des immunoglobulines et leur fixation d'une façon plus homogène sur la surface totale du matériau. Les résultats de cette étude sont présentés dans la section suivante.

#### 4.2.4 Etude de la biofonctionnalisation d'une monocouche poreuse élaborée avec du Si de type N<sup>+</sup> dopé Sb ( $\rho = 10^{-2} \Omega.cm$ )

Dans l'objectif d'améliorer le taux de recouvrement du silicium poreux par les anticorps anti-glucagon à la fin de la biofonctionnalisation, nous avons étudié un deuxième type de substrat : le silicium de type N<sup>+</sup>. Ce type de silicium avec des résistivités comprises entre  $10^{-2}$  et  $10^{-3} \Omega.cm$  permet selon H. Ouyang [109, 150] d'obtenir par anodisation électrochimique des pores de diamètre variant de 60 jusqu'à 120 nm. Etant plus larges que les pores que nous avons obtenus avec le silicium de type P<sup>+</sup> (56 nm), ces interstices doivent incorporer plus facilement les molécules biologiques de grandes tailles comme les immunoglobulines. Une étude structurale et un suivi de la fonctionnalisation d'une couche poreuse élaborée avec un substrat de type N<sup>+</sup> dopé avec des atomes d'antimoine (Sb) et de résistivité moyenne égale à  $10^{-2} \Omega.cm$  ont été réalisés et présentés dans cette partie du manuscrit.

##### a. Etude structurale

Cette étude a été réalisée dans le but de déterminer les conditions expérimentales d'anodisation électrochimiques d'une monocouche de silicium poreux élaborée sur le silicium de type N<sup>+</sup> et contenant des pores plus ouverts que la couche poreuse obtenue avec le substrat de type P<sup>+</sup> ( $D > 56$  nm) utilisé précédemment pour l'étude de la fonctionnalisation. Au cours de cette étude nous avons déterminé l'évolution de la taille des pores en fonction de la densité de courant pour un électrolyte hydro-alcoolique contenant de l'acide fluorhydrique à 5,6 %. Comme pour les couches poreuses élaborées sur le substrat de type P<sup>+</sup>, nous avons constaté avec ce type de substrat N<sup>+</sup> la présence d'une couche de surface nécessitant une étape de gravure RIE afin d'ouvrir les pores à la surface de l'échantillon. L'analyse microscopique en surface des échantillons élaborés avec des densités de courant variant de 20 à 40 mA.cm<sup>-2</sup> nous a permis de déterminer pour chaque couche poreuse le diamètre moyen et le pourcentage de pores de taille supérieure à 50 nm (tableau 4.4).

Densité de courant (mA.cm <sup>-2</sup> )	20	25	30	40
Diamètre moyen (nm)	54	63	79	88
% Diamètre > 50 nm	66	74	83	86

Tableau 4.4 – Diamètre moyen et pourcentage de pores de taille supérieure à 50 nm pour des monocouches de silicium poreux élaborées à des densités de courant différentes.

L'application d'une densité de courant de 40 mA.cm<sup>-2</sup> a permis d'obtenir une couche poreuse

contenant des pores de diamètre moyen estimé égale à 88 nm. 86 % des pores constituant cet échantillon ont un diamètre supérieur à 50 nm (figure 4.10).

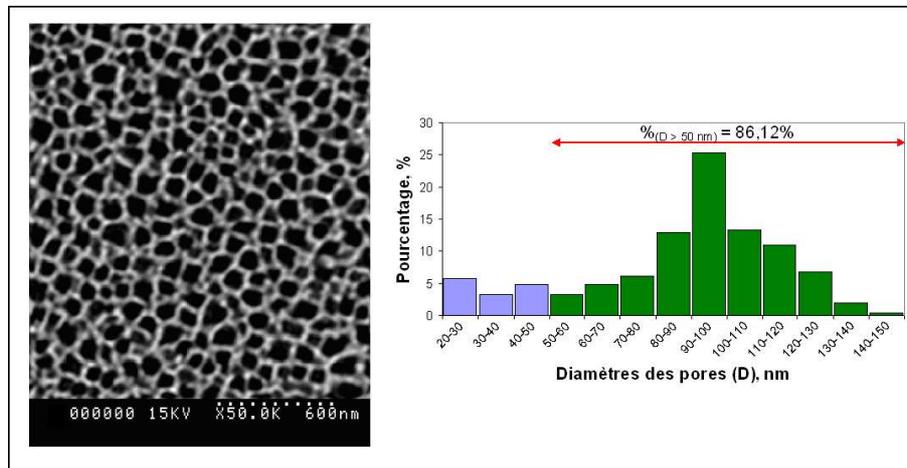


Figure 4.10 – Micrographie MEB d’une surface d’un échantillon de silicium poreux après gravure RIE et histogramme représentant la distribution de la taille des pores à cette surface. Conditions d’anodisation : Substrat Si de type  $N^+(Sb)$ ,  $\rho \approx 10^{-2} \Omega.cm$ ,  $J = 40 \text{ mA.cm}^{-2}$ ,  $t = 180 \text{ s}$ ,  $[HF] = 5,6 \%$ . Conditions de gravure : gaz  $SF_6$ , débit 5 sccm, Puissance 50 W, Pression 10 mTorr et durée 30 s.

Comparés aux pores obtenus avec le substrat de type  $P^+$ , ces interstices semblent être plus favorables à l’introduction de biomolécules de grandes tailles comme les immunoglobulines IgG. D’autant plus que la forme continue et sans ramifications des pores observés au MEB sur la coupe transversale de la couche poreuse élaborée dans ces conditions (figure 4.11) serait à priori adaptée à un écoulement favorable des solutions utilisées lors de la biofonctionnalisation dans tout le volume poreux. Ainsi, nous avons choisi d’étudier la biofonctionnalisation de cette couche poreuse et d’entamer la caractérisation structurale. Mesurée par MEB et après gravure RIE, l’épaisseur est égale à  $5300 \pm 100 \text{ nm}$  pour une durée d’anodisation égale à 180 s. La porosité a été estimée à environ 64 % par réflectométrie en ajustant le spectre de réflectance théorique au spectre expérimental obtenu après gravure RIE (figure 4.11). En supposant que la gravure RIE soit sans effet sur la porosité de la couche poreuse, l’épaisseur avant gravure ajustée par réflectométrie est égale à  $\simeq 5450 \text{ nm}$ . Contenant des pores de diamètre moyen estimé à 88 nm environ, cet échantillon de silicium poreux développe une surface spécifique de l’ordre de  $29 \text{ m}^2.cm^{-3}$ . Cette surface est encore plus faible que celle de la monocouche de silicium poreux élaborée avec le substrat de type  $P^+$  et sous une densité de courant de  $50 \text{ mA.cm}^{-2}$  ( $S_s \simeq 65 \text{ m}^2.cm^{-3}$ ).

Cette couche poreuse a ensuite été fonctionnalisée en utilisant le procédé par imprégnation que nous avons utilisé pour immobiliser les anticorps anti-glucagon à la surface des pores de l’échantillon poreux élaboré sur le substrat de type  $P^+$  (section 4.2.4.c). Afin de vérifier l’efficacité du procédé,

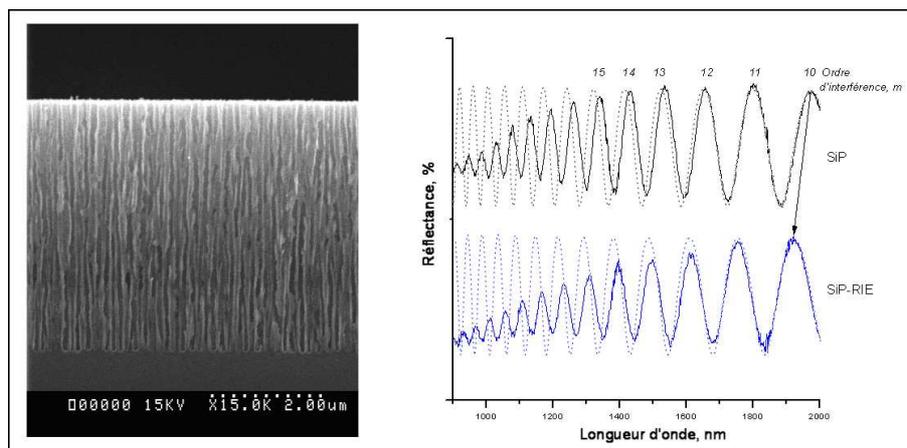


Figure 4.11 – a. Micrographie MEB d'une coupe transversale d'un échantillon de silicium poreux après gravure RIE. b. Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux avant (SiP) et après gravure RIE (SiP-RIE). Conditions d'anodisation : Substrat Si de type  $N^+(Sb)$ ,  $\rho \approx 10^{-2} \Omega.cm$ ,  $J = 40 \text{ mA.cm}^{-2}$ ,  $t = 180 \text{ s}$ ,  $[HF] = 5,6 \%$ . Conditions de gravure : gaz  $SF_6$ , débit 5 sccm, Puissance 50 W, Pression 10 mTorr et durée 30 s.

nous avons commencé à l'appliquer pour le greffage de l'albumine. Le suivi physico-chimique de la biofonctionnalisation a été effectué essentiellement par réflectométrie. Au cours de cette étude, nous avons utilisé des techniques d'analyse élémentaire telles que la spectrométrie à dispersion d'énergie (EDX) et la spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS : X-Ray Photoelectron Spectroscopy).

### b. Suivi de la fonctionnalisation par réflectométrie

- Après oxydation thermique :

Le traitement thermique pendant une heure à  $300^\circ\text{C}$  de la couche poreuse a entraîné le déplacement négatif (vers les plus basses longueurs d'onde) de son spectre de réflectance d'environ 220 nm (figure 4.12). L'ajustement du spectre théorique au spectre expérimental associe ce déplacement spectral à un taux d'oxydation égal à 26 %. La nouvelle porosité de l'échantillon est alors égale à  $\approx 52 \%$ . Le diamètre moyen des pores après cette étape d'oxydation est de l'ordre de 75 nm.

- Après réactions chimiques :

La mesure de la réflectance de la couche poreuse après les étapes de silanisation, couplage aldéhyde et fixation de l'albumine nous a permis d'obtenir respectivement les spectres SiP-S2, SiP-S3 et SiP-S4 présentés sur la figure 4.12. D'après ces spectres, la position de la frange d'interférence d'ordre "m" égal à 10 n'a subi aucun déplacement. En effet la longueur d'onde  $\lambda_p^{10}$  du maximum de cette frange est restée égale à  $1692 \pm 1 \text{ nm}$  pour tous les spectres enregistrés

après oxydation thermique de l'échantillon. Ce résultat, révèle l'absence de substances organiques dans la couche poreuse et donc un déroulement inapproprié de la biofonctionnalisation.

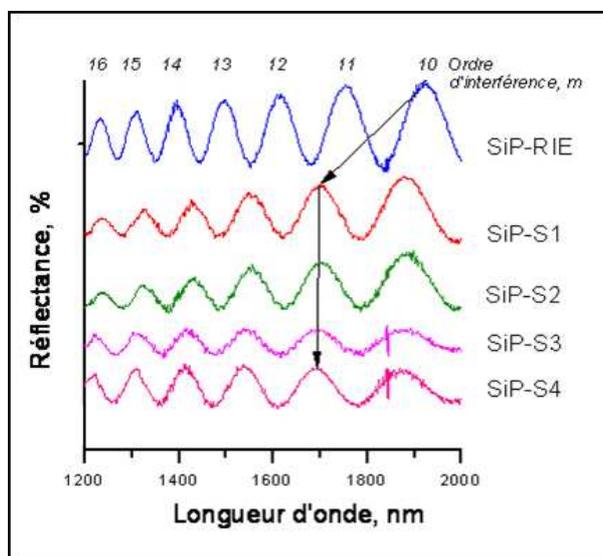


Figure 4.12 – Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux aux différentes étapes de sa biofonctionnalisation.

### c. Analyse par EDX et XPS

Afin d'étudier par EDX l'évolution chimique du volume du silicium poreux élaboré avec du silicium de type  $N^+$  et de résistivité moyenne égale à  $10^{-2} \Omega.cm$  aux différentes étapes de sa préparation, nous avons préparé cinq échantillons de silicium poreux dans les mêmes conditions d'anodisation électrochimique et de gravure RIE que la couche poreuse précédente. La préparation de ces échantillons a été arrêtée à des étapes différentes afin d'obtenir cinq couches poreuses correspondant aux stades SiP-RIE (couche gravée), SiP-S1 (oxydée), SiP-S2 (silanisée), SiP-S3 (fixant des aldéhydes) et SiP-S4 (fixant l'albumine).

Pour accéder à la surface interne de la couche poreuse, chaque échantillon a été clivé. L'analyse EDX des coupes transversales des couches poreuses observées au MEB nous a permis d'estimer la composition chimique en carbone, oxygène et silicium aux différentes étapes de préparation (tableau 4.5).

D'après ces résultats, seule l'étape de l'oxydation thermique a entraîné la modification de la composition atomique de la couche poreuse en oxygène et en silicium. Etant très peu variable d'un échantillon à l'autre, le taux de carbone mesuré (compris entre 6 et 9 %) est très probablement relié à une contamination au niveau de la chambre d'analyse. Avec l'absence d'atomes d'azote dans toutes les couches poreuses analysées, nous pouvons déduire qu'aucune matière organique reliée à la biofonctionnalisation n'a été détectée.

	SiP-RIE	SiP-S1	SiP-S2	SiP-S3	SiP-S4
% C	9	7	6	8	9
% O	5	29	23	32	28
% Si	86	64	71	60	64

Tableau 4.5 – Composition élémentaire déterminée par EDX de la couche poreuse en carbone, oxygène, et silicium après les différentes étapes de fonctionnalisation.

Ainsi, nous pensons qu'aucune substance chimique (APTES, glutaraldéhyde et albumine) n'aurait pu réagir à l'intérieur de la couche poreuse et que les solutions actives de fonctionnalisation n'aurait pas pu imprégner les pores après leur dépôt à la surface de l'échantillon. Dans ce cas, seule la surface externe de l'échantillon aurait été fonctionnalisée. Ceci a été vérifié par analyse XPS de cette surface aux stades SiP-S1 (près oxydation thermique), SiP-S2 (après silanisation) et SiP-S4 (après couplage aldéhyde et fixation protéique) de la fonctionnalisation. Sur la Figure 4.13 sont présentés les spectres issus de cette analyse.

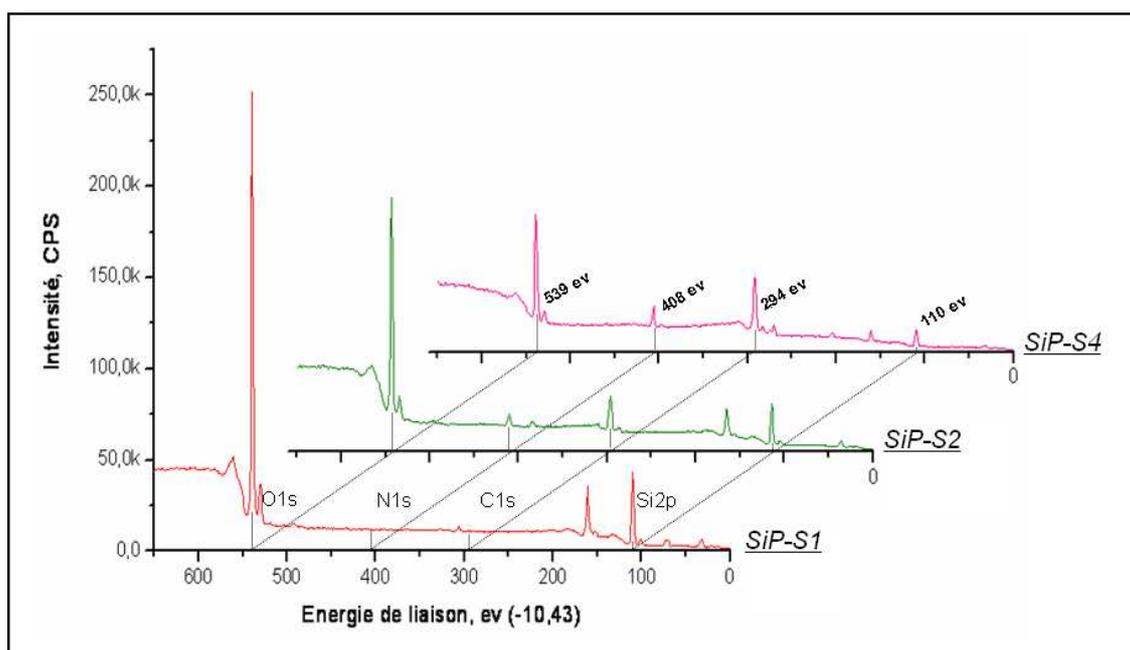


Figure 4.13 – Spectres XPS enregistrés sur la surface d'une couche poreuse à différentes étapes de la biofonctionnalisation.

La position et l'intensité relative des pics d'oxygène O1s, de l'azote N1s, du carbone C1s et du silicium Si2P nous ont permis de suivre l'évolution de la composition chimique de la surface externe du silicium poreux en fonction des étapes de fonctionnalisation SiP-S1, SiP-S2 et SiP-S4 (tableau 4.6). Les résultats obtenus révèlent une fonctionnalisation efficace en surface de l'échantillon. En effet, avant silanisation, on constate que la surface externe de la couche poreuse est composée uniquement

d'oxygène et de silicium. Après silanisation, nous observons l'apparition de l'azote (avec un pourcentage atomique estimé à 4,5 %) et du carbone (avec un pourcentage atomique estimé à 23 %), éléments contenus dans les fragments de silanes gréffés. Après couplage aldéhyde (étape SiP-3 non analysé) et réaction de l'albumine (SiP-S4), on note une augmentation supplémentaire de l'intensité des pics relatifs aux éléments organiques associés à une présence plus abondante des atomes d'azote (9 %) et de carbone (49 %).

	% O1S	% N1S	% C1S	% Si2P
<b>SiP-S1</b>	62	0	0	38
<b>SiP-S2</b>	44,5	4,5	23	28
<b>SiP-S4</b>	28	9	49	14

Tableau 4.6 – Composition élémentaire déterminée par XPS de la surface externe de la couche poreuse en oxygène (O1S), azote (N1S), carbone (C1S) et silicium (Si2p) après les étapes de fonctionnalisation SiP-S1 (après oxydation), SiP-S2 (après silanisation) et SiP-S4 (après greffage de l'albumine).

L'ensemble des résultats obtenus par réflectométrie, EDX et XPS nous permet de penser que les solutions actives que nous avons utilisées lors de la fonctionnalisation (50  $\mu$ l par solution) n'ont pas pu imprégner le volume de la couche poreuse ( $\approx$  270 nl) élaborée avec du silicium de type  $N^+$  ( $P_{ox} \simeq$  52 %). N'ayant pas rencontré cette difficulté avec la couche poreuse élaborée avec le silicium de type  $P^+$  ( $P_{ox} \simeq$  80 %), nous relierons ce comportement fluide avec la porosité de l'échantillon et nous proposons la figure 4.14 pour donner une explication possible.

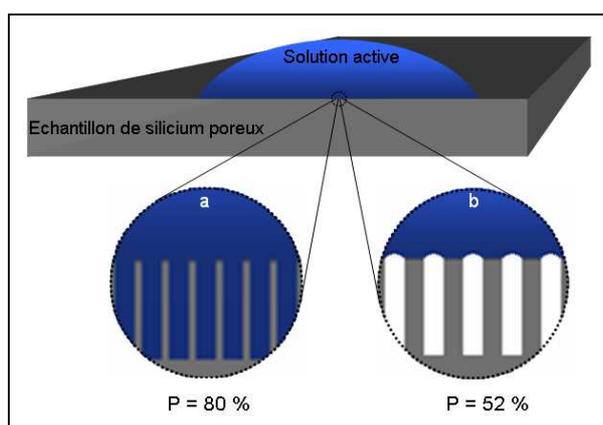


Figure 4.14 – Schéma illustrant le comportement fluide d'une goutte de liquide déposée à la surface de deux échantillons de silicium poreux de porosités différentes.

Ainsi, pour un échantillon de forte porosité (figure 4.14.a) les cristallites séparant les pores sont très fines et la tension superficielle à l'interface solution-couche poreuse est assez faible favorisant l'infiltration des pores par le liquide. Lorsque la porosité de l'échantillon est peu élevée (figure 4.14.b),

la largeur des cristallites est assez importante. La tension superficielle, dans cette situation, peut être suffisamment élevée pour empêcher l'imprégnation des pores par les solutions actives déposées à la surface de l'échantillon lors de la fonctionnalisation. Dans ce cas les substances organiques mises en réaction (APTES, glutaraldéhyde et anticorps anti-glucagon) ne réagissent qu'avec la surface externe des cristallites. Ce cas de figure correspondrait aux résultats de fonctionnalisation que nous avons obtenus avec le substrat de type N<sup>+</sup>.

Nous rappelons que l'objectif pour lequel nous avons exploité le silicium de type N<sup>+</sup> dopé avec des atomes d'antimoine (Sb) et de résistivité comprise entre 8 et  $12 \cdot 10^{-3} \Omega \cdot \text{cm}$  était d'obtenir des pores plus ouverts que ceux contenus dans la couche poreuse élaborée avec du silicium de type P<sup>+</sup> afin d'augmenter le taux de recouvrement de la surface interne du matériau par les anticorps anti-glucagon. A la fin de cette étude, nous avons déduit que cet objectif ne pourrait être atteint avec des porosités peu élevées. Pour cela nous avons décidé d'expérimenter un deuxième dopage de silicium de type N<sup>+</sup>. Avec une résistivité moyenne égale à  $6 \cdot 10^{-3} \Omega \cdot \text{cm}$ , ce type de substrat nous a permis d'obtenir des monocouches poreuses contenant des pores avec un diamètre moyen supérieur à 56 nm et de porosité élevée (supérieure à 80 %) favorable à l'infiltration du volume interne du matériau par les solutions actives de fonctionnalisation. Cependant, de rugosité trop élevée, ces monocouches poreuses présentent l'inconvénient de donner des spectres de réflectances avec des fluctuations parasites de grande visibilité entravant leur exploitation dans le suivi de la fonctionnalisation. Nous avons alors décidé d'étudier ce type de silicium dans l'élaboration d'une structure multicouche à réponse optique plus régulière qui est la microcavité.

Ainsi, et après avoir vérifié l'efficacité du procédé de greffage des anticorps anti-glucagon ( $0,4 \cdot 10^{12}$  molécules par  $\text{cm}^2$ ) dans une couche poreuse élaborée avec du silicium de type P<sup>+</sup> (diamètre moyen des pores 56 nm), nous avons appliqué le même protocole de biofonctionnalisation sur des microcavités en silicium poreux. Cette structure photonique multicouche que nous avons décrite dans les chapitres 1 (sections 1.3.2.e et 1.5.2.b) et 3 (section 3.3.3) a suscité ces dernières années beaucoup d'intérêt dans la conception des biocapteurs à base de silicium poreux. En effet cette structure permet par le déplacement du pic de Fabry Péro de son spectre de réflectance de détecter la présence en volume du matériau poreux de substances organiques. Dans la section suivante nous présentons les résultats de biofonctionnalisation de cette structure.

### **4.3 Biofonctionnalisation du silicium poreux multicouche structuré en microcavité**

L'étude théorique que nous avons présentée dans le chapitre 3 de ce manuscrit (section 3.6.2) démontre bien l'avantage du silicium poreux structuré en microcavité dans la détection optique des substances organiques. Les résultats de cette étude accordent aussi une grande importance à la porosité du matériau. En effet, nous avons constaté que la sensibilité élevée de cette structure multicouche est

essentiellement lié à l'utilisation de fortes porosités. Une limite de détection très faible ( $\simeq 12$  ng/nm) a d'ailleurs été estimée pour un système de biodétection intégrant une microcavité alternant des couches de porosités élevées (respectivement égales à 95 % et 80 %). Ainsi, dans une perspective d'exploiter ce type de structure multicouche dans la biodétection du glucagon, nous avons commencé par élaborer des microcavités en silicium poreux que nous avons par la suite fonctionnalisé selon le même procédé par imprégnation que nous avons contrôlé précédemment sur les monocouches. Les deux types de silicium monocristallin ( $P^+/4.10^{-3} \Omega.cm$  et  $N^+ 6.10^{-3} \Omega.cm$ ) qui nous ont permis d'obtenir du silicium poreux de porosité élevée ont été exploités.

### 4.3.1 Microcavité sur silicium de type $P^+$

Nécessitant l'alternance de deux couches poreuses d'indices différents et donc de porosités différentes, la réalisation d'une microcavité à base de silicium poreux élaboré avec du Si de type  $P^+$  nous a mené à effectuer une étude préalable de fonctionnalisation d'une monocouche de silicium poreux élaborée à une densité de courant inférieure à  $50 \text{ mA.cm}^{-2}$ . En effet, limité par le phénomène d'électropolissage (figure 2.8, section 2.2.2) l'obtention de silicium poreux sur ce type de substrat de Si ne peut être assurée à des densités de courant supérieures à  $50 \text{ mA.cm}^{-2}$ . Comme nous l'avons démontré au dans le chapitre 2, la diminution de la densité de courant d'anodisation entraîne la formation de pores de plus faible diamètre. Ainsi, l'application d'une densité de courant égale à  $30 \text{ mA.cm}^{-2}$  pendant 470 s et l'utilisation d'un électrolyte avec une concentration d'acide fluorhydrique égale à 10 % nous ont permis d'obtenir des pores de diamètre moyen égal à environ 30 nm et d'une épaisseur égale à  $7,3 \mu\text{m}$ . Sur cette monocouche nous avons suivi la biofonctionnalisation par réflectométrie. Les résultats exprimant l'évolution de l'indice de réfraction et celle de la fraction volumique en matière organique de la monocouche poreuse aux différentes étapes de la biofonctionnalisation sont présentés dans le tableau 4.7. Ces résultats vérifient que même dans des pores de diamètre inférieur à 50 nm (pourcentage des pores de diamètre supérieur à 50 nm égal à 1,5 %) les anticorps anti-glucagon pouvaient infiltrer la couche poreuse. Le taux de recouvrement de la surface poreuse en immunoglobulines esr estimé pour cet échantillon de  $0,2.10^{12}$  molécules par  $\text{cm}^2$ .

	<b>SiP-RIE</b>	<b>SiP-S1</b>	<b>SiP-S2</b>	<b>SiP-S3</b>	<b>SiP-S4</b>
<b>n</b>	1,284	1,237	1,268	1,303	1,327
<b><i>C<sub>orga.</sub></i></b>	0 %		6,4 %	13,3 %	16,3 %

Tableau 4.7 – Evolution de l'indice de réfraction et de la fraction volumique en matière organique d'une monocouche poreuse (élaborée sur un substrat de silicium de type  $P^+$  et avec une densité de courant et une concentration de HF respectivement égales à  $30 \text{ mA.cm}^{-2}$  et 10 %) aux différentes étapes de sa fonctionnalisation.

Ayant vérifié la possibilité d'introduire les anticorps anti-glucagon dans la couche poreuse élaborée

rée sous une densité de courant égale à  $30 \text{ mA.cm}^{-2}$ , nous avons élaboré une microcavité en silicium poreux centrée à  $793 \text{ nm}$  ( $\lambda_0$ ). Les densités de courant utilisées pour la réalisation de cette microcavité étaient alors de  $50$  ( $J_1$ ) et de  $30 \text{ mA.cm}^{-2}$  ( $J_2$ ). Les porosités respectives obtenues avec ces deux densités de courant sont  $91$  et  $82 \%$ . Les durées d'anodisation  $t_1$  et  $t_2$  ont été calculées à partir des vitesses d'anodisation correspondantes à chaque densité de courant ( $26,5 \text{ nm.s}^{-1}$  pour  $J_1$  et  $15,8 \text{ nm.s}^{-1}$  pour  $J_2$ ) en vérifiant la condition de Bragg ( $n_1e_1 = n_2e_2 = \lambda_0/4$ ). La couche active séparant les deux miroirs composant la microcavité, a été anodisée sous la densité de courant  $J_1$  et pendant une durée égale à  $2t_1$ . Le nombre d'alternances des bicouches dans les deux miroirs est équivalent ( $N_A = N_B$ ) et égal à  $12$ . L'épaisseur totale de la microcavité est alors égale à  $8,3 \mu\text{m}$ . Nous présentons dans la figure 4.15 l'image obtenue par MEB de cette structure ainsi que sa réponse optique théorique et expérimentale. La superposition des deux spectres théorique et expérimental témoigne de l'efficacité du programme de simulation ainsi que du choix des conditions expérimentales pour la réalisation de cette structure multicouche.

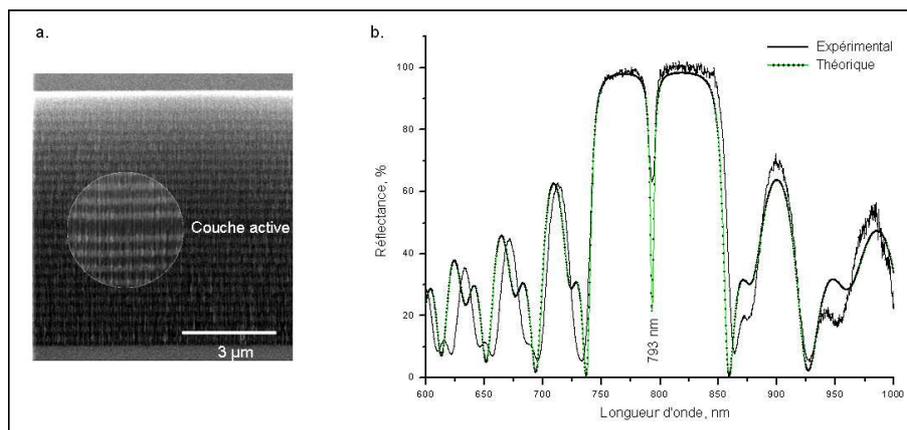


Figure 4.15 – a. Micrographie MEB d'une coupe transversale d'un échantillon de silicium poreux structuré en une microcavité d'épaisseur totale égale à  $8,3 \mu\text{m}$ . b. Spectres de réflectance théorique et expérimental de la microcavité centrée à  $793 \text{ nm}$  élaboré par la superposition de deux miroirs de Bragg constitués chacun de  $12$  bicouches alternant les couches de porosités égales à  $91 \%$  et  $82 \%$ .

Comme pour les monocouches, l'ouverture des pores à la surface de l'échantillon nécessite une étape de gravure RIE. Afin de réduire au maximum l'effet de cette gravure sur la réflectance de la structure poreuse, nous avons diminué la durée de ce traitement de  $30 \text{ s}$  à  $15 \text{ s}$ . Ainsi le déplacement spectral entraîné par cette étape de préparation est égal à  $-1 \text{ nm}$ . Ce déplacement est mesuré par rapport à la position du pic de Fabry pérot. La faible amplitude de ce déplacement est en faveur d'une élimination localisée réduite à la couche de surface. Quand à son signe négatif, il est lié à la diminution de l'épaisseur de la structure. Après traitement thermique, ce pic se situe à une longueur d'onde égale à  $771 \text{ nm}$  indiquant un déplacement du spectre vers les plus basses longueurs d'ondes de valeur égale à  $21 \text{ nm}$  et relatif à une oxydation assez importante de la structure poreuse. Les

trois étapes de biofonctionnalisation qui sont la silanisation, le couplage aldéhyde et le greffage des anticorps anti-glucagon ont entraîné des déplacements positifs respectivement égaux à +16, +22 et +17 nm (figure 4.16). Cette évolution traduit l'introduction après chacune de ces étapes de substances organiques d'indice de réfraction supérieur à celui de l'air ( $n = 1$ ), éléments remplissant les pores avant fonctionnalisation. Ainsi, nous confirmons l'efficacité de la biofonctionnalisation en volume du silicium poreux avec une structure microcavité. Grâce à sa réponse spectrale très peu bruitée au niveau du mode de Fabry-Pérot, cette structure présentant l'avantage de permettre un suivi direct et de bonne résolution (de l'ordre du nanomètre) de l'évolution physico-chimique du matériau.

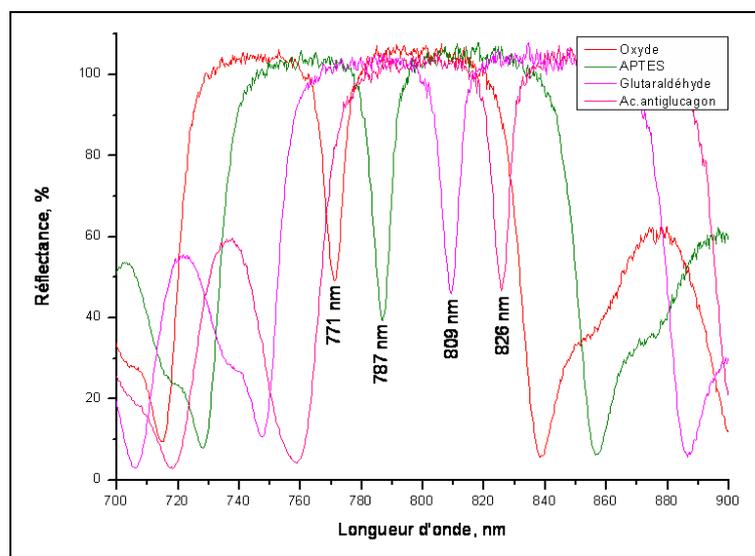


Figure 4.16 – Déplacement du pic de Fabry Pérot de la microcavité 1 (substrat de type  $P^+$ ) en fonction de la fonctionnalisation.

### 4.3.2 Microcavité sur silicium de type $N^+$

Avec du silicium de type  $N^+$  dopé avec des atomes de phosphore et de résistivité comprise entre 5 et  $7 \cdot 10^{-3} \Omega \cdot \text{cm}$  nous avons élaboré une deuxième microcavité (microcavité N). L'électrolyte d'anodisation que nous avons utilisé pour l'anodisation électrochimique de ce type de substrat contient de l'acide fluorhydrique avec une concentration égale à 5,6 %. Les densités de courant choisies pour l'élaboration de cette microcavité sont  $50 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  ( $J_1$ ) et  $41 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  ( $J_2$ ). Les porosités respectives obtenues avec ces deux densités de courant sont 96 et 85 %. Les vitesses d'anodisation qui ont permis le calcul des durées d'anodisation  $t_1$  et  $t_2$  permettant d'obtenir une microcavité centrée à une longueur d'onde  $\lambda_0$  proche de celle de la première cavité (799 nm) sont égales à  $21,7 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$  pour  $J_1$  et  $18,7 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$  pour  $J_2$ . La couche active séparant les deux miroirs composant la microcavité, a été anodisée sous la densité de courant  $J_1$  pendant une durée égale à  $2t_1$ . Le nombre d'alternances des bicouches dans les deux miroirs est équivalent ( $N_A = N_B$ ) et égal à 9. L'épaisseur totale de la micro-

cavité est alors égale à  $7 \mu\text{m}$ . Nous présentons dans la figure 4.17 l'image obtenue par MEB de cette structure ainsi que sa réponse optique. Comme pour la microcavité élaborée sur le substrat de type  $\text{P}^+$ , la superposition des deux spectres théorique et expérimental reflète l'efficacité du programme de simulation ainsi que du choix des conditions expérimentales pour la réalisation de cette structure multicouche avec le substrat de type  $\text{N}^+$ .

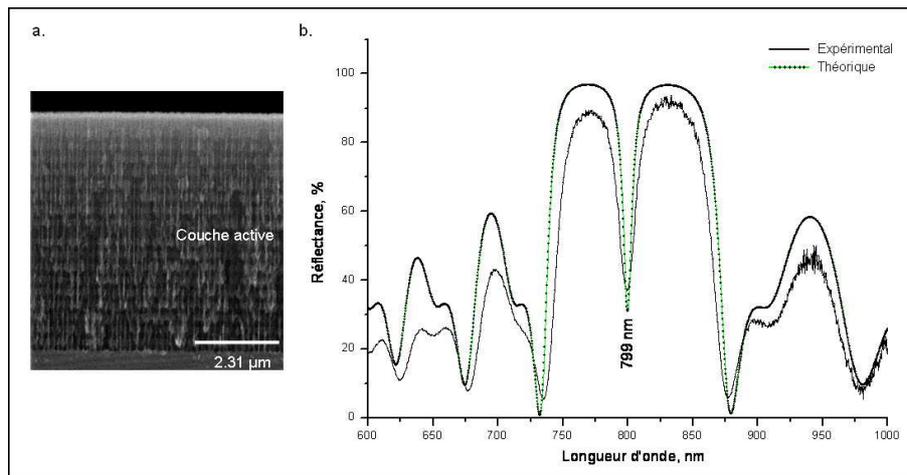


Figure 4.17 – a. Micrographie MEB d'une coupe transversale d'un échantillon de silicium poreux structuré en une microcavité d'épaisseur totale égale à 6800 nm (substrat de type  $\text{N}^+$ ). b. Spectres de réflectance théorique et expérimental de la microcavité centrée à 799 nm élaboré par la superposition de deux miroirs de Bragg constitués chacun de 9 bicouches alternant les couches de porosités égales à 96 % et 85 %.

De porosité plus élevée que la microcavité P, la microcavité N est plus sensible à la gravure RIE. En effet, pour les mêmes conditions de gravure, le déplacement de la microcavité N (-5 nm) est 5 fois plus important que celui de la microcavité P (-1 nm).

Quant à la sensibilité à l'oxydation, nous constatons que le déplacement du pic de Fabry-Pérot est moins important avec la microcavité N (-5 nm par rapport à -21 nm pour la microcavité P). De même pour les trois dernières étapes de fonctionnalisation. Nous avons obtenu pour ces trois étapes un déplacement positif équivalent à 30 nm (figure 4.18). La différence entre les deux déviations  $\Delta\lambda_0(\text{orga.})$  relatives aux deux microcavités est égale à 25 nm.

Dans le tableau 4.8 nous présentons les déplacements spectraux  $\Delta\lambda_0(\text{orga.})$  des deux microcavités entraînés par les étapes de biofonctionnalisation (silanisation, couplage aldéhyde et fixation des anticorps) ainsi que les paramètres structuraux (porosités et diamètres des pores) des couches poreuses constituant ces nanostructures photoniques. Par corrélation avec les résultats simulant l'influence des paramètres structuraux sur la sensibilité de nanostructures photoniques (à base de silicium poreux) à la biofonctionnalisation que nous avons obtenu précédemment (chapitre 3, section 3.6), nous constatons que la microcavité 1 présente l'avantage d'utiliser les diamètres des pores les plus faibles ( $D_1^P$

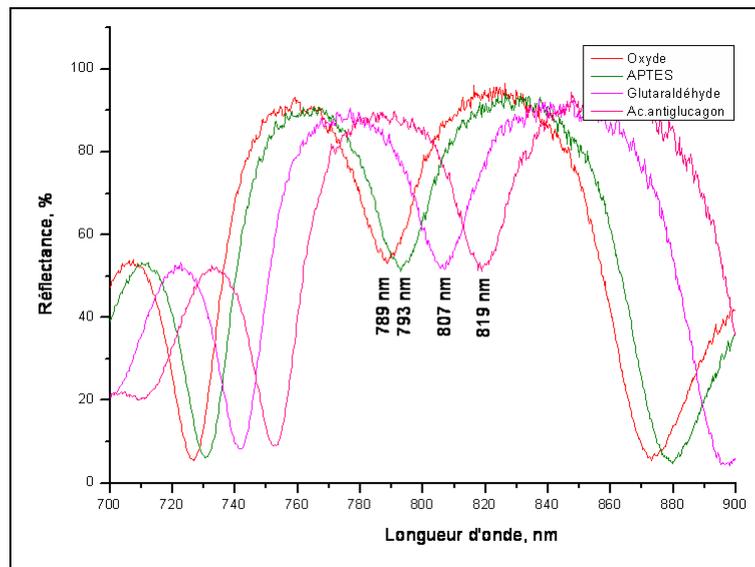


Figure 4.18 – Déplacement du pic de Fabry Pérot de la microcavité N en fonction de la fonctionnalisation.

= 56 nm et  $D_2^P = 30$  nm par rapport à  $D_1^N = 97$  nm et  $D_2^N = 56$  nm) alors que la microcavité N est avantagée par l'emploi de couches les plus poreuses ( $P_1^N = 96$  % et  $P_2^N = 85$  % par rapport à  $P_1^P = 91$  % et  $P_2^P = 82$  %).

	$P_1$ (%)	$D_1$ (nm)	$P_2$ (%)	$D_2$ (nm)	$S_s$ ( $m^2 \cdot cm^{-3}$ )	$\Delta\lambda_0(\text{orga.})$ (nm)
<b>Microcavité P (<math>P^+</math>)</b>	91	56	82	30	94	55
<b>Microcavité N (<math>N^+</math>)</b>	96	97	85	56	50	30

Tableau 4.8 – Tableau récapitulatif des paramètres structuraux (porosités "P", diamètres "D" et surfaces spécifiques " $S_s$ ") des couches poreuses constituant les microcavités 1 et 2 ainsi que les déplacements spectraux de ces structures  $\Delta\lambda_0(\text{orga.})$  entraînés par les étapes de biofonctionnalisation (silanisation, couplage aldéhyde et fixation des anticorps).

Afin de comprendre la contribution des ces deux paramètres structuraux dans la différence entre les réponses optiques des microcavités étudiées, nous faisons intervenir la surface spécifique du silicium poreux. En effet, selon la relation 2.5 (chapitre 2) que nous avons établie pour estimer la surface spécifique du silicium poreux, le calcul de ce paramètre fait intervenir le diamètre des pores et la porosité. L'application de cette relation pour l'estimation de la surface spécifique que développe l'ensemble des couches poreuses constituant chacune des microcavités 1 et 2 nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau 4.8. Nous constatons que la surface spécifique " $S_s$ " la plus élevée ( $94 m^2 \cdot cm^{-3}$ ) correspond au déplacement spectral  $\Delta\lambda_0(\text{orga.})$  le plus important (55 nm). Ainsi nous attribuons l'avantage de sensibilité de la réponse spectrale de la microcavité P par rapport à la microcavité N à la surface spécifique plus importante que développe le silicium poreux composant la

première structure.

A la fin de cette étude sur la biofonctionnalisation de nanostructures photoniques multicouches à base de silicium poreux, nous relevons les points suivants :

- La biofonctionnalisation du silicium poreux selon le procédé chimique que nous avons mis en oeuvre nécessite essentiellement l'utilisation de porosités élevées.
- Il n'est pas obligatoire d'avoir des pores de diamètre beaucoup plus élevé que la taille des anticorps pour incorporer ces substances actives lors de la biofonctionnalisation. D'autant plus que la microcavité P (avec le substrat de type P<sup>+</sup>) avec les diamètres de pores les plus faibles est de meilleure sensibilité que la microcavité N (avec le substrat de type N<sup>+</sup>).
- Exprimé en fonction de la porosité (numérateur) et le diamètre moyen des pores (dénominateur) selon la relation 2.5 ( $S_s = 4000.(p/D)$ ), la surface spécifique est ainsi le paramètre critique influant la sensibilité de ces nanostructures photoniques multicouches (microcavités) à détecter la présence de substances organiques. Cette sensibilité est alors d'autant plus élevée que la surface spécifique est importante.
- Ces résultats sont en adéquation avec ceux que nous avons obtenus lors de l'étude théorique sur les facteurs de mérite présentée à la fin du chapitre 3. Cette étude nous a permis de constater dans un premier temps que la variation de l'indice de réfraction d'une monocouche poreuse suite à l'incorporation de substances organiques dans ses pores est d'autant plus importante que le diamètre de ces interstices est faible. Dans un deuxième temps, nous avons conclu que les multicouches à base de silicium poreux structurées en microcavité peuvent rentrer dans la constitution de biocapteurs de haute sensibilité surtout en utilisant des couches de forte porosité.



# Conclusion et perspectives

Avant d'introduire des perspectives pour les travaux futurs, nous ferons un résumé des principaux points traités et des résultats obtenus pendant cette thèse.

## Conclusion générale

L'exploitation de nanostructures photoniques à base de silicium poreux dans des applications de biodétection nécessite le recouvrement de la surface interne de ces structures par des éléments de reconnaissance moléculaire de nature biologique. Cet assemblage entre un matériau inorganique et des substances biomoléculaires exploite généralement des procédés de fonctionnalisation chimique. Le travail présenté dans ce manuscrit de thèse constitue notre contribution aux recherches sur la conception et l'élaboration de nanostructures photoniques à base de silicium poreux chimiquement fonctionnalisées.

Dans la perspective de développer un biocapteur optique de glucagon à base de nanostructures photoniques en silicium poreux, nous avons au cours de cette thèse mis en place les outils préliminaires à cette application de biodétection. En effet, nous avons tout d'abord développé un programme de simulation de spectres de réflectance de structures optiques à base de silicium poreux. Ce programme calcule la réflectance d'une structure poreuse monocouche ou multicouche en appliquant le formalisme des matrices de transfert et ce à partir des indices de réfraction calculés à partir de la composition des milieux effectifs constitués par le silicium poreux (dont la porosité est modulée) rempli par l'espèce organique étudiée.

Cet outil nous a permis dans un premier temps de prévoir l'influence de certains paramètres, tels que le diamètre moyen des pores, le degré d'oxydation et la porosité, sur la sensibilité de la réponse spectrale de structures monocouches et multicouches (miroir de Bragg et microcavité) dans le suivi de la biofonctionnalisation de ces structures. Nous avons pu déduire que la réponse optique relative à la présence de substances organiques exprimé en  $\Delta n$  (variation d'indice de réfraction) pour les monocouches ou en  $\Delta\lambda_0$  (déplacement spectral) pour les multicouches à base de miroir de Bragg a une amplitude d'autant plus importante que le diamètre des pores et le degré d'oxydation sont réduits. L'intérêt d'utiliser des couches de fortes porosités a été essentiellement démontré avec les microcavités. Composée de couches de porosités  $P_1$  et  $P_2$  respectivement égales à 90 % et 80 %, une micro-

cavité à base de silicium poreux serait capable de détecter une quantité de glucagon formant un film de substance organique d'épaisseur équivalente à  $4 \cdot 10^{-3}$  nm. La limite de détection d'un système de biodétection intégrant cette microcavité serait égal à  $\simeq 12$  ng/nm.

Dans un deuxième temps, nous avons simulé la réflectance des monocouches de silicium poreux afin de déterminer leur composition après élaboration et fonctionnalisation. La caractérisation structurale de ces monocouches a été complétée par des observations au microscope électronique à balayage. La fonctionnalisation de ces couches de silicium poreux selon un procédé chimique comportant une étape de silanisation suivie par une réaction de couplage aldéhyde et le greffage d'éléments immunologiques (anticorps anti-glucagon) a été contrôlée par réflectométrie et spectroscopie Raman. Nous avons ainsi pu d'une part, vérifier la fixation des anticorps anti-glucagon en volume d'une couche de silicium poreux de forte porosité ( $\approx 90$  %) et d'autre part estimer le taux de recouvrement de la surface poreuse par ces biorécepteurs ( $0,4 \cdot 10^{12}$  molécules d'IgG par  $\text{cm}^2$ ). Nous avons par la suite étudié ce procédé de biofonctionnalisation avec des structures multicouches de type microcavités élaborées avec des porosités et des diamètres de pores différents. Ceci nous a permis d'une part de confirmer l'efficacité de notre protocole chimique à recouvrir la surface interne du matériau par les anticorps anti-glucagon et d'autre part de mettre en évidence la relation entre la sensibilité des microcavités à détecter la présence de substances organiques et la surface spécifique de silicium poreux constituant ces structures multicouches.

## Perspectives

A la fin de ces travaux dans le domaine de la biodétection et suite aux conclusions énoncées ci-dessus, nous dégagons les perspectives de recherches suivante :

- Intégrer les structures monocouches et multicouches (microcavités) préparées au cours de cette thèse à un système à flux continu et évaluer l'activité des anticorps immobilisés à l'intérieur de ces structures. En effet les anticorps immobilisés par leurs fonctions  $-\text{NH}_2$  à la surface poreuse sont orientés d'une façon aléatoire [177]. Ainsi, une certaine proportion des sites de fixation de l'antigène (deux par immunoglobuline IgG) doit être bloquée et ne permet pas la détection du glucagon. L'évaluation de l'activité des anticorps anti-glucagon peut être réalisée par un test de saturation de ces biorécepteurs. Le test consiste à quantifier le nombre de moles d'analytes (glucagon) liant des sites antigéniques libres dans la structure poreuse ( $n_{\text{glu}_l}$ ) pour différentes concentrations du glucagon.  $n_{\text{glu}_l}$  se déduit à partir du nombre de moles de glucagon non lié ( $n_{\text{glu}_{nl}}$ ) selon la relation suivante :

$$n.glu_l = n.glu_T - n.glu_{nl} \quad (4.7)$$

Avec  $n.glu_T$  est le nombre de moles de glucagon total correspondant à la concentration  $c$  de l'analyte.

$n.glu_{nl}$  est déterminé par analyse de la solution de glucagon après sa réaction avec la surface poreuse immobilisant les anticorps. Cette analyse peut utiliser la méthode radioimmunologique de quantification du glucagon [148].

La figure 4.19 illustre un exemple de détermination de l'activité  $A$  des anticorps anti-glucagon.

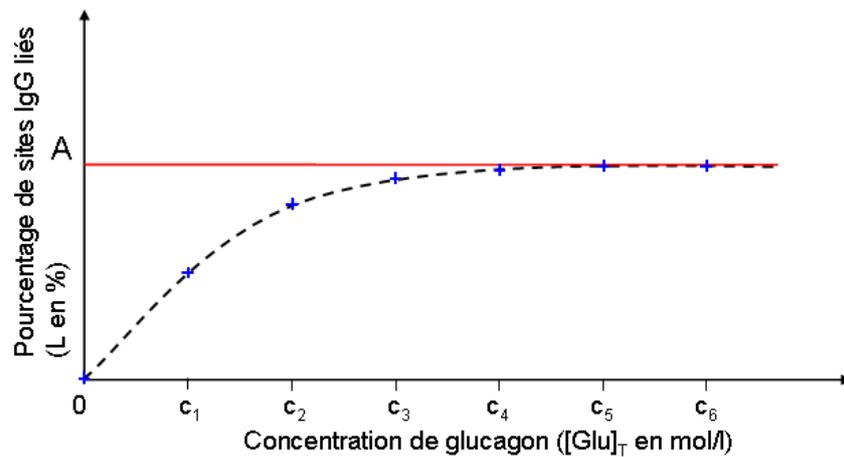


Figure 4.19 – Courbe de saturation des sites antigéniques de l'anticorps anti-glucagon.

Pour chaque concentration utilisée, on détermine un pourcentage de sites IgG liés ( $L$ ) selon la relation suivante :

$$L = 100 \cdot \frac{n.glu_l}{2n.IgG} \quad (4.8)$$

Avec  $n.IgG$  est le nombre de moles d'anticorps anti-glucagon immobilisés dans la structure poreuse. Ce paramètre peut être déduit à partir du taux de recouvrement déjà déterminé.

A partir d'une concentration de saturation des anticorps " $c_5$ ", " $L$ " atteint une valeur maximale qui correspond à l'activité " $A$ " des biorécepteurs immobilisés à la surface des cristallites du silicium poreux. On pourra considérer comme satisfaisante une activité supérieure à 50 %.

- Si l'activité des anticorps greffés est faible ( $A < 50 \%$ ), établir un nouveau protocole de fonctionnalisation permettant une fixation orientée de ces biorécepteurs (par leur chaîne polysaccharidique par exemple) [178] et donc une accessibilité plus importante du glucagon aux sites antigéniques. En effet, une ou plusieurs fonctions aldéhyde peuvent être introduites au niveau du fragment Fc des anticorps par coupure oxydative des diols vicinaux (fonctions -OH attachées à deux atomes de carbone adjacents) des carbohydrates par le periodate de sodium. Les anticorps peuvent alors être greffés sur des supports aminés (présentant des fonctions -NH<sub>2</sub>) par des liaisons covalentes tout en laissant libre la totalité des sites de fixation de l'antigène ( $A = 100 \%$ ) [72].
- Si l'activité des anticorps greffés est élevée ( $A > 50 \%$ ), évaluer la capacité des nanostructures poreuses (monocouches et microcavités biofonctionnalisées) à détecter le glucagon. Dans ce cas, l'amélioration de la qualité de l'analyse dépendra essentiellement du choix des paramètres tels que le diamètre des pores, la porosité et le degré d'oxydation.

- Elaborer et fonctionnaliser des structures optiques innovantes comme les guides d'onde résonant (conventionnel) et anti-résonant (ARROW : AntiResonant Reflecting Optical Waveguide) à base de silicium poreux et les intégrer dans des fonctions interférométriques tels que le Mach-Zehnder.

Dans le cas des guides résonants (Figure 4.20.A) la lumière est confinée dans la couche de guidage (indice de réfraction le plus élevé) par réflexion totale interne aux interfaces avec les couches de confinement (indice le plus faible). Une faible partie de l'intensité de la lumière guidée est couplée dans les couches de confinement par ondes évanescentes. Seul le champ évanescent est affecté par la variation d'indice du milieu contenant l'espèce moléculaire à détecter. Dans cette configuration, seule une faible partie de la couche fonctionnalisée va être sensible à la présence des molécules du fait du faible recouvrement entre le champ évanescent et l'ensemble des molécules incorporées.

Dans le cas des guides anti-résonants (Figure 4.20.B), la lumière est confinée dans une couche de guidage ayant un indice plus faible que celui d'une couche de confinement (indice plus élevé). Ce type de confinement est provoqué par réflexion anti-résonnante à l'interface. Pour que cette réflexion se produise il faut au moins 2 couches de confinement. Les guides de type ARROW présentent l'avantage par rapport aux guides conventionnels d'avoir plus facilement la possibilité d'un guidage monomodal avec une couche de coeur d'épaisseur comparable au diamètre d'une fibre optique et une couche de confinement plus fine. De plus cette structure guidante est fortement sensible à la polarisation.

De très faibles dimensions, ces structures de biodétection optique à base de guides d'onde nécessiteront l'intégration de systèmes microfluidiques utilisant des canaux micrométriques afin

de manipuler de petits volumes de fluides.

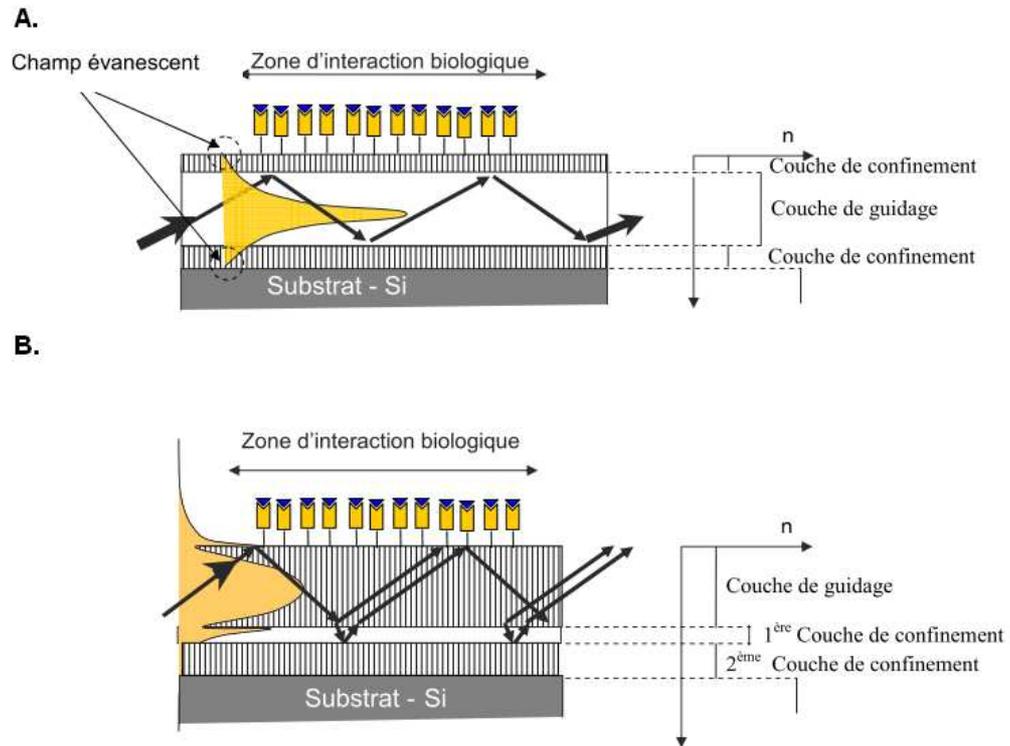


Figure 4.20 – Représentation schématique des guides résonant (A) et anti-résonant (B)



## **Annexe : Publications et posters**

## Theoretical study of the factor of merit of porous silicon based optical biosensors

J. Charrier<sup>1,2,a)</sup> and M. Dribek<sup>2</sup><sup>1</sup>Laboratoire CCLO, UMR-CNRS 6082, ENSSAT, BP 80518, 22305 Lannion Cedex, France<sup>2</sup>Laboratoire FOTON, UMR-CNRS 6082, ENSSAT, BP 80518, 22305 Lannion Cedex, France

(Received 29 July 2009; accepted 22 December 2009; published online 25 February 2010)

Porous silicon is an attractive material for label-free optical biosensors because of its biocompatibility, its large internal surface area, its open pore network, and its widely tunable refractive index. Many structures using this material and exploring reflectometry can be used for biosensing. The sensor performances and sensitivity depends on the parameters of the porous silicon layers and its thermal treatment such as porosity, pore size, oxidation degree, and used wavelength. A theoretical framework to model the reflectance spectra of three optical nanostructures (monolayer, Bragg mirror, and microcavity based on porous silicon layers) before and after the functionalization step is used to study the merit parameters for each device. Based on this theoretical work, optimized conditions to fabricate glucagon biosensors are proposed. A microcavity formed by a period constituted of two porous layers of porosities equal to 95% and 65% with a pore size of 60 and 51 nm, respectively, and with 40% oxidation degree allows a significant redshift to be obtained. The value of minimum detectable coating thickness for a detection system capable of resolving a wavelength shift of 0.1 nm is about  $5 \times 10^{-3}$  nm. © 2010 American Institute of Physics. [doi:10.1063/1.3295906]

### I. INTRODUCTION

During the past decade, sensors based on porous silicon (PSi) nanostructures, having large internal surface areas and widely tunable refractive indices, have been developed. Different types of optical devices have been reported such as single layer interferometers, waveguides, Bragg mirrors, microcavities, rugate filters,<sup>1-7</sup> etc. An inherent feature of PSi material is its open pore network. Normally, this can be used to modify the properties of optical devices *in situ*, by filling the pores with other materials. Moreover, the easy oxidation of the internal surface of PSi allows organic molecules to be covalently attached. Previously cited PSi photonic structures have shown a very good sensitivity in the label-free sensing by the modification of the effective refractive index of a PSi layer.<sup>8-13</sup> In fact, many molecular probes were used for these sensor systems. We can tell proteic probes apart like antibodies,<sup>14</sup> biotin,<sup>15</sup> protein A,<sup>16</sup> KAA peptide<sup>14</sup> and TWTCP,<sup>17</sup> and nucleic probes such as DNA and RNA fragments.<sup>18</sup> For our sensing application, we have chosen monoclonal IgG1 antibody specifically to detect a hyperglycaemic hormone called glucagon. This peptide consists of a single-chain of 29 amino-acid residues. Its blood concentration is about  $10^{-11}M$  and only I<sup>125</sup> radioimmunoassay is used in routine analysis. In spite of its low detection level (13 pg/ml),<sup>19</sup> this technique presents the disadvantage of long incubation time (24 h). We hope to develop to a glucagon sensor with instantaneous analysis using direct optical detection inside silicon porous nanostructure. The design of this biosensor necessitates immobilisation of antibodies on crystallite surfaces which form the porous material. It is essential

to perfect this step called functionalization to provide the best sensitivity for the biosensor.

However, knowing that the functionalization of the porous layers depends on the intrinsic physical properties such as the porosity value, pore size, and the oxidation degree, we will try to theoretically estimate the performances of three types of structures (i) single-layer, (ii) Bragg reflector, and (iii) microcavity.

We will first describe the theoretical framework to model the reflectance spectra of these different optical nanostructures and the refractive index of porous layer. Then, the simulations of reflectance spectra are presented before and after the functionalization step. For each case, the merit parameters are discussed according to porosity, pore size, oxidation degree, and used wavelength values. This theoretical work leads to a set of optimized conditions for the fabrication of glucagon biosensors.

### II. MODELING

The optical response of porous layers and its sensitivity depend strongly on the nanomorphology (pore size and density) and the chosen optical device (single layer, Bragg reflector, and microcavity). One important result is the evolution of near infrared reflectance spectrum of these structures at each step of surface functionalization or biodetection. This spectral evolution results from the modification of the optical path length (OPL) that is the product of the geometric length of the path light  $d$  propagating through the optical structure and the refractive index of the medium  $n$  and is given by the following relationship:

<sup>a)</sup>Electronic mail: joel.charrier@univ-rennes1.fr.

$$\text{OPL} = nd. \quad (1)$$

The optical path difference (OPD) according to the different steps of the functionalization (thermal treatment, grafting of organic molecules APTES, glutaraldehyde and antiglucagon antibody) or the step of analyte detection (glucagon) is generally the result of varying of the refractive index of the medium. The layer thickness  $d$  is often constant except after thermal oxidations when volume expansion of porous layer is observed. To study the optical response as a function of the porous layer physical parameters (porosity, pore size, and thickness) and as a function of the optical structures during the functionalization process, the reflectance spectra have been calculated using a transfer matrix method. The dispersion of the complex refractive index of Si and SiO<sub>2</sub> has been taken into consideration. With this method, the effective dielectric function of a mixture of components has been described by the well-known Bruggeman model.<sup>20</sup> First, it is assumed that the porous layer is oxidized (partially or totally) so the layer consists of three media: silicon, silica, and voids with refractive indices  $n_{\text{Si}}$ ,  $n_{\text{SiO}_2}$ , and  $n_{\text{air}}$ , respectively. In order to take these modifications after oxidation into account, the Bruggeman model can be written in the following form:<sup>21</sup>

$$(1 - p_{\text{in}} - x) \frac{n_{\text{Si}}^2 - n^2}{n_{\text{Si}}^2 - 2n^2} + (p_{\text{in}} - 1.27x) \frac{n_{\text{air}}^2 - n^2}{n_{\text{air}}^2 + 2n^2} + 2.27x \frac{n_{\text{SiO}_2}^2 - n^2}{n_{\text{SiO}_2}^2 + 2n^2} = 0, \quad (2)$$

where  $p_{\text{in}}$  is the initial porosity of the PSi layer,  $x$  the volume fraction of the silicon transformed into SiO<sub>2</sub> ( $0 \leq x \leq 1 - p_{\text{in}}$ ), and  $n$  the refractive index of the oxidized PSi layer.

However, the transformation of the silicon crystallites into silica is accompanied by a volume expansion. This expansion is assumed to be isotropic through the volume and is described by a factor of 2.27.<sup>22</sup> However the pores do not collapse because of the initial porosity ( $p_{\text{in}}$  must be superior to 0.56) which is more important than volume expansion. The structure is always opened on the surface for the functionalization step. The pore density is nearly the same before and after oxidation (partial or total oxidation). So, the pore size decreases and the porosity after oxidation of course is lower than the porosity before oxidation.

Furthermore, volume expansion due to oxidation is taken to be isotropic and one could observe an increase in the thickness of the layer.<sup>22</sup> The thickness of the PSi layer increases due to the thermal oxidation and is as a function of the volume fraction of silicon transformed into SiO<sub>2</sub>,  $x$ , and the volume of voids  $p_{\text{in}}$ . The volume occupied by the silicon is equal to  $(1 - p_{\text{in}})V_{\text{in}}$  where  $V_{\text{in}}$  is the total volume of the unoxidized PSi layer. After oxidation, the new volume  $V_{\text{ox}}$  that consists of Si and SiO<sub>2</sub> solid phase is determined by  $(1 - p_{\text{in}} + 1.27x)V_{\text{in}}$ . The relative volume increase is then

$$V_{\text{ox}}/V_{\text{in}} = (1 - p_{\text{in}} + 1.27x)/(1 - p_{\text{in}}), \quad (3a)$$

and the linear scale is provided by the cubic root of this quantity. Consequently, the thickness  $d_{\text{ox}}$  of the oxidized layer has been estimated by the following relation:<sup>21</sup>

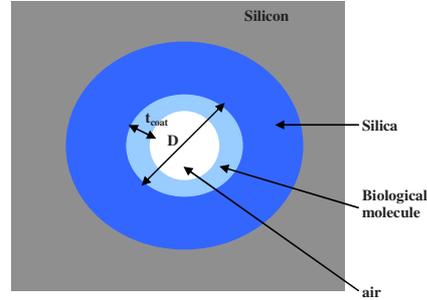


FIG. 1. (Color online) Schematic representation of medium (PSi layer functionalized and oxidized) to calculate the effective refractive index.

$$d_{\text{ox}} = d_{\text{in}} \sqrt[3]{1 + 1.27 \frac{x}{1 - p_{\text{in}}}}, \quad (3b)$$

where  $d_{\text{in}}$  is the initial PSi layer thickness before thermal oxidation.

However, this formula overestimates the evolution of the thickness after oxidation (for example, with this formula, the spectral response of the Bragg mirror or microcavity redshifts whereas the experimental spectrum blueshifts). This is why the thickness  $d_{\text{ox}}$  of the oxidized layer is replaced by the following formula for high porosity values by taking into account the Ref. 23:

$$d_{\text{ox}} = d_{\text{in}} \left( 1 + 0.05 \frac{x}{1 - p_{\text{in}}} \right). \quad (3c)$$

Lastly, functionalization reagents are immobilized on the internal surface of the porous layers (Fig. 1). The presence of the organic molecules modifies the effective refractive index given by the Bruggeman model by including a new medium. Applying the Bruggeman model to this new medium, the parameters must be introduced such as the pore diameter  $D$  and the thickness of the coating layer on the internal surface  $t_{\text{coat}}$ .<sup>24</sup> By assuming that the porous layer is similar to the columnar structure, the volume  $V_{\text{coat}}$  of the coating layer is described by

$$V_{\text{coat}} = \left[ \pi \left( \frac{D}{2} \right)^2 - \pi \left( \frac{D}{2} - t_{\text{coat}} \right)^2 \right] \times d \times N, \quad (4)$$

where  $d$  is the thickness of the porous layer,  $N$  is the density of pores, and the volume  $V_{\text{pore}}$  of the void is given by

$$V_{\text{pore}} = \pi \left( \frac{D}{2} \right)^2 \times d \times N. \quad (5)$$

So, knowing that the initial volume fraction of air is given previously by  $(p_{\text{in}} - 1.27x)$ , the volume fraction  $f_{\text{coat}}$  of the coating layer and the residual volume fraction  $f_{\text{air}}$  of voids are

$$f_{\text{coat}} = \frac{\pi \left( \frac{D}{2} \right)^2 - \pi \left( \frac{D}{2} - t_{\text{coat}} \right)^2}{\pi \left( \frac{D}{2} \right)^2} \times (p_{\text{in}} - 1.27x) \quad (6a)$$

and

$$f_{\text{air}} = \left( 1 - \frac{\pi \left( \frac{D}{2} \right)^2 - \pi \left( \frac{D}{2} - t_{\text{coat}} \right)^2}{\pi \left( \frac{D}{2} \right)^2} \right) \times (p_{\text{in}} - 1.27x). \quad (6b)$$

Respectively. Finally, after functionalization, the effective refractive index is given by

$$\begin{aligned} & \left( 1 - p_{\text{in}} - x \right) \frac{n_{\text{Si}}^2 - n^2}{n_{\text{Si}}^2 + 2n^2} + (p_{\text{in}} - 1.27x) \left[ 1 - \frac{\pi \left( \frac{D}{2} \right)^2 - \pi \left( \frac{D}{2} - t_{\text{coat}} \right)^2}{\pi \left( \frac{D}{2} \right)^2} \right] \frac{n_{\text{air}}^2 - n^2}{n_{\text{air}}^2 + 2n^2} \\ & + 2.27x \frac{n_{\text{SiO}_2}^2 - n^2}{n_{\text{SiO}_2}^2 + 2n^2} + \frac{\pi \left( \frac{D}{2} \right)^2 - \pi \left( \frac{D}{2} - t_{\text{coat}} \right)^2}{\pi \left( \frac{D}{2} \right)^2} \\ & \times (p_{\text{in}} - 1.27x) \frac{n_{\text{coat}}^2 - n^2}{n_{\text{coat}}^2 + 2n^2} = 0, \quad (7) \end{aligned}$$

where  $n_{\text{coat}}$  is the refractive index of the organic (chemical or biological) coating layer.

In our case, molecules used to functionalize the internal surface of pores are successively APTES, glutaraldehyde, and antiglucagon antibody. We assume that these molecules uniformly cover the internal surface. Their refractive indices are, respectively, 1.42, 1.43, and 1.60. For the simulations and results below, we have regrouped together the three steps of functionalization. The refractive index resulting from the organic coating layer has been attributed the value of 1.60 because the APTES and glutaraldehyde sizes, respectively, 0.7 and 0.8 nm, are lower than that of antiglucagon (17 nm). The value of  $n_{\text{coat}}$  is assumed to be constant whatever the wavelength used. The value of the coating layer thickness  $t_{\text{coat}}$  reflects the quantity of molecules introduced into the pores and reflects the grafting density. According to the last formula, when  $n_{\text{coat}}$  and  $t_{\text{coat}}$  are fixed, the medium effective refractive index depends on the pore diameter  $D$ , the volume fraction  $x$  of the silicon transformed into  $\text{SiO}_2$ , and the initial porosity  $p_{\text{in}}$ .

### III. RESULTS AND DISCUSSION

Both the refractive index of the functionalized porous layer and its theoretical reflectance spectrum are obtained

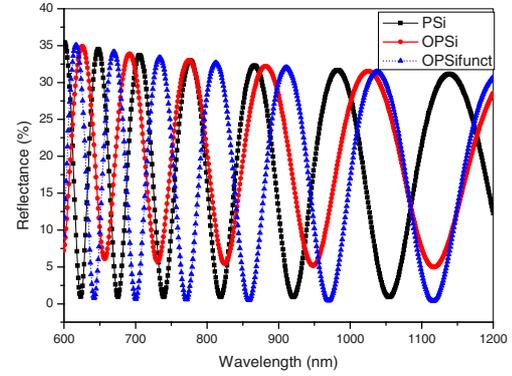


FIG. 2. (Color online) Simulated reflectivity spectra of PSI layer, oxidized PSI layer, and functionalized oxidized PSI layer with  $p=0.65$ ,  $d=2 \mu\text{m}$ ,  $D=51 \text{ nm}$ , and  $x=0.5$ .

from the presented models by varying the pore size  $D$  and the volume fraction  $x$  of the silicon transformed into  $\text{SiO}_2$  for three values of initial porosities (0.65, 0.80, and 0.95) and for three optical structures (single layer, Bragg reflector, and microcavity).

The hypotheses we have used for the modeling are as follows: (i) the microstructure is anisotrope, the pores are perpendicular to the surface of the PSI layer and are considered as being cylindrical and are characterized by a pore mean diameter, (ii) the choice of the porosity is fixed by the correlation between pore size–porosity ( $D$  superior to 40 nm) and the biological molecule size, (iii) the pores must not collapse because of the initial porosity which is more important than volume expansion: in this manner, the structure is always opened on the surface for the functionalization step, and (iv) the functionalization step is carried out in several steps; silanization using the APTES reagent, aldehyde coupling using glutaraldehyde, and antiglucagon grafting.

#### A. Single layer

The PSI layer is first oxidized in order to initialize silanol groups as anchoring sites for APTES. Then the total physical thickness of the (APTES+glutaraldehyde) layer was determined to be  $15+1 \text{ \AA}$  (Ref. 24) and the longest dimension of the antiglucagon is approximately 17 nm. So after functionalization, a total thickness  $t$  of about 18.5 nm is grafted on the silica internal surface. Figure 2 represents the shifts of the reflectance spectrum of the PSI single layer with an initial layer thickness  $d$  equal to  $2 \mu\text{m}$  during the different steps, thermal treatment and functionalization. The oxidation of porous silicon decreases the effective index of the porous layer but increases slightly the thickness. This oxidation step causes a decrease of the number and amplitude of the interference fringes. Then, the binding of biological molecules on the internal surface of the oxidized porous layer strongly increases the effective index and induces a redshift as shown in Fig. 2. In this case, the figure of merit describing the sensitivity of sensor layer is the variation of index  $\Delta n$  before and after the functionalization step. So this variation

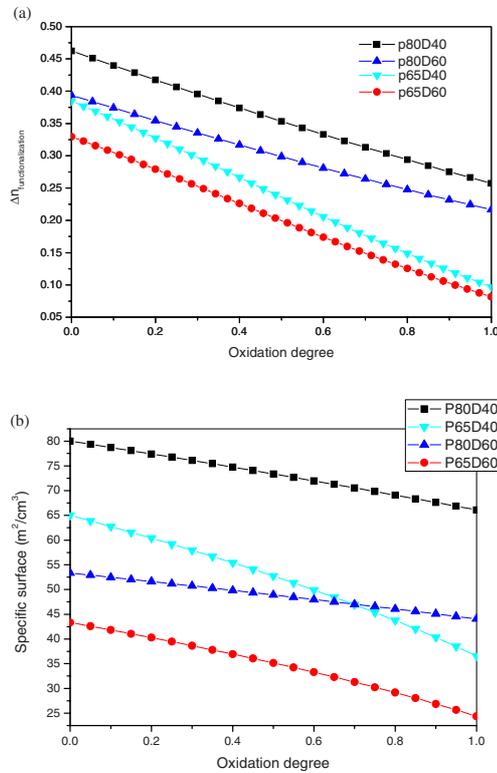


FIG. 3. (Color online) (a) Simulated refractive index difference  $\Delta n$  before and after functionalization as a function of the oxidation degree  $x$  for two porosities ( $p=0.65$  or  $0.80$ ) and for two pore sizes ( $D=40$  or  $60$  nm) at the wavelength equal to  $800$  nm. (b) simulated specific surface area as a function of the oxidation degree  $x$  for two porosities ( $p=0.65$  or  $0.80$ ) and for two pore sizes ( $D=40$  or  $60$  nm).

is studied as a function of the degree of oxidation defined by  $s=x/(1-p_{\text{in}})$  [Fig. 3(a)] and as a function of the pore size  $D$  (Fig. 4) for two porosities and at different wavelengths. In Fig. 3(a), the index variation  $\Delta n$  at  $800$  nm decreases with the increase of the degree of oxidation whatever the porosity value and pore size. On the one hand, for a same oxidation degree, the variation of the effective refractive index is more important when the porosity is higher and the pore size value is lower. On the other hand, whatever the initial porosity,  $\Delta n$  decreases when the oxidation degree rises. However, for a same porosity, this decrease is accentuated when the pore size is low, the slope is less important for the higher pore sizes. In fact, the contribution of organic molecules is more important for the small pore sizes (these molecules of high index replace the void volume fraction of low index in a more significant manner) and for the high porosity values (same observed trends). The sensitivity of the refractive index variation for a single layer can be related to a new parameter which is the specific surface area noted SS.

In fact, the surface of the porous layer  $A_c$  in contact with air is given by

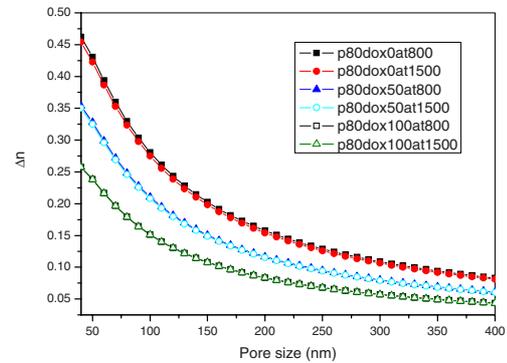


FIG. 4. (Color online) Simulated refractive index difference  $\Delta n$  before and after functionalization as a function of the pore size  $D$  for a porosity equal to  $0.80$  and for three oxidation degrees ( $x=0, 0.5,$  and  $1$ ) at two wavelengths equal to  $800$  and  $1500$  nm.

$$A_c = NA_p + A_s, \quad (8a)$$

where  $A_s$  is the sample surface,  $N$  pore density and  $A_p$  the developed surface by the lateral pore surface. The sample surface  $A_s$  is negligible in relation to the developed surface by the silicon crystallites given by  $NA_p$  with  $N = pA_s / \pi(D/2)^2$  and  $A_p = \pi Dd$ ; where  $p$  is the layer porosity,  $D$  the pore size, and  $d$  the layer thickness.

Consequently, the specific surface is given by

$$SS = \frac{A_c}{V} = \frac{pA_s D d / (D/2)^2}{dA_s}. \quad (8b)$$

By expressing the specific surface as  $\text{m}^2/\text{cm}^3$  and  $D$  as nanometer, the specific surface is given by

$$SS(\text{m}^2/\text{cm}^3) = \frac{4000p}{D}. \quad (8c)$$

After thermal treatment of PSi layer,  $p$  and  $D$  values vary and can be expressed by the following relationships:

$$p_{\text{ox}} = 1 - [(1 - p_{\text{in}})(1 + 1.27s)], \quad (9)$$

$$D_{\text{ox}} = D \left( \frac{p_{\text{ox}}}{p_{\text{in}}} \right)^{0.5}, \quad (10)$$

where  $p_{\text{in}}$  is the initial porosity,  $p_{\text{ox}}$  is the porosity after oxidation and  $D_{\text{ox}}$  is the pore size after oxidation. Hence, the specific surface area after oxidation  $SS_{\text{ox}}$  can be estimated for different  $p_{\text{in}}$  and  $D_{\text{in}}$  values and be evaluated as a function of the oxidation degree [Fig. 3(b)]. We can observe that the change in the refractive index after chemical functionalization is nearly similar to the change in the specific surface of the porous layer as a function of the different oxidation degree.

Figure 4 shows the evolution of the chemical functionalization effect on the effective refractive index of a PSi layer according to pore size variation at different wavelengths ( $800$  and  $1500$  nm) and for different oxidation degrees ( $0\%$ ,  $50\%$ , and  $100\%$ ). We can observe that with our hypothesis, the wavelength has not a primordial impact on

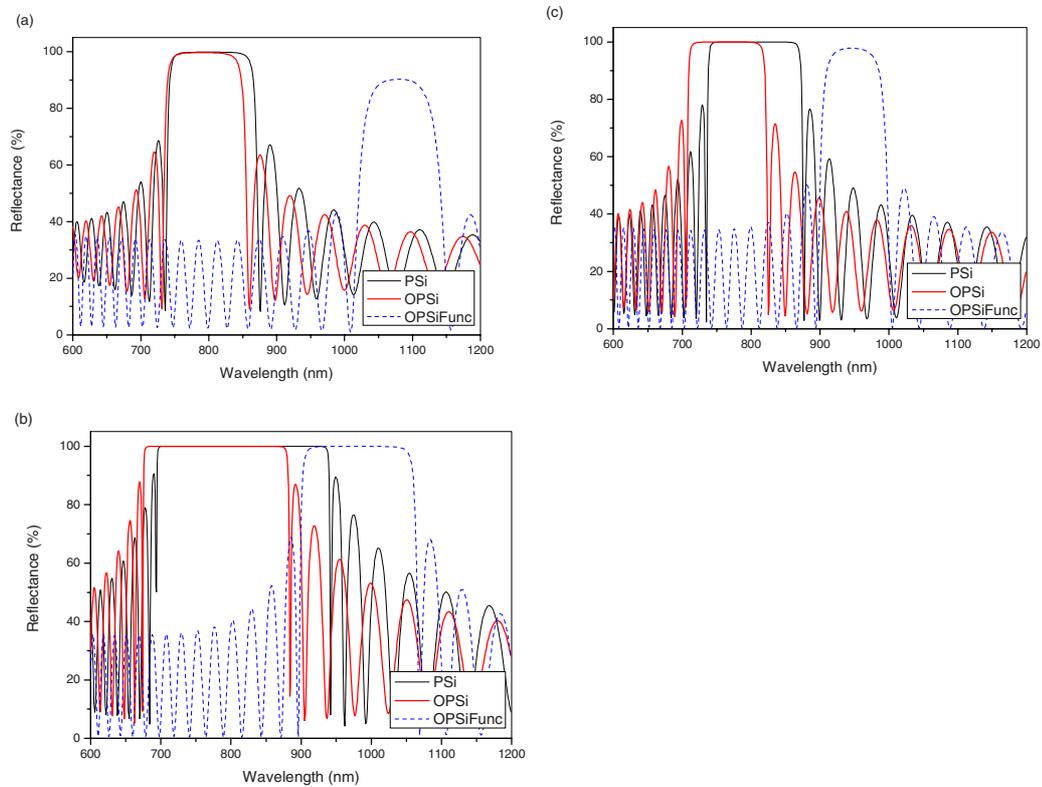


FIG. 5. (Color online) Simulated reflectivity spectra of Bragg mirrors [(a) Bragg 1, (b) Bragg 2, and (c) Bragg 3] based on PSi layers, oxidized PSi layers, and functionalized oxidized PSi layers for an oxidation degree  $x=0.25$ .

the evolution of the refractive index (we have not considered the dispersion of the biomolecule refractive index). However, variations in the refractive index are less important when the oxidation degree is higher or when the pore diameter is more significant.

Thus, to optimize the sensitivity in order to detect the variation in the refractive index (before and after functionalization) such as the characterization of PSi resonant mirror, m-lines techniques, etc., the pore size should be as small as possible while still allowing easy infiltration of biological molecules. Furthermore, the oxidation degree should be low but it should still allow easy binding.

### B. Bragg reflector

The reflectance spectra for three Bragg mirrors are illustrated in Fig. 5. The characteristics of Bragg reflector fabrication formed by a period repeated  $N$  times are shown in Table I. The period is formed by two layers of high and low porosities (HP and LP, respectively). Each layer is characterized by its porosity  $p$ , its refractive index  $n$ , its thickness  $d$ , and its pore size  $\phi$ . The difference between the structures is the porosity values which forms the Bragg reflectors and which are described by the following porosity values: (a)  $p_{HP}=0.80$  associated with a pore size equal to 57 nm,  $p_{LP}=0.65$  associated with a pore size equal to 51 and  $N=14$ , (b)

TABLE I. Characteristics of Bragg reflector fabrication formed by a period repeated  $N$  times. The period is formed by two layers of HP and LP. Each layer is characterized by its porosity  $p$ , its refractive index  $n$ , its thickness  $d$ , and its pore size  $\phi$ .

Name	$p_{HP}$ (%)	$n_{HP}$	$d_{HP}$ (nm)	$\phi_{HP}$ (nm)	$p_{LP}$ (%)	$n_{LP}$	$d_{LP}$ (nm)	$\phi_{LP}$ (nm)	$N$
Bragg 1	95	1.065	187.7	60	80	1.336	149.7	57	21
Bragg 2	95	1.065	187.7	60	65	1.743	114.7	51	23
Bragg 3	80	1.336	149.7	57	65	1.743	114.7	51	26

$p_{HP}=0.95$  associated with a pore size equal to 60 nm,  $p_{LP}=0.65$  associated with a pore size equal to 51 and  $N=23$  and (c) with  $p_{HP}=0.95$ ,  $p_{LP}=0.80$  and  $N=21$  (Table I). The upper layer of the period is the one which has the higher porosity. The thicknesses and the refractive indices have been chosen to have a central wavelength at 800 nm and the number of periods has been chosen in order to keep the total thickness of the Bragg structures constant at 5  $\mu\text{m}$ .

In Fig. 5 general trends are evidenced, the spectrum blueshift of the oxidized Bragg mirror due to the decrease of the oxidized layers refractive indices whose spectral contribution is more important than the one due to the increase of the thickness of the oxidized layers. After functionalization, the refractive indices increases and causes the reflectance spectrum redshift.

The Bragg reflector is characterized by its central wavelength  $\lambda_0$  (at normal incidence) and by the reflection bandwidth  $\Delta\lambda$  which is determined mainly by the index contrast. These two parameters are defined, respectively, by Eqs. (11) and (12).

$$\lambda_0 = 2(n_{LP}d_{LP} + n_{HP}d_{HP}), \quad (11)$$

$$\Delta\lambda = \frac{2\lambda_0\Delta n}{\pi n},$$

$$\Delta n = n_{LP} - n_{HP}, \quad (12)$$

with

$$n = \frac{n_{LP} + n_{HP}}{2},$$

where  $n_{HP}$  and  $d_{HP}$  are, respectively, the refractive index and the thickness for the HP and  $n_{LP}$  and  $d_{LP}$  for LP layers.

The maximum reflectance of Bragg mirror is given by

$$R = \frac{\left[ \left( \frac{n_{HP}}{n_{LP}} \right)^{2N} - 1 \right]^2}{\left[ \left( \frac{n_{HP}}{n_{LP}} \right)^{2N} + 1 \right]^2}, \quad (13)$$

where  $N$  is the number of periods.

Figure 5 shows an example of the simulated reflectance spectra of the three Bragg reflectors, before thermal treatment, after oxidation and after functionalization. These figures reveal the same trends as those obtained for PSI single layers. The oxidation induces a blueshift of spectral response due to the decrease of the refractive index. After functionalization, the refractive index increases so inducing redshift spectrum. The spectral behavior is different for these three structures in terms of central wavelength shift values, changes in reflection bandwidth and changes in maximum reflectance before and after oxidation and after functionalization. That is why we have studied the changes in  $\lambda_0$  noted  $\Delta\lambda_0$ , in  $R$  noted  $\Delta R$  and in  $\Delta\lambda$  noted  $\Delta(\Delta\lambda)$  before and after the functionalization step as a function of the oxidation degree for the three Bragg mirrors.

In Fig. 6, the blueshift (due to oxidation) and the redshift of the central wavelength noted  $\Delta\lambda_0$  (before and after the

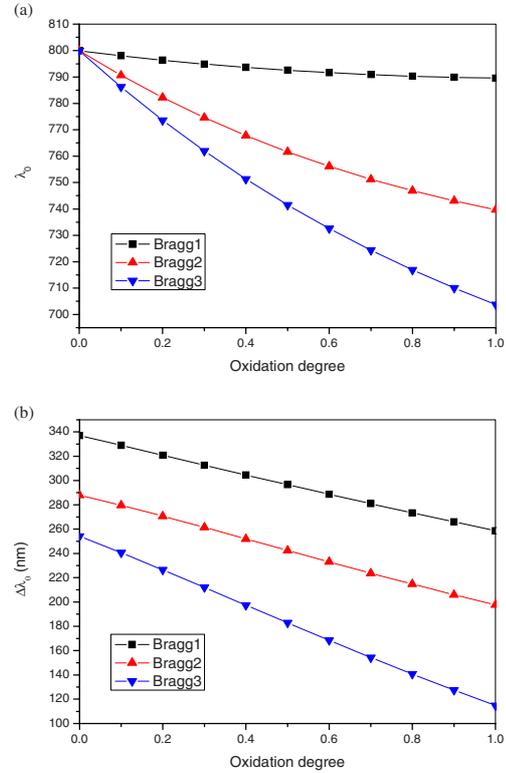


FIG. 6. (Color online) (a) Simulated central wavelength before functionalization as a function of the oxidation degree  $x$  for three different Bragg reflectors (Bragg 1, Bragg 2, and Bragg 3), (b) Simulated difference of central wavelength before and after functionalization as a function of the oxidation degree  $x$  for three different Bragg reflectors (Bragg 1, Bragg 2, and Bragg 3).

functionalization step) are studied as a function of the oxidation degree for the three considered Bragg mirrors. In Fig. 6(a), the most important blueshift is attributed to the Bragg mirror composed of the layers with the lowest porosities noted Bragg 3 and it decreases strongly with the oxidation degree. For the two other Bragg mirrors (Bragg 1 and Bragg 2), the shift of  $\lambda_0$  is less important and decreases slightly with the oxidation degree. After functionalization [Fig. 6(b)], the difference in the central wavelength (redshift) before and after functionalization decreases with the oxidation degree. The redshift is more important for Bragg 1 due to its high porosity values.

Moreover, the curves of the reflection bandwidth ( $\Delta\lambda$ ) (before functionalization) and the difference of the bandwidth [ $\Delta(\Delta\lambda)$ ] before and after functionalization as a function of the oxidation degree are also studied in Fig. 7. The reflection bandwidth [Fig. 7(a)] decreases with the oxidation degree notably due to the decrease of the refractive index during thermal treatment. The reflection bandwidth is lower

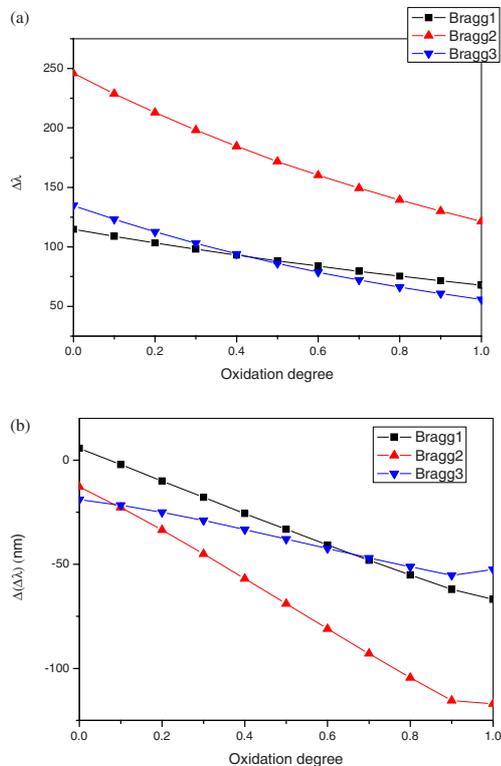


FIG. 7. (Color online) (a) Simulated reflection bandwidth before functionalization as a function of the oxidation degree  $x$  for three different Bragg reflectors (Bragg 1, Bragg 2, and Bragg 3). (b) Simulated difference of reflection bandwidth before and after functionalization as a function of the oxidation degree  $x$  for three different Bragg reflectors (Bragg 1, Bragg 2, and Bragg 3).

for Bragg 1 and Bragg 3 because of low index contrast between the two layers forming the Bragg period, whereas the two layers making up Bragg 2 has a stronger index contrast. The reflection bandwidth difference before and after functionalization also decreases when the oxidation degree increases whatever the Bragg mirror is. This evolution has the same previous trends due to the decrease of the index contrast between the two layers composing the period. This variation is more important for the Bragg 2 due to its initial higher contrast of the refractive indices. However, for the oxidation degree above 0.8 the bandwidth increases but the reflectance spectrum does not correspond to that of the Bragg mirror: interference fringes appear due to the very low index contrast between the two layers. The spectral response of Bragg mirror is replaced by interference fringes for high oxidation degrees.

Lastly, the evolution of maximum reflection is studied in Fig. 8. During the thermal treatment [Fig. 8(a)], this evolution is very small where there is the low oxidation degree. It drops very slightly for oxidation degree inferior to 40% due

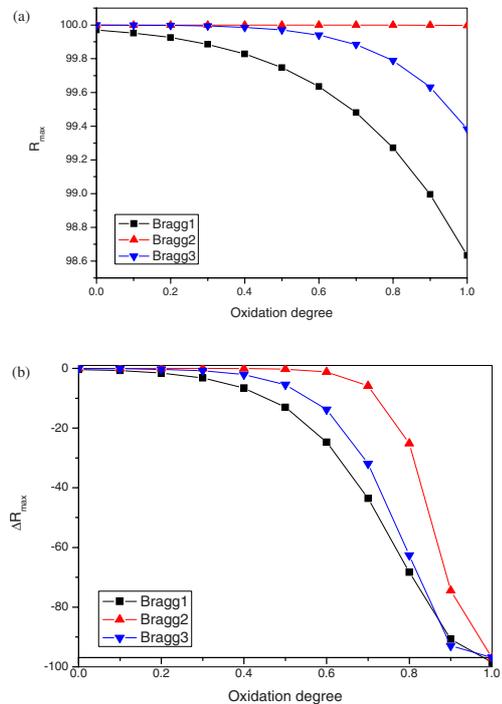


FIG. 8. (Color online) (a) Simulated maximum reflectance before functionalization as a function of the oxidation degree  $x$  for three different Bragg reflectors (Bragg 1, Bragg 2, and Bragg 3). (b) Simulated difference of maximum reflectance before and after functionalization as a function of the oxidation degree  $x$  for three different Bragg reflectors (Bragg 1, Bragg 2, and Bragg 3).

to the decrease of the index contrast between the two layers. The less sensitive Bragg mirror at this variation is again the Bragg 2 due to its higher initial contrast of refractive indices between the two layers. The maximum reflectance difference before and after functionalization as a function of the oxidation degree for three different Bragg reflectors [Fig. 8(b)] reveals the same trends. However, this difference drops very quickly to reach low reflectance values. This confirms the form of spectral response of optical structure that is replaced by interference fringes at high oxidation degree.

For detection and dosing applications, the highest spectral response shift must be chosen with a maximum reflection and a significant bandwidth. The Bragg 2 permits to measure easily the redshift with a correct spectral response form (bandwidth and maximum reflection) with less than 40% of oxidation.

### C. Microcavity

The last studied optical structure is the microcavity. The three microcavities are made up of the three previous Bragg mirrors. Table II shows the characteristics of microcavities. Figure 9 reveals the modification of reflectance spectral after

TABLE II. Characteristics of microcavity constituted by two Bragg mirrors and by one defect layer that separates the two Bragg mirrors. The defect layer is characterized by its porosity  $p$ , its refractive index  $n$ , its thickness  $L$ , and its pore size  $\phi$ .

Name	Bragg reflector	$N_1=N_2$	$p$ (%)	$n$	$L$ (nm)	$\phi$ (nm)
Cavity 1	Bragg 1	10	95	1.065	187.7	60
Cavity 2	Bragg 2	11	95	1.065	187.7	60
Cavity 3	Bragg 2	12	80	1.336	149.7	57

anodization, oxidation, and functionalization of the three microcavities. We notice the same trends than for the three Bragg mirrors: a blueshift after oxidation, a redshift after functionalization due to the modification of the refractive indices (decrease and increase, respectively).

A merit factor is the variation of the Fabry–Pérot wavelength  $\lambda_0$  as a function of the quantity to be detected. This variation varies the same manner as the central wavelength of the Bragg reflector. Another merit factor is the factor of quality. In order to study this parameter as a function of the degree of oxidation for the three proposed structures, we use the Fabry–Pérot classical model. The factor of quality is given by the following relationship:

$$Q = \frac{\lambda_0}{\Delta\lambda} = \frac{2n_0L\pi\sqrt{R}\exp(-\alpha L/2)}{\lambda_0(1-R)\exp(-\alpha L)}, \quad (14)$$

where  $n_0$  is the refractive index of the defect layer that separates the two Bragg mirrors,  $L$  its thickness,  $\lambda_0$  the resonant wavelength,  $\alpha$  its absorption coefficient, and  $R$  the reflectance value by assuming that the two Bragg mirrors are similar.

Figure 10 represents the evolution of the factor of quality as a function of oxidation degree for the three microcavities by taking the absorption coefficient of the porous layer into account<sup>21</sup> and the variation of this factor before and after functionalization. In Fig. 10(a), the factor of quality de-

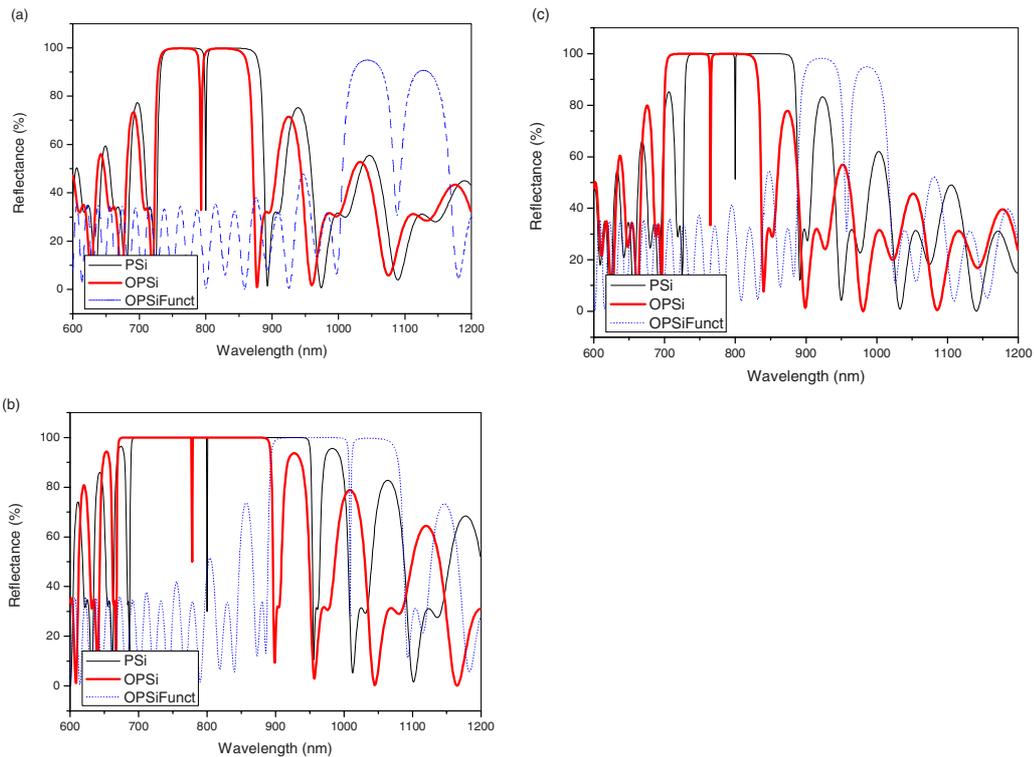


FIG. 9. (Color online) Simulated reflectivity spectra of cavity [(a) cavity 1, (b) cavity 2, and (c) cavity 3] based on PSi layers, oxidized PSi layers and functionalized oxidized PSi layers for an oxidation degree  $x=0.25$ .

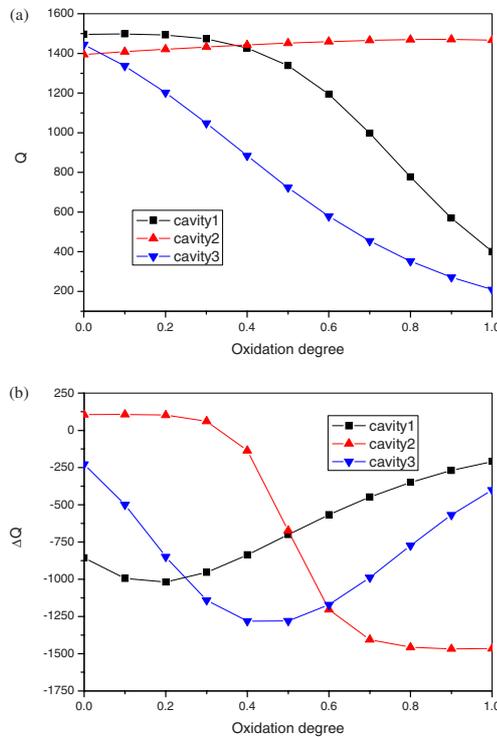


FIG. 10. (Color online) (a) Simulated factor of quality before functionalization as a function of the oxidation degree  $x$  for three different cavities (cavity 1, cavity 2, and cavity 3), (b) simulated difference of factor of quality before and after functionalization as a function of the oxidation degree  $x$  for three different cavities (cavity 1, cavity 2, and cavity 3).

increases with the oxidation degree for cavity 1 and cavity 3 due to the decrease of the reflectance of mirrors. The factor of quality is nearly constant or increases slightly in the case of cavity 2 due to the mirrors reflectance value nearly constant as a function of the oxidation degree. After functionalization [Fig. 10(b)], whatever the oxidation degree and for the cavity 1 and the cavity 3, the factor of quality always decreases whereas for the cavity 2, it increases at low oxidation degree then decreases strongly at an oxidation degree superior to 40%. The evolution of the factor of quality (Fig. 10) has the same trends than the change in maximum reflectance (Fig. 8). The evolution of factor of quality confirms that the cavity 2 has the best factors of merit to manufacture a glucagon biosensor.

To evaluate the sensitivity of the three microcavities, the shift of the central wavelength is studied as a function of the rate of pore coating by biomolecules for an oxidation degree equal to 40%. The rate of pore coating is obtained by varying the coating layer thickness of biomolecules from 0 to 17 nm (0% to 100%, respectively). In Fig. 11, the slope (the sensitivity corresponding to  $\Delta\lambda/\Delta t_{\text{coat}}$ ) is of course the most important for cavity 1 made from the two most porous layers. If the minimum detectable wavelength shift is known, the mini-

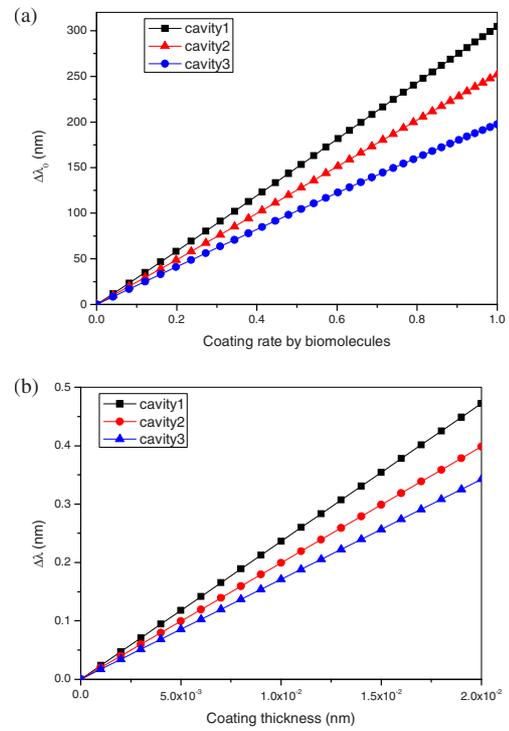


FIG. 11. (Color online) (a) Simulated spectrum redshift as a function of the rate of pore coating for three different cavities (cavity 1, cavity 2, and cavity 3), (b) redshift of the spectra for subangstrom coating thickness for three different cavities.

mum detectable coating thickness can be calculated (Fig. 11). For a detection system capable of resolving a wavelength shift of 0.1 nm, the minimum detectable coating thickness (and sensitivity) are shown in Table III. This value is between  $4 \times 10^{-3}$  and  $6 \times 10^{-3}$  nm. It is possible to detect layers as thin as  $5 \times 10^{-3}$  nm notably for cavity 2.

#### IV. CONCLUSION

The spectral response is based on the modification of the refractive index of functionalized PSi layers. Thus, the pore size should be as small as possible to optimize the sensitivity by detecting the variation in the refractive index (before and

TABLE III. Values of minimum detectable coating thickness for a detection system capable of resolving a wavelength shift of 0.1 nm and values of sensitivity ( $\Delta\lambda/\Delta t_{\text{coat}}$ ) for three different cavities (cavity 1, cavity 2, and cavity 3)

Name of cavity	Sensitivity (nm/nm)	Minimum detectable coating thickness (nm)
Cavity 1	17.9	$4 \times 10^{-3}$
Cavity 2	14.8	$5 \times 10^{-3}$
Cavity 3	11.6	$6 \times 10^{-3}$

after functionalization), but should still allow easy infiltration of biological molecules. The oxidation degree should be low but should still allow for easy binding.

For detection and dosing applications using microcavities, the maximum spectrum redshift should be used. Moreover, maximum reflection and a significant reflection bandwidth are also necessary. This corresponds to oxidized optical structure inferior to 40%. The choice of two layers forming the cavity period corresponds to the highest index contrast. So, a microcavity formed by a period constituted by two porous layers of porosities equal to 95% and 65% with a pore size of 60 and 51 nm, respectively, and with oxidation degree of 40% allows a significative redshift to be obtained with a sensitivity equal to 14.8 nm/nm. The value of minimum detectable coating thickness for a detection system capable of resolving a wavelength shift of 0.1 nm is about  $5 \times 10^{-3}$  nm.

This study based on theoretical conditions will enable us to manufacture a glucagon biosensor based on oxidized PSi (choice of porosity, pore size, oxidation degree, etc.).

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Sheila BODROS for her help in preparing the manuscript.

- <sup>1</sup>V. Pellegrini, A. Tredicucci, C. Mazzoleni, and L. Pavesi, *Phys. Rev. B* **52**, R14328 (1995).  
<sup>2</sup>L. Pavesi, G. Panzarini, and L. C. Andreani, *Phys. Rev. B* **58**, 15794 (1998).  
<sup>3</sup>V. Mulloni and L. Pavesi, *Appl. Phys. Lett.* **76**, 2523 (2000).  
<sup>4</sup>A. Bruyant, G. Lerondel, P. J. Reece, and M. Gal, *Appl. Phys. Lett.* **82**, 3227 (2003).  
<sup>5</sup>M. Ghulinyan, C. J. Oton, G. Bonetti, Z. Gaburro, and L. Pavesi, *J. Appl.*

*Phys.* **93**, 9724 (2003).

- <sup>6</sup>W. H. Zheng, P. Reece, B. Q. Sun, and M. Gal, *Appl. Phys. Lett.* **84**, 3519 (2004).  
<sup>7</sup>N. Ishikura, M. Fujii, K. Nishida, S. Hayashi, J. Diener, M. Mizuhata, and S. Deki, *Opt. Mater.* **31**, 102 (2008).  
<sup>8</sup>X. Wei, C. Kang, M. Liscidini, G. Rong, S. T. Retterer, M. Patrini, J. E. Sipe, and S. M. Weiss, *J. Appl. Phys.* **104**, 123113 (2008).  
<sup>9</sup>E. Guillermain, V. Lysenko, R. Orobchouk, T. Benyattou, S. Roux, A. Pillonnet, and P. Perriat, *Appl. Phys. Lett.* **90**, 241116 (2007).  
<sup>10</sup>H. Ouyang, M. Christophersen, R. Viard, B. L. Miller and P. M. Fauchet, *Adv. Funct. Mater.* **15**, 1851 (2005).  
<sup>11</sup>J. Saarinen, S. Weiss, P. M. Fauchet, and J. E. Sipe, *Opt. Express* **13**, 3754 (2005).  
<sup>12</sup>V. M. Starodub, L. L. Fedorenko, A. P. Sisetskiy, and N. F. Starodub, *Sens. Actuators B* **58**, 409 (1999).  
<sup>13</sup>L. A. Perelman, M. P. Schwartz, A. M. Wohlrab, M. S. VanNieuwenhze, and M. J. Sailor, *Phys. Status Solidi A* **204**, 1394 (2007).  
<sup>14</sup>A. Tinsley-Bown, R. G. Smith, S. Hayward, M. H. Anderson, L. Koker, A. Green, R. Torrens, A.-S. Wilkinson, E. A. Perkins, D. J. Squirrel, S. Nicklin, A. Hutchinson, A. J. Simons, and T. I. Cox, *Phys. Status Solidi A* **202**, 1347 (2005).  
<sup>15</sup>A. Janshoff, K. S. Dancil, C. Steinem, D. P. Greiner, V. S.-Y. Lin, C. Gurtner, K. Motesharei, M. J. Sailor, and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 12108 (1998).  
<sup>16</sup>K.-P. S. Dancil, D. P. Greiner, and M. J. Sailor, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7925 (1999).  
<sup>17</sup>S. Chan, S. R. Horner, P. M. Fauchet, and B. L. Millar, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11797 (2001).  
<sup>18</sup>S. Chan, P. M. Fauchet, Y. Li, and L. J. Rothberg, *Proc. SPIE* **3912**, 23 (2000).  
<sup>19</sup>KGND1 Double Antibody Glucagon notice.  
<sup>20</sup>D. E. Aspnes, *Thin Solid Films* **89**, 249 (1982).  
<sup>21</sup>E. A. Astrova, V. B. Voronkov, A. D. Remennyuk, V. B. Shuman, *Semiconductors* **33**, 1149 (1999).  
<sup>22</sup>K. Barla, R. Herino, and G. Bomchil, *J. Appl. Phys.* **59**, 439 (1986).  
<sup>23</sup>J. Charrier, V. Alaiwan, P. Pirasteh, A. Najjar, and M. Gadonna, *Appl. Surf. Sci.* **253**, 8632 (2007).  
<sup>24</sup>J. R. Madureira, M. H. Degani, and M. Z. Maialle, *Appl. Phys. Lett.* **88**, 162108 (2006).

## **BIOCAPTEUR OPTIQUE DE GLUCAGON SUR SILICIUM POREUX : ETUDE PRELIMINAIRE**

**Mohamed Dribek, Jonathan Barrault, Nathalie Lorrain, Séverine Haeseart,  
Mohammed Guendouz et Lazhar Haji**

*Laboratoire Foton, CNRS UMR 6082, Enssat, BP 80518, 22305 Lannion cedex*

*mohamed.dribek@enssat.fr*

### **RESUME**

Dans le but de développer un biocapteur à base de nanostructures photoniques en silicium poreux, nous avons déterminé des conditions de nanostructuration du silicium favorable à l'immunodétection optique d'une hormone hypoglycémiante, le glucagon. En plus, nous avons étudié la première étape de biofonctionnalisation ; la silanisation.

**MOTS-CLEFS :** *silicium poreux; guid d'onde; microcavité; biocapteur optique.*

### **1. INTRODUCTION**

Un biocapteur est un dispositif analytique constitué d'un biorécepteur immobilisé à la surface d'un transducteur permettant la qualification et/ou la quantification de l'interaction analyte/sonde. En effet, le transducteur transforme le phénomène biochimique résultant de cette interaction en un signal mesurable. Selon le type de biorécepteur (enzyme, anticorps, ADN, cellule ou microorganisme) ou celui du transducteur (électrochimique, mécanique ou optique) on distingue plusieurs classes de biocapteurs [1]. Nos travaux portent en particulier sur les biocapteurs d'affinité à transduction optique sur silicium poreux (SiP). Cette étude s'inscrit dans la perspective de réaliser de nanostructures photoniques en SiP permettant, après biofonctionnalisation, une détection optique directe d'une molécule biopharmaceutique « le Glucagon ». De nos jours, la seule technique analytique appliquée pour la détection de cette molécule est la radioimmunologie qui est une méthode à la fois indirecte et coûteuse. Nous présentons dans cet article les études préliminaires de réalisation de nanostructures photoniques et en particulier les microcavités.

### **2. ETUDE DE L'ELARGISSEMENT DES PORES DU SILICIUM POREUX**

La formation du silicium poreux, matériau constituant le transducteur du biocapteur, permet l'obtention de structures poreuses ayant une grande surface spécifique et un indice de réfraction modulable. De plus, la compatibilité à la fois avec les milieux biologiques et la technologie VLSI ainsi que la réactivité des surfaces poreuses rendent la matrice de SiP favorable aux interactions biomoléculaires [2,3]. Pour infiltrer cette matrice poreuse par des molécules biologiques, la taille des pores doit être ajustée, en particulier du fait que lorsque les molécules sont en solution, elles forment des colloïdes et génèrent des phénomènes stériques rendant leur infiltration délicate.

Pour la réalisation d'un biocapteur de Glucagon, la sonde choisie est un anticorps antiglucagon de type IgG<sub>1</sub> et de taille égale à 17 nm. Pour une infiltration maximale de cette sonde nous avons étudié la réalisation par voie électrochimique de matrices poreuses ayant des pores de diamètre supérieur à 50 nm [4]. Pour cette partie d'expérimentation, nous avons utilisé deux types de substrat de Si: type P<sup>+</sup> (5.10<sup>-3</sup> Ω cm) et type N<sup>+</sup> (10<sup>-2</sup> Ω cm). Nous avons étudié l'effet de la

concentration du HF dans l'électrolyte et de la densité de courant d'anodisation sur la taille des pores déterminée à partir des analyses au MEB. Nous avons constaté que pour les deux types de substrats, l'augmentation du courant d'anodisation permet d'augmenter la taille des pores, alors que l'augmentation de la concentration d'HF entraîne un effet contraire. Dans les meilleures conditions, le diamètre moyen des pores obtenus sur le substrat de type P<sup>+</sup> est égal à 55 nm avec 55% des pores de diamètres au-dessus de 50 nm. Sur le substrat de type N<sup>+</sup>, le diamètre moyen des pores est égal à 85 nm avec 91% des pores de diamètres au-dessus de 50 nm. A priori, la taille de ces pores permettra l'infiltration de la sonde IgG avec une efficacité meilleure sur Si type N<sup>+</sup>.

### 3. SILANISATION DE LA SURFACE DES PORES

Les sondes infiltrées à l'intérieur des pores doivent être fixées à la surface des cristallites. Cette étape d'immobilisation nécessite l'adaptation chimique de la surface des cristallites. En effet, juste après sa préparation, la surface interne du SiP est constituée essentiellement de groupements SiH, SiH<sub>2</sub> et SiH<sub>3</sub> [5] dont nous avons vérifiés la présence par spectroscopie IR. Cette surface à la fois peu stable et hydrophobe n'est pas favorable pour travailler en milieu aqueux. Ce qui nous a amené tout d'abord à l'oxyder afin d'obtenir des groupements Si-OH, Si=O et Si-O-Si puis à fixer d'une manière covalente des silanes à groupements réactifs aminés (silanisation). Le suivi de l'évolution de la modification chimique de la surface des cristallites a été effectué par spectroscopie IR et par réflectométrie dans l'UV-visible et proche IR. L'oxydation du SiP a entraîné le déplacement de son spectre de réflectance vers les basses longueurs d'ondes (blue shift). Cette variation est due à la diminution de l'indice de réfraction de la couche poreuse suite à l'oxydation des cristallites de silicium. L'effet de la silanisation entraîne au contraire le déplacement du spectre vers les grandes longueurs d'onde (red shift). Ceci est dû à la fixation des silanes ( $n = 1.46$ ) sur la surface interne des pores remplaçant en partie l'air.

Ces résultats ont permis de vérifier la fixation des silanes aminés à la surface oxydée des cristallites de silicium poreux. Cette étape est nécessaire pour achever les étapes suivantes d'immobilisation de la sonde biologique (IgG1).

### 4. REALISATION DE NANOSTRUCTURES PHOTONIQUES EN SiP

Le dispositif que nous cherchons à réaliser pour une application de biodétection exploite les propriétés optiques d'une microcavité ou d'une structure guidante.

Une microcavité est constituée d'une couche active (d'indice  $n_1$ ) séparée par deux miroirs de Bragg chacun constitué par l'alternance d'un nombre de couches d'indice différents  $n_1$  (porosité 1) et  $n_2$  (porosité 2). La longueur d'onde de résonance de cette microcavité est très sensible à la variation d'indice de réfraction de la couche active. Ainsi, la présence de glucagon ( $n = 1.42$ ) dans cette couche peut être détectée. En tenant en compte la taille de la molécule, celle des pores constituant les couches poreuses de la microcavité doit être ajustée. En utilisant les résultats obtenus précédemment, nous avons réalisé des microcavités en utilisant deux densités de courant respectivement égales à 40 mA/cm<sup>2</sup> (couche d'indice  $n_1$ ) et 30 mA/cm<sup>2</sup> (couche d'indice  $n_2$ ).

La figure 2 montre les micrographies correspondant à la surface de couches poreuses pour ces deux conditions ainsi qu'une coupe transversale de la microcavité.

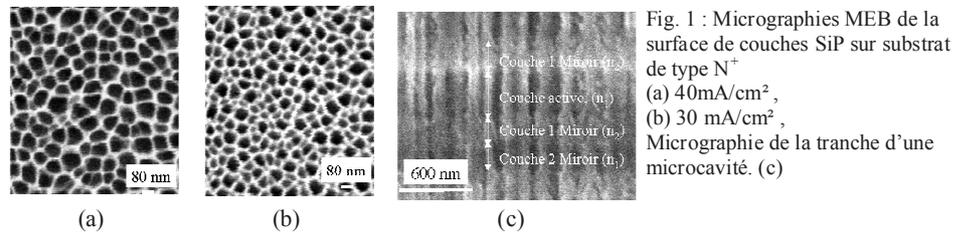


Fig. 1 : Micrographies MEB de la surface de couches SiP sur substrat de type  $N^+$  (a)  $40\text{mA/cm}^2$ , (b)  $30\text{ mA/cm}^2$ , Micrographie de la tranche d'une microcavité. (c)

Nous avons également étudié une structure guidante constituée de trois couches : une couche poreuse d'indice  $n_1$  pour le guidage sépare deux couches de confinement d'indice  $n_2$  (avec  $n_2 < n_1$ ). La couche de confinement supérieure sert de couche sensible à l'espèce biologique. La couche guidante devra donc être réalisée avec des pores imperméables à la sonde. Pour satisfaire cette condition et d'après les résultats précédents, nous avons retenu les conditions suivantes pour réaliser cette structure sur un substrat de type  $P^+$  : couche d'indice  $n_1$  :  $J = 2\text{mA/cm}^2$  - HF 10% et couches  $n_2$  :  $J = 50\text{mA/cm}^2$  - HF 10%. La figure 2 montre des micrographies MEB correspondant à ces conditions.

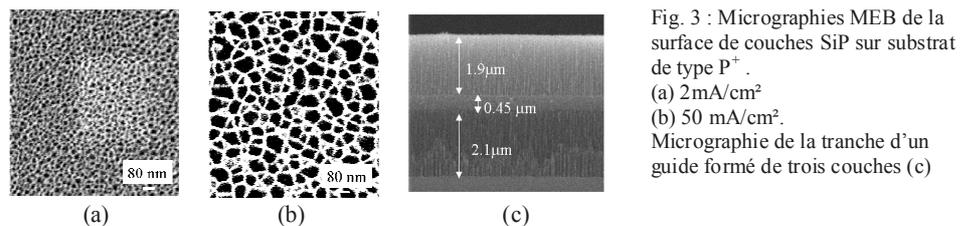


Fig. 3 : Micrographies MEB de la surface de couches SiP sur substrat de type  $P^+$ . (a)  $2\text{mA/cm}^2$  (b)  $50\text{ mA/cm}^2$ . Micrographie de la tranche d'un guide formé de trois couches (c)

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les études réalisées nous ont permis de définir des conditions d'élaboration des couches de silicium poreux adaptées pour notre application de biodétection, ainsi que la réalisation de la première étape de biofonctionnalisation (silanisation). Nous avons aussi commencé la conception et la réalisation de nanostructures en SiP autre que la simple couche telle que les structures guidantes et les microcavités. Les prochaines étapes seront donc de compléter l'étude de ces structures, d'en exploiter d'autres, de les fonctionnaliser et d'évaluer leurs capacités à détecter le glucagon.

## REFERENCES

- [1] Lowe C.R. "Overview of biosensor and bioarray technologies". In handbook of biosensors and biochips, Eds. Marks R.S. et al, Wiley-Interscience, pp. 7-22, 2007.
- [2] Zhu Ziqiang, Zhang Jian, Zhu Jianzhong. "An Overview of Si-based Biosensors". Sensor Letters. 3 (2), pp. 71-88, 2005.
- [3] Canham L.T. et al., "Derivatized porous silicon mirrors: Implantable optical components with slow resorbability". Phys. Stat. sol. (a) 182, pp. 521-225, 2000.
- [4] H. Ouyang et al. "Macroporous silicon microcavity for macromolecule detection". Adv. Funct. Mater. 15, pp. 1851-1859, 2005.
- [5] Janshoff A et al., "Macroporous p-type silicon Fabry-Perot Layers. Fabrication, characterisation, and application in biosensing". J Am. Soc. 120, pp12108-12116, 1998.

# BIOCAPTEUR OPTIQUE DE GLUCAGON SUR SILICIUM POREUX : ETUDES PRELIMINAIRES



M. Dribek, J. Barrault, N. Lorrain, M. Guendouz et L. Haji.  
 Groupe des Matériaux Nanostructurés et Photonique  
 UMR 6082-FOTON, Université de Rennes 1, 6 rue de Kérampont.  
 BP 80518, 22305 Lannion Cedex.



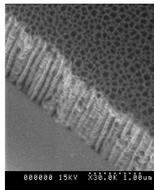
**Contexte :** Développer un biocapteur à base de nanostructures photoniques en silicium poreux.

- Objectifs :**
1. Suivi de l'évolution du matériau « silicium poreux » en fonction des étapes de biofonctionnalisation ; Caractérisations physico-chimiques et optiques.
  2. Faisabilité de nanostructures (microcavités et guides d'onde) pour la détection du glucagon.

## 1. Suivi de l'évolution du matériau

### A. Elaboration du SiP

→ Anodisation électrochimique

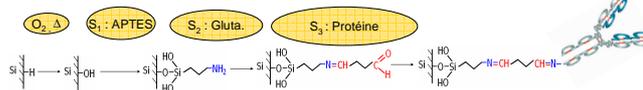


Micrographie MEB d'une couche poreuse de Si

- Substrat Si (100), type : N<sup>+</sup> - P<sup>+</sup>
- J : 40 - 50 mA/cm<sup>2</sup>
- [HF] : 5 - 10%
- Epaisseur : 5 µm
- Porosité : 60 - 90 %
- Ø<sub>m</sub> pores ≥ 50 nm

### B. Etapes de biofonctionnalisation

→ Oxydation (O<sub>2</sub>); Silanisation (APTES); Couplage (Glutaraldéhyde); Protéination (IgG1 ou BSA) :



### C. Caractérisations

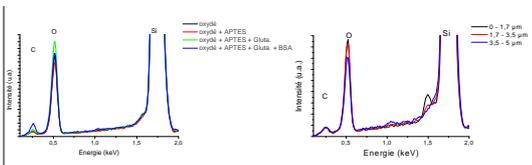
Optique par réflectométrie (SiP type P<sup>+</sup>)

$$n = \frac{N \times \lambda_1 \times \lambda_2}{2 \times e \times (\lambda_2 - \lambda_1)}$$

	SiPO	SiPO+S <sub>1</sub>	SiPO+S <sub>2</sub>	SiPO+S <sub>3</sub>
n	1.168	1.184	1.196	1.207
Δn		0.016	0.011	0.011

n ↗ après chaque étape (S<sub>1,2,3</sub>) de biofonctionnalisation.

Physico-chimique par EDX (SiP type N<sup>+</sup>)

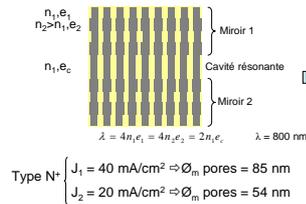


Analyse EDX en surface

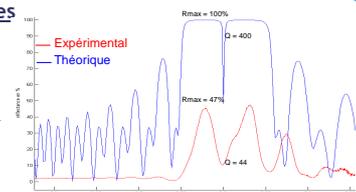
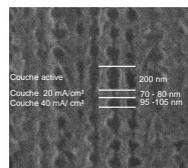
Analyse EDX en profondeur après biofonctionnalisation

- [C] ↗ après introduction de molécules organiques dans les pores.
- Biofonctionnalisation homogène en profondeur.

### A. Microcavité



## 2. Nanostructures photoniques



Spectres de réflectance

λ<sub>rés</sub> = 800 nm

Q<sub>th</sub> >> Q<sub>exp</sub> ⇒ rugosité élevée du SiP type N<sup>+</sup>

### B. Guide résonant

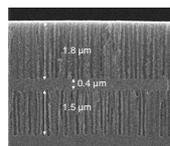
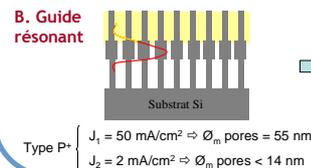


Image de la lumière en sortie du guide.

## Conclusions

- Evolution cohérente de l'indice de réfraction d'une couche de silicium poreux (Type P<sup>+</sup>) en fonction de l'étape de biofonctionnalisation.
- Chimie de surface en concordance avec une introduction régulière et en profondeur des molécules organiques lors de la biofonctionnalisation du SiP (Type N<sup>+</sup>).
- Etude à compléter pour les guides et les microcavités pour la détection du glucagon.



JNOG 20-22 Octobre 2008



## Fonctionnalisation du silicium poreux pour la conception d'un biocapteur

M. Dribek<sup>1</sup>, J. Charrier<sup>1</sup>, M. Guendouz<sup>1</sup>, N. Lorrain<sup>1</sup>, M. Gadonna<sup>2</sup> et L. Haji<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Groupe des Matériaux Nanostructurés pour la Photonique, <sup>2</sup>Centre Commun Lannionais d'Optique, Laboratoire d'Optique UMR 6082-FOTON, Université de Rennes 1, 6 rue de Kérampont, B. P. 80518, 22305 Lannion Cedex.

**Contexte** : Réaliser un biocapteur à partir de silicium poreux (PSi) fonctionnalisé

**Objectifs** : Déterminer les paramètres expérimentaux critiques pour une silanisation homogène et contrôlée (monocouche de silane)

afin de mieux appréhender les autres étapes d'activation de la surface des pores.

→ Activer le silicium poreux afin de permettre la fixation de façon régulière des espèces biologiques (anticorps, enzymes...) susceptibles d'interagir spécifiquement et sensiblement avec l'analyte à quantifier par le biocapteur.

### CONDITIONS EXPERIMENTALES

#### 1. Élaboration d'une couche poreuse par anodisation électrochimique

Substrat : Si Type P<sup>+</sup> (100);  $\rho = 3.10^{-3} \cdot 7.10^{-3} \Omega \cdot \text{cm}$

J=50 mA/cm<sup>2</sup> pendant 120 s;

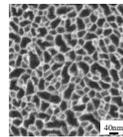
[HF]=10%

→ Epaisseur = 3µm - Porosité = 90±5%

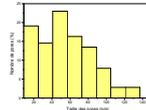
#### 1. Oxydation de la surface poreuse

✓ Thermique (300 ou 900°C) et/ou Chimique (Piranha).

→ Créer des liaisons Si-O-H



Micrographie MEB de la surface d'une couche de PSi après anodisation



$D_m = 54 \text{ nm}$   
 $D > 50 \text{ nm} : 48\%$

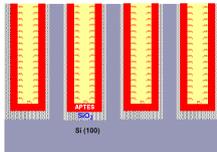
#### 1. Silanisation en milieu liquide

N°Ech	Préparation du PSi							
	Piranha + Anodisation							
	Préoxydation 300°C - 1H			Préoxydation 900°C - 10min				
Traitements de surface	Solvant	Toluène			Eau/méthanol			
	Volume d'APTES	400 µl	200 µl	20 µl	2 µl	0,2 µl	160 µl	160 µl
de surface	Temps de réaction	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	20 min
	Séchage	150°C - 17h						

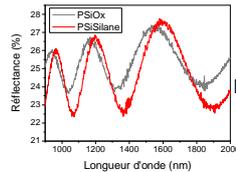
APTES : (3-Aminopropyl)triéthoxysilane

### RESULTATS

#### 1. Obtention de monocouches de silane à la surface des pores et estimation de leur épaisseur par mesure de réflectance



Schématisation des modifications de la surface des pores après silanisation



Courbes de réflectance des couches avant (PSiOx) et après silanisation (PSiSilane) : déplacement des franges d'interférences dû au changement d'indice An

→ Dédution de la variation de n selon les différents traitements : connaissance du nombre de couches de silane

Modélisation de l'indice en fonction du nombre de couches de silane (Modèle du milieu effectif : Bruggeman)

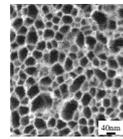
$$f_{Si} \frac{n_{Si}^2 - n^2}{n_{Si}^2 + 2n^2} + f_{air} \frac{n_{air}^2 - n^2}{n_{air}^2 + 2n^2} + f_{SiO_2} \frac{n_{SiO_2}^2 - n^2}{n_{SiO_2}^2 + 2n^2} + f_{APTES} \frac{n_{APTES}^2 - n^2}{n_{APTES}^2 + 2n^2} = 0$$

avec  $\sum_{i=1}^4 f_i = 1$

N° Ech	5	7
(An/n) <sub>théor.</sub> (%)	1,2	6
(An/n) <sub>exp.</sub> (%)	1,4	6

Valeurs théoriques et expérimentales dans le cas de monocouches de silane

#### 1. Observations microscopiques après silanisation

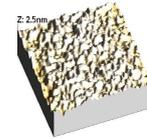
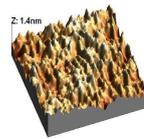


Micrographie MEB de la surface d'une couche de silicium poreux après traitements

- Légère modification de la surface des cristallites
- Pas de nette différence en fonction des conditions de silanisation utilisées



Utilisation de l'AFM afin de suivre la rugosité de surface en fonction des traitements de silanisation réalisés sur des surfaces de silicium monocristallin oxydé



Topographies de la surface obtenues par AFM avant (gauche) et après (droite) silanisation

→ Modification de la rugosité après silanisation

### CONCLUSION

- Suivi des étapes de traitement de surface par réflectance : mesures quantitatives
- Obtention des conditions expérimentales permettant de fonctionnaliser les parois de la couche poreuse par une monocouche de silane
- Observations microscopiques (MEB et AFM) : qualitatives
- Perspectives :
  - Validation des conditions expérimentales par Spectroscopie infrarouge, XPS et Raman
  - Activation biologique de la surface silanisée

NanoSoft 21-25 mai 2007 / Roscoff

# Table des figures

1.1	Schéma général d'un biocapteur. . . . .	11
1.2	Représentation schématique d'un anticorps [adaptée de [29]]. . . . .	15
1.3	Représentation schématique d'un transistor à effet de champ sensible aux ions [52].	18
1.4	Principe de l'utilisation de l'interféromètre Mach-Zehnder pour la biodétection.	21
1.5	Principe de l'utilisation de l'interféromètre de Young pour la biodétection [59].	22
1.6	Interféromètre de Hartman : (A) Vue de dessus, (B) coupe transversale et (C) schéma de l'ensemble de système de détection [62]. . . . .	23
1.7	Exemple d'application de l'interférométrie par rétrodiffusion pour la détection d'interactions moléculaires [65]. . . . .	24
1.8	Exemples de structures fibrées exploitants l'interférométrie de Fabry-Pérot pour la biodétection [69, 70]. . . . .	25
1.9	a. Représentation schématique d'une coupe transversale d'un échantillon de silicium poreux structuré en microcavité. b. Spectre théorique de la réflectance en fonction de la longueur d'onde simulé pour une microcavité centrée à 1000 nm ( $n_1 = 1,22$ , $n_2 = 1,44$ et $N = 15$ ). . . . .	25
1.10	Principales méthodes d'immobilisation des biorécepteurs [74, 75]. . . . .	27
1.11	Schémas des surfaces après auto-assemblage de monocouche pure (a) et mixte (b) pour l'immobilisation de fragments d'ADN simple brin [79]. . . . .	29
1.12	Réactions mises en jeu lors de la silanisation [79]. . . . .	30
1.13	Agents de silanisation majeurs dans l'immobilisation des biorécepteurs [79]. .	30
1.14	Schémas des couches de silane formées à la surface d'une couche de silice correspondant à des concentrations de MPTS de $5.10^{-3}$ M (a), $2.10^{-2}$ M (b) et $4.10^{-2}$ M (c) [83]. . . . .	31
1.15	Schémas des différentes étapes d'immobilisation des biomolécules via les carbodiimides. . . . .	32

1.16 Exemples d'agents de couplage homobifonctionnels (a. glutaraldéhyde, b. 1,4-phénylendiisothiocyanate, c. bis-imidate et d. N-hydroxy-succinimide ester), hétérobifonctionnels (e. Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, f. N-( $\gamma$ -maleimidobutyryloxy) succinimide ester et g. acide N-hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoïque) et plurifonctionnels (f. les dendrimers).	34
1.17 Représentation schématique de l'immobilisation des biomolécules par l'affinité streptavidine/biotine. . . . .	35
1.18 Immobilisation des enzymes sur une monocouche aux terminaisons carboxyles par l'intermédiaire du polymère poly-L-lysine [79]. . . . .	36
1.19 Schéma de principe de l'anodisation électrochimique pour l'élaboration du silicium poreux. . . . .	38
1.20 Mécanisme réactionnel responsable de la formation du silicium poreux par anodisation électrochimique [103]. . . . .	38
1.21 Schéma et micrographies MEB des principales structures poreuses [107, 108, 109]. Pores continus non ramifiés de forme cylindrique (a), pores continus non ramifiés de forme géométrique irrégulière (b), pores ramifiés (c) et des pores discontinus de forme aléatoire (d). . . . .	39
1.22 Détermination de l'épaisseur optique d'une monocouche de silicium poreux : Schéma (en haut) et micrographie MEB (en bas) d'une monocouche de silicium poreux (a), sa réponse spectrale (b) et le résultat de l'application d'une transformée de Fourier (c) [93, 130, 117] . . . . .	42
1.23 Schémas (au milieu) et micrographies MEB (en bas) des différentes structures du silicium poreux et spectres de réflectance correspondants (en haut) : (a) double couche, (b) miroir de Bragg et (c) microcavité [93, 137, 131, 138] . . .	44
1.24 Schéma simplifié du mécanisme d'action du glucagon physiologique (A) et thérapeutique (B) . . . . .	46
2.1 Schéma de la cellule utilisée pour la formation du SiP. . . . .	53
2.2 Schéma des différentes étapes de la biofonctionnalisation. . . . .	54
2.3 Programmes de traitement thermiques utilisés pour l'oxydation du silicium poreux. . . . .	55
2.4 Illustration schématique de la qualité du remplissage par capillarité d'une solution dans des pores en fonction de leurs structures. (a) et (b) Remplissage total et répartition homogène du liquide dans les pores continus non ramifiés, (c) répartition hétérogène du liquide dans le volume des pores ramifiés et (d) remplissage partiel des pores discontinus de formes aléatoires [adaptée de la figure 1.21] . . . . .	57

2.5	Exemple d'observations microscopiques pour la caractérisation structurale d'une monocouche de silicium poreux. a et b : Micrographies MEB d'une coupe transversale d'un échantillon de silicium poreux avant et après gravure RIE. c et d : Micrographies MEB d'une surface d'un échantillon de silicium poreux avant et après gravure RIE. . . . .	59
2.6	Représentation schématique de la structure en bouteille d'une couche de silicium poreux. . . . .	60
2.7	Histogramme représentant la distribution de la taille des pores en surface d'une monocouche de silicium poreux. Conditions d'anodisation : Substrat Si P <sup>+</sup> (B) $\sim 4.10^{-3}$ $\Omega.cm$ , t = 120 s, [HF] = 10 %. . . . .	60
2.8	Evolution de la taille des pores en fonction de la densité de courant d'anodisation appliquée lors d'élaboration de monocouches de silicium poreux. Conditions d'anodisation : Substrat Si P <sup>+</sup> (B) $\rho \approx 4.10^{-3}$ $\Omega.cm$ , t = 120 s, HF 10 %. . . . .	62
2.9	Présentation schématique d'une monocouche de silicium poreux utilisée pour le calcul de la surface spécifique. . . . .	63
2.10	(a) Schéma du principe de la technique interférométrique appliquée sur une monocouche de silicium poreux élaborée sur substrat de silicium et (b) spectres de dispersion de l'indice de réfraction du silicium ( $n_2$ ) et du coefficient d'extinction ( $k_2$ ) [131]. . . . .	66
2.11	Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux avant et après gravure RIE. Conditions d'anodisation : Substrat Si P <sup>+</sup> (B), $\rho \approx 4.10^{-3}$ $\Omega.cm$ , J = 50 mA.cm <sup>-2</sup> , t = 200 s, [HF] = 10 %. Conditions de gravure : gaz SF <sub>6</sub> , débit 5 sccm, Puissance 50 W, Pression 10 mTorr et durée 30 s. . . . .	67
2.12	Exemple de spectres de réflectance expérimental et théorique d'une couche de silicium poreux réalisée sur un substrat de type P <sup>+</sup> . . . . .	69
2.13	Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier [157]. . . . .	71
2.14	Exemple de spectre infrarouge d'une couche de type silice . . . . .	72
2.15	Diagramme énergétique de la photo émission . . . . .	73
2.16	a. Spectre de survol de SiO <sub>2</sub> , b. Déplacement chimique du spectres Si2p . . . . .	74
2.17	Diagramme de Jablonski : Evolution de l'énergie de vibration d'un atome stimulé par un laser. . . . .	76
2.18	Schéma de principe d'un spectromètre Raman. . . . .	78
2.19	Informations qualitatives et quantitatives fournies par une raie Raman. . . . .	78
3.1	Schéma de la matrice de transfert $T(\lambda)$ pour une monocouche de silicium poreux (milieu 1 délimité par les milieux 0 = air et 3 = silicium). . . . .	82
3.2	Schéma de la matrice de transfert $T(\lambda)$ pour une structure multicouche de silicium poreux délimitée par la milieu 0 (air) et le milieu f (silicium). . . . .	84

3.3	Schéma d'un miroir de Bragg à base de silicium poreux (a) et principe de son élaboration par anodisation électrochimique (b). . . . .	85
3.4	Schéma de la matrice de transfert $T(\lambda)$ pour un miroir de Bragg à base de silicium poreux délimité par la milieu 0 (air) et le milieu 3 (silicium). . . . .	85
3.5	Spectre de réflectance théorique d'un miroir de Bragg en silicium poreux centré à 1200 nm. . . . .	86
3.6	Schéma de la matrice de transfert $T(\lambda)$ pour une microcavité. . . . .	87
3.7	Spectre de réflectance théorique d'une microcavité en silicium poreux centré à 1200 nm. . . . .	88
3.8	Déplacement du spectre de réflectance théorique d'une microcavité en silicium poreux entraînée par une variation d'indice du milieu de l'ordre de $10^{-2}$ . . . . .	89
3.9	Schéma du milieu effectif appliqué à une couche poreuse fonctionnalisée. . . . .	90
3.10	Simulation de l'évolution de la variation de l'indice de réfraction ( $\Delta n$ ) d'une monocouche de silicium poreux ( $p = 0,8$ et $e = 2 \mu\text{m}$ ) engendrée par la fonctionnalisation chimique en fonction du diamètre des pores et du degré d'oxydation. . . . .	95
3.11	Simulation de l'évolution du déplacement spectral ( $\Delta \lambda_0$ ) entraîné par la fonctionnalisation chimique de trois miroirs de Bragg en fonction du degré d'oxydation. . . . .	97
3.12	Simulation de l'évolution du déplacement du pic de résonance ( $\Delta \lambda_0$ ) entraîné par la détection d'espèces chimiques dans trois microcavités en fonction de l'épaisseur du film organique formé. . . . .	98
4.1	Spectre FTIR d'une couche détachée de silicium poreux préparée par anodisation électrochimique sur une épaisseur de $90 \mu\text{m}$ . Conditions d'anodisation : Substrat Si P <sup>+</sup> (B) $\sim 4.10^{-3} \Omega.\text{cm}$ , $t = 60 \text{ min}$ , $[\text{HF}] = 37,5 \%$ . . . . .	103
4.2	Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux aux différentes étapes de sa préparation. . . . .	106
4.3	Mécanisme réactionnel de la silanisation avec du (3aminopropyl)triéthoxysilane (APTES). . . . .	109
4.4	Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux à différentes étapes de sa préparation. . . . .	111
4.5	Spectres RAMAN d'une couche de silicium poreux à différentes étapes de sa biofonctionnalisation. . . . .	114
4.6	Analyse RAMAN en volume et à différentes régions (a. haut, b. milieu et c. bas) d'une couche de silicium poreux biofonctionnalisé avec de l'albumine. . . . .	115
4.7	Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux à différentes étapes de sa biofonctionnalisation. . . . .	116

4.8	Evolution de l'indice de réfraction (courbe en bleu) de la couche poreuse associée aux fractions volumiques des substances organiques (courbe en rouge) incorporés dans le matériau après chaque étape de fonctionnalisation. . . . .	117
4.9	Réaction de fixation de l'agent de couplage glutaraldéhyde suivie par le greffage biomoléculaire des anticorps anti-glucagon. . . . .	118
4.10	Micrographie MEB d'une surface d'un échantillon de silicium poreux après gravure RIE et histogramme représentant la distribution de la taille des pores à cette surface. Conditions d'anodisation : Substrat Si de type N <sup>+</sup> (Sb), $\rho \approx 10^{-2} \Omega.cm$ , $J = 40 mA.cm^{-2}$ , $t = 180 s$ , [HF] = 5,6 %. Conditions de gravure : gaz SF <sub>6</sub> , débit 5 sccm, Puissance 50 W, Pression 10 mTorr et durée 30 s. . . . .	120
4.11	a. Micrographie MEB d'une coupe transversale d'un échantillon de silicium poreux après gravure RIE. b. Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux avant (SiP) et après gravure RIE (SiP-RIE). Conditions d'anodisation : Substrat Si de type N <sup>+</sup> (Sb), $\rho \approx 10^{-2} \Omega.cm$ , $J = 40 mA.cm^{-2}$ , $t = 180 s$ , [HF] = 5,6 %. Conditions de gravure : gaz SF <sub>6</sub> , débit 5 sccm, Puissance 50 W, Pression 10 mTorr et durée 30 s. . . . .	121
4.12	Spectres de réflectance d'une couche de silicium poreux aux différentes étapes de sa biofonctionnalisation. . . . .	122
4.13	Spectres XPS enregistrés sur la surface d'une couche poreuse à différentes étapes de la biofonctionnalisation. . . . .	123
4.14	Schéma illustrant le comportement fluide d'une goutte de liquide déposée à la surface de deux échantillons de silicium poreux de porosités différentes. . . . .	124
4.15	a. Micrographie MEB d'une coupe transversale d'un échantillon de silicium poreux structuré en une microcavité d'épaisseur totale égale à 8,3 $\mu m$ . b. Spectres de réflectance théorique et expérimental de la microcavité centrée à 793 nm élaboré par la superposition de deux miroirs de Bragg constitués chacun de 12 bicouches alternant les couches de porosités égales à 91 % et 82 %. . . . .	127
4.16	Déplacement du pic de Fabry Pérot de la microcavité 1 (substrat de type P <sup>+</sup> ) en fonction de la fonctionnalisation. . . . .	128
4.17	a. Micrographie MEB d'une coupe transversale d'un échantillon de silicium poreux structuré en une microcavité d'épaisseur totale égale à 6800 nm (substrat de type N <sup>+</sup> ). b. Spectres de réflectance théorique et expérimental de la microcavité centrée à 799 nm élaboré par la superposition de deux miroirs de Bragg constitués chacun de 9 bicouches alternant les couches de porosités égales à 96 % et 85 %. . . . .	129
4.18	Déplacement du pic de Fabry Pérot de la microcavité N en fonction de la fonctionnalisation. . . . .	130
4.19	Courbe de saturation des sites antigéniques de l'anticorps anti-glucagon. . . . .	135

4.20 Représentation schématique des guides résonant (A) et anti-résonant (B) . . . . 137

# Liste des tableaux

1.1	Différentes classes enzymatiques et les réactions biochimiques correspondantes [11]. . . . .	12
1.2	Exemples de biorécepteurs enzymatiques. . . . .	13
1.3	Exemples de biorécepteurs immunologiques. . . . .	14
1.4	Techniques optiques et paramètres mesurables en biodétection. . . . .	19
1.5	Sensibilités des techniques interférométriques pour la détection des protéines. . . . .	26
1.6	Exemples d'agents de couplage bifonctionnels. . . . .	33
2.1	Composition en pourcentage de l'électrolytes d'anodisation. Soit une concentration de HF égale à 10 % ([HF] = 10 %). . . . .	52
2.2	Diamètre moyen et pourcentage de pores de taille supérieure à 50 nm pour des monocouches de silicium poreux élaborées à des densités de courants différentes. . . . .	61
2.3	Caractérisations physiques de couches de silicium poreux effectuées sur plusieurs échantillons élaborés dans les mêmes conditions avant et après gravure RIE. . . . .	68
4.1	Caractérisation des monocouches de silicium poreux avant et après silanisation par immersion. . . . .	105
4.2	Caractérisation des monocouches de silicium poreux avant et après silanisation par imprégnation. . . . .	110
4.3	Evolution de l'indice de réfraction et de la fraction volumique en matière organique d'une couche poreuse (élaborée sur un substrat de silicium de type P <sup>+</sup> et avec une densité de courant et une concentration de HF respectivement égales à 50 mA.cm <sup>-2</sup> et 10 %) aux différentes étapes de sa fonctionnalisation. . . . .	116
4.4	Diamètre moyen et pourcentage de pores de taille supérieure à 50 nm pour des monocouches de silicium poreux élaborées à des densités de courant différentes. . . . .	119
4.5	Composition élémentaire déterminée par EDX de la couche poreuse en carbone, oxygène, et silicium après les différentes étapes de fonctionnalisation. . . . .	123

4.6	Composition élémentaire déterminée par XPS de la surface externe de la couche poreuse en oxygène (O1S), azote (N1S), carbone (C1S) et silicium (Si2p) après les étapes de fonctionnalisation SiP-S1 (après oxydation), SiP-S2 (après silanisation) et SiP-S4 (après greffage de l'albumine). . . . .	124
4.7	Evolution de l'indice de réfraction et de la fraction volumique en matière organique d'une monocouche poreuse (élaborée sur un substrat de silicium de type P <sup>+</sup> et avec une densité de courant et une concentration de HF respectivement égales à 30 mA.cm <sup>-2</sup> et 10 %) aux différentes étapes de sa fonctionnalisation. .	126
4.8	Tableau récapitulatif des paramètres structuraux (porosités "P", diamètres "D" et surfaces spécifiques "S <sub>s</sub> ") des couches poreuses constituant les microcavités 1 et 2 ainsi que les déplacements spectraux de ces structures $\Delta\lambda_0(\text{org})$ entraînés par les étapes de biofonctionnalisation (silanisation, couplage aldéhyde et fixation des anticorps). . . . .	130

# Bibliographie

- [1] G.A. Rechnitz, R.K. Kobos, S.J. Riechel, and R. Gebauer. "A bioselective membrane electrode prepared with living bacterial cells". *Anal. Chim. Acta.*, **vol. 94** :page 357, (1977).
- [2] L. C. Clark. "Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions". *Trans. Am. Soc. artif. internal. organs.*, **vol. 2** :page 41, (1956).
- [3] L.C. Clark and C. Lyons. "Electrode system for continuous monitoring of cardiovascular surgery". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **vol. 102** :page 29, (1962).
- [4] S.J. Updike and G.P. Hicks. "The enzyme electrode". *Nature*, **vol. 214** :page 986, (1967).
- [5] M. Feinberg. "*La validation des méthodes d'analyse : une approche chimométrique de l'assurance qualité au laboratoire*". Masson, Paris, (1996).
- [6] R. S. Marks, C. R. Lowe, D. C. Cullen, H. H. Weetall, and I. Karube. "*Handbook of Biosensors and Biochips*". Wiley-Interscience, Chichester, England, (2007).
- [7] M. J. Goldfinch and C. R. Lowe. "Solid-phase optoelectronic sensors for biochemical analysis". *Anal. biochem.*, **vol. 138**(2) :page 430, (1984).
- [8] E. Katza, V. Heleg-Shabtaia, B. Willnera, I. Willner, and A. F. Bückmann. "Electrical contact of redox enzymes with electrodes : novel approaches for amperometric biosensors". *Bioelectrochem. bioenerg.*, **vol. 42** :page 95, (1997).
- [9] M.M.F. Choi. "Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers". *Mikrochimica acta*, **vol. 148** :page 107, (2004).
- [10] J. Wang. "Glucose biosensors : 40 years of advances and challenges". *Electroanalysis*, **vol. 13** :page 983, (2001).
- [11] E. C. Webb. "*Enzyme Nomenclature 1992 : Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes*". Academic press, San Diego, United States, (1992).
- [12] N.C. Foulds and C.R. Lowe. "Enzyme entrapment in electrically conducting polymers". *J. Chem. Soc.*, **vol. 82** :page 1259, (1986).
- [13] R.W. Murray, A.G. Ewing, and R.A. Durst. "Chemically modified electrodes". *Anal. Chem.*, **vol. 59** :page 379A, (1987).

- [14] P. Hilditch and M. Green. "Disposable electrochemical biosensors". *Analyst*, **vol. 116** :page 1217, (1991).
- [15] J.P. Hart, A. Crew, E. Crouch, K.C. Honeychruch, and R.M. Pemberton. "Some Recent Designs and Developments of Screen-Printed Carbon Electrochemical Sensors/Biosensors for Biomedical, Environmental, and Industrial Analyses". *Anal. Lett.*, **vol. 37** :page 789, (2004).
- [16] N.C. Foulds and C.R. Lowe. "Immobilization of glucose oxidase in ferrocene-modified pyrrole polymers". *Anal. Chem.*, **vol. 60** :page 2473, (1988).
- [17] T.J. Ohara, R. Rajagopalan, and A. Heller. "Enzyme electrodes for amperometric determination of glucose or lactate in the presence of interfering substances". *Anal. Chem.*, **vol. 66** :page 2451, (1994).
- [18] D.S. Bindra, Y. Zhang, G.S. Wilson, R. Sternberg, D.R. Thévenot, D. Moatti, and G. Reach. "Design and in vitro studies of a needle-type glucose sensor for subcutaneous monitoring". *Anal. Chem.*, **vol. 63** :page 1692, (1991).
- [19] D. W. Schmidtke, A. C. Freeland, A. Heller, and R. T. Bonnecaze. "Measurement and modeling of the transient difference between blood and subcutaneous glucose concentrations in the rat following injection of insulin". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **vol. 95** :page 294, (1998).
- [20] R. J. Russell and M. V. Pishko. "Poly(ethylene glycol) hydrogel-encapsulated fluorophore-enzyme conjugates for direct detection of organophosphorus neurotoxins". *Anal. Chem.*, **vol. 71** :page 4909, (1999).
- [21] T. Horibe, M. Kikuchi, and K. Kawakami. "Interaction of human protein disulfide isomerase and human P5 with drug compounds : Analysis using biosensor technology". *Process Biochemistry*, **vol. 43** :page 1330, (2008).
- [22] E. Llaudet, S. Hatz, M. Droniou, and Nicholas Dale. "Microelectrode biosensor for real-time measurement of ATP in biological tissue". *Anal. Chem*, **vol. 77** :page 3267, (2005).
- [23] M. I. Prodromidis, S.M. Tzouwara-Karayanni, M. I. Karayannis, and P. M. Vadgama. "Bioelectrochemical determination of citric acid in real samples using a fully automated flow injection manifold". *Analyst*, **vol. 122**(10) :page 1101, (1997).
- [24] J. F. Bach. "*Immunologie*". Flammarion, Paris, (1999).
- [25] R. R. Porter. "The hydrolysis of rabbit gamma-globulin and antibodies with crystalline papain". *Biochem J.*, **vol. 73** :page 119, (1959).
- [26] G. M. Edelman. "Antibody structure and molecular immunology". *Annals of the New York Academy of Sciences*, **vol. 190** :page 5, (1971).
- [27] U. Rutishauser, B. A. Cunningham, C. Bennett, W.H.Konigsberg, and G. M. Edelman. "Amino acid sequence of the Fc region of human gamma G-immunoglobuline". *Biochemistry*, **vol. 61** :page 1414, (1968).

- [28] L. J. Harris, E. Skaletsky, and A. McPherson. "Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody". *J. Mol. Biol.*, **vol. 275** :page 861, (1998).
- [29] G. Gorochov. "Synthèse et Structure des Immunoglobulines". *url* : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/immun/anticorps1>, (2007).
- [30] J. R. North. "Immunosensors : antibody-based biosensors". *Tends in Biotechnology*, **vol. 3** :page 180, (1985).
- [31] H. Nakamura and I. Karube. " Current research activity in biosensors". *Anal. Bioanal. Chem.*, **vol. 377** :page 446, (2003).
- [32] F. A. Chetcuti and D. K. Y. Wong. " An indirect perfluorosulfonated ionomer-coated electrochemical immunosensor for the detection of the protein human chorionic gonadotrophin". *Anal. Chem.*, **vol. 71** :page 4088, (1999).
- [33] R. V. Garçia, M. M. G. Suarez, M. T. F. Abedul, F. J. Méndez, and A. C. Garcia. " Oriented immobilisation of anti-pneumolysin Fab through a histidine tag for electrochemical immunosensors". *Biosensors and Bioelectronics*, **vol. 23** :page 210, (2007).
- [34] Z. Shen, R. L. Mernaugh, H. Yan, L. Yu, Yi. Zhang, and X. Zeng. " Engineered recombinant single-chain fragment variable antibody for immunosensors". *Anal. Chem.*, **vol. 77** :page 6834, (2005).
- [35] J. M. Encarnaçao, L. Rosa, R. Rodrigues, L. Pedro, F. A. Silva, J. Gonçalves, and G. N. M. Ferreira. " Piezoelectric biosensors for biorecognition analysis : Application to the kinetic study of HIV-1 Vif protein binding to recombinant antibodies". *Journal of Biotechnology*, **vol. 132** :page 142, (2007).
- [36] C. L. Morgan, D. J. Newman, and C. P. Price. "Immunosensors : technology and opportunities in laboratory medicine". *Clinical Chemistiy*, **vol. 42(2)** :page 193, (1996).
- [37] A. P. F. Turner. "Biosensors : switching chanelns makes sens". *Nature*, **vol. 387** :page 555, (1997).
- [38] G. Woodhouse, L. King, L. Wieczorek, P. Osman, and B. Cornell. "The ion channel switch biosensor ". *J. Mol. Recognit.*, **vol. 12** :page 328, (1999).
- [39] B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksvytis, L. G. King, P. D. J. Osman, d L. Wieczorek B. Ranguse a, and R. J. Pace. "A biosensor that uses ion-channel switches". *Nature*, **vol. 387** :page 580, (1997).
- [40] O. Braha, L. Gu, L. Zhou, X. Lu, S. Cheley, and H. Bayley. "Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions". *Nature Biotechnol.*, **vol. 18** :page 1005, (2000).
- [41] D. Kriz, O. Ramström, and K. Mosbach. "Molecular imprinting-based biomimetic sensors could provide an alternative to often unstable biosensors for industry". *Anal. Chem.*, **vol. 69** :page 345A, (1997).

- [42] K. Haupt and K. Mosbach. "Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors". *Chem. Rev.*, **vol. 100** :page 2495, (2000).
- [43] F. Chauveau, C. Pestourie, and B. Tavitian. "Aptamers : selection and scope of applications". *Pathologie Biologie*, **vol. 54** :page 251, (2006).
- [44] S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini. "Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis". *Biomolecular Engineering*, **vol. 24** :page 191, (2007).
- [45] S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini. "Aptamer-based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads". *Anal. Chem.*, **vol. 79** :page 1466, (2007).
- [46] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, and O. Buchardt. "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". *Science*, **vol. 2254**(5037) :page 1497, (1991).
- [47] O. Brandt and J. D. Hoheisel. "Peptide nucleic acids on microarrays and other biosensors". *TRENDS in Biotechnology*, **vol. 22**(12) :page 617, (2004).
- [48] J. Hahn and C. M. Lieber. "Direct Ultrasensitive Electrical Detection of DNA and DNA Sequence Variations Using Nanowire Nanosensors". *Nano Letters*, **vol. 4**(1) :page 51, (2004).
- [49] D. M. Disley, P. R. Morrill, K. Sproule, and C. R. Lowe. "An optical biosensor for monitoring recombinant proteins in process media". *Biosensors Bioelectronics*, **vol. 14** :page 481, (1999).
- [50] K. Sproule, P. Morrill, J. C. Pearson, S. J. Burton, K. R. Hejnæs, H. Valorec, S. Ludvigsen, and C. R. Lowe. "New strategy for the design of ligands for the purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography ". *Journal of Chromatography B*, **vol. 740** :page 17, (2000).
- [51] G. G. Guilbault. *"Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins"*. Plenum Press, New York, United States, (1977).
- [52] D. G. Pijanowska and W. Torbicz. "Biosensors for bioanalytical applications". *Bulletin of Polish Academy of Sciences*, **vol. 53**(3) :page 251, (2005).
- [53] J. R. Sandifer and J. J. Voycheck. " A Review of Biosensor and Industrial Applications of pH-ISFETs and an Evaluation of Honeywell's "DuraFET"". *Mikrochim. Acta 131, 91*, **vol. 131** :page 91, (1999).
- [54] J. Honga, J. S. Choi, G. Hana, J. K. Kangc, C. Kimb, T. S. Kima, and D. S. Yoon. "A Mach-Zehnder interferometer based on silicon oxides for biosensor applications". *Analytica Chimica Acta*, **vol. 573** :page 97, (2006).
- [55] B. Drapp, J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, B.J. Luff, J.S. Wilkinson, and J. Ingenhoff. "Integrated optical Mach-Zehnder interferometers as simazine immunoprobes". *Sensors and Actuators B*, **vol. 38** :page 277, (1997).

- [56] L.M. Lechuga, A.T.M. Lenferink, R.P.H. Kooyman, and J. Greve. "Feasibility of evanescent wave interferometer immunosensors for pesticide detection : chemical aspects". *Sensors and Actuators B*, **vol. 24-25** :page 762, (1995).
- [57] F. Prieto, B. Sepulveda, A. Calle, A. Llobera, C. Dominguez, and L.M. Lechuga. "Integrated MachZehnder interferometer based on arrow structures for biosensor applications". *Sensors and Actuators B*, **vol. 92** :page 151, (2003).
- [58] D. Esinenco, S. D. Psoma, M. Kusko, A. Schneider, and R. Muller. "Su-8 micro-biosensor based on Mach-Zehnder interferometer". *Rev. Adv. Mater. Sci.*, **vol. 10** :page 295, (2005).
- [59] X. Fan. "*Advanced Photonic Structures for Biological and Chemical Detection*". Springer New York, New York, United States, (2009).
- [60] A. Ymeti, J. Greve, P.I V. Lambeck, T. Wink, S. W. F. M. van Hövell, T. A. M. Beumer, R. R. Wijn, R. G. Heideman, V. Subramaniam, and J. S. Kanger. "Fast, ultrasensitive virus detection using a Young interferometer sensor". *Nano Letters*, **vol. 7(2)** :page 394, (2007).
- [61] N.F Hartman. "Integrated optic interferometric sensor". *U.S. Patent*, **5,623,561**, (1997).
- [62] B. H. Schneider, E. L. Dickinson, M. D. Vach, J. V. Hoijer, and L. V. Howard. "Highly sensitive optical chip immunoassays in human serum". *Biosensors Bioelectronics*, **vol. 15** :page 13, (2000).
- [63] B. H. Schneider, J. G. Edwards, and N. F. Hartman. "Hartman interferometer : versatile integrated optic sensor for label-free, real-time quantification of nucleic acids, proteins, and pathogens". *Clinical Chemistry*, **vol. 43(9)** :page 1757, (1997).
- [64] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun. "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets : A review". *analytica chimica acta*, **vol. 620** :page 8, (2008).
- [65] D. Bornhop, J. C. Latham, A. Kussrow, D. A. Markov, R. D. Jones, and H. S. Sørensen. "Free-solution, label-free molecular interactions studied by back-scattering interferometry". *Science*, **vol. 317** :page 1732, (2007).
- [66] H. S. Sørensen, P. E. Andersen, N. B. Larsen, P. R. Hansen, and D. J. Bornhop. "Biosensing with backscattering interferometry". *Biomedical Optics Medical Imaging IN SPIE Newsroom*, **5 June**, (2009).
- [67] H. J. Tarigan, P. Neill, C. K. Kenmore, and D. J. Bornhop. "Capillary-scale refractive index detection by interferometric backscatter". *Anal. Chem.*, **vol. 68** :page 1762, (1996).
- [68] Y. Zhang, H. Shibru, K. L. Cooper, and A. Wang. "Miniature fiber-optic multicavity Fabry-Perot interferometric biosensor". *Optics Letters*, **vol. 30** :page 1021, (2005).

- [69] X. Wang, K. L. Cooper, A. Wang, J. Xu, Z. Wang, Y. Zhang, and Z. Tu. "Label-free DNA sequence detection using oligonucleotide functionalized optical fiber". *Appl. Phys. Lett.*, **vol. 89** :page 163901, (2006).
- [70] W. Liang, Y. Huang, Y. Xu, R. K. Lee, and A. Yariv. "Highly sensitive fiber Bragg grating refractive index sensors". *Appl. Phys. Lett.*, **vol. 86** :page 151122, (2005).
- [71] L. A. DeLouise, P. M. Kou, and B. L. Miller. "Cross-correlation of optical microcavity biosensor response with immobilized enzyme activity. insights into biosensor sensitivity". *Anal. Chem.*, **vol. 77** :page 3222, (2005).
- [72] M. Weisser, G. Tovar, S. Mittler-Nehera, W. Knoll and F. Brosinger, H. Freimuth, M. Lacherb, and W. Ehrfeld. "Specific bio-recognition reactions observed with an integrated MachZehnder interferometer". *Biosensors and Bioelectronics*, **vol. 14** :page 405, (1999).
- [73] M. Zhao, D. D. Nolte, W. R. Cho, F. Regnier, M. Varma, G. Lawrence, and J. Pasqua. "High-speed interferometric detection of label-free immunoassays on the biological compact disc". *J. Clin. Chem.*, **vol. 52** :page 2135, (2006).
- [74] A. T. Mai. "*Exploitation de signaux biologiques pour la réalisation de capteurs environnementaux : Application à la construction d'un biocapteur à micro-algues immobilisées et d'une bioélectrode à enzyme immobilisée*". PhD thesis, Ecole nationale supérieure des mines, (2003).
- [75] W. Hartmeier. "*Immobilized Biocatalyst*". Springer-Verlag, Berlin, Germany, (1988).
- [76] A. D. Bruyne. "*Contribution à l'étude de la formation et des propriétés des films de poly-2-vinylpyridine et de polypyrrole obtenus par électropolymérisation en solutions aqueuses*". PhD thesis, Université libre de Bruxelles, (1996).
- [77] Serge Cosnier. "Biosensors based on electropolymerized films new trends". *Anal Bioanal Chem*, **vol. 377** :page 507, (2003).
- [78] A. G. Mayes. "*Biomolecular sensors*". Taylor and Francis, London, England, (2002).
- [79] F. Luderer and U. Walschus. "Immobilization of Oligonucleotides for Biochemical Sensing by Self-Assembled Monolayers : Thiol-Organic Bonding on Gold and Silanization on Silica Surfaces". *Top. Curr. Chem.*, **vol. 260** :page 37, (2005).
- [80] K. S. Birdi. "*Self-assembly monolayer (SAM) structures of lipids and macromolecules*". Kluwer Academic, New York, United States, (1999).
- [81] T. M. Herne and M. J. Tarlov. "Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces". *J. Am. Chem. Soc.*, **vol. 119** :page 8916, (1997).
- [82] J. Sajiv. "Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces". *J. Am. Chem. Soc.*, **vol. 102** :page 92, (1980).

- [83] M. Hu, S. Noda, T. Okubo, Y. Yamaguchi, and H. Komiyama. " Structure and morphology of self-assembled 3-mercaptopropyltrimethoxysilane layers on silicon oxide". *Applied Surface Science*, **vol. 181** :page 307, (2001).
- [84] J. J. Cras, C. A. Rowe-Taitt, D. A. Nivens, and F. S. Ligler. " Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization". *Biosensors Bioelectronics*, **vol. 14** :page 683, (1999).
- [85] E. Vandenberg, H. Elwing, A. Askendal, and I. Lundström. " Protein immobilization of 3-aminopropyl triethoxy silane/glutaraldehyde surfaces : Characterization by detergent washing". *Journal of Colloid and Interface Science*, **vol. 143** :page 327, (1991).
- [86] G.T. Hermanson. " *Bioconjugate techniques*". Academic Press, San Diego, United States, (1996).
- [87] M. Lee and P. M. Fauchet. " Two-dimensional silicon photonic crystal based biosensing platform for protein detection". *Optics Express*, **vol. 15**(8) :page 4530, (2007).
- [88] K. L. Klingman, E. M. Jansen, and T. F. Murphy. " Nearest neighbor analysis of outer membrane proteins of nontypeable haemophilus influenzae". *Infection and immunity*, **vol. 56**(12) :page 3058, (1988).
- [89] V. Le Berre, E. Trevisiol, A. Dagkessamanskaia, S. Sokol, A. M. Caminade, J. P. Majoral, B. Meunier, and J. François. " Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis". *Nucleic Acids Research*, **vol. 31**(16), (2003).
- [90] F. J. Schmitta, L. Häusslingb, H. Ringsdorf, and W. Knoll. " Surface plasmon studies of specific recognition reactions at self-assembled monolayers on gold". *Thin Solid Films*, **vol. 210-211** :page 815, (1992).
- [91] J. S. Shumaker-Parry, M. H. Zareie, R. Aebersold, and C. T. Campbell. " Microspotting Streptavidin and Double-Stranded DNA Arrays on Gold for High-Throughput Studies of Protein-DNA Interactions by Surface Plasmon Resonance Microscopy". *Anal. Chem.*, **vol. 76** :page 918, (2004).
- [92] J. D. H. Glenn and E. F. Bowden. " Diffusionless electrochemistry of cytochrome b5 adsorbed on a multilayer film electrode". *Chemistry Letters*, **vol. 25**(5) :page 399, (1996).
- [93] A. Jane, R. Dronov, A. Hodges, and N. H. Voelcker. "Porous silicon biosensors on the advance". *Trends in Biotechnology*, **vol. 27**(4) :page 230, (2009).
- [94] N. Chaniotakis and N. Sofikiti. "Novel semiconductor materials for the development of chemical sensors and biosensors : a review". *Anal. Chim. Acta*, **vol. 615** :page 1, (2008).
- [95] L. T. Canham. "Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution". *Appl. Phys. Lett.*, **vol. 57** :page 1046, (1990).
- [96] L. T. Canham and A. G. Cullis. "Visible light emission due to quantum size effects in highly porous crystalline silicon". *Nature*, **vol. 353** :page 335, (1991).

- [97] A. Halimaoui. "Determination of the specific surface area of porous silicon from its etch rate in HF solutions". *Surface Science Letters*, **vol. 306** :page L550, (1994).
- [98] A. Angelescu, I. Kleps, M. Mihaela, M. Simion, T. Neghina, S. Petrescu, N. Moldovan, C. Paduraru, and A. Raducanu. "Porous Silicon Matrix for Applications in Biology". *Rev. Adv. Mater. Sci*, **vol. 5** :page 440, (2003).
- [99] A. Uhler. "Electrolytic shaping of germanium and silicon". *Bell Syst. Tech. J.*, **vol. 35** :page 333, (1956).
- [100] D. R. Turner. "Electropolishing silicon in hydrofluoric acid solutions". *J. Electrochem. Soc.*, **vol. 105** :page 402, (1958).
- [101] Y. Watanabe and T. Sakai. "Application of a thick anode film to semiconductor devices". *Rev. Elec. Commun. Lab.*, **vol. 19** :page 899, (1971).
- [102] M. J. J. Theunissen. "Etch channel formation during anodic dissolution of n-type silicon in aqueous hydrofluoric acid". *J. Electrochem. Soc.*, **vol. 119** :page 351, (1972).
- [103] V. Lehmann and U. Gösele. "Porous silicon formation : a quantum wire effect". *Phys. Lett.*, **vol. 58** :page 856, (1991).
- [104] R. L. Smith and S. D. Collinsa. "Porous silicon formation mechanisms". *J. Appl. Phys.*, **vol. 71** :page R1, (1992).
- [105] D. N. Goryachev, L. V. Belyakov, and O. M. Sreseli. "On the Mechanism of Porous Silicon Formation". *Semiconductors*, **vol. 34** :page 1090, (2000).
- [106] E. Mery. "*Intégration du silicium poreux dans des microsystèmes fluidiques : application aux laboratoires sur puce*". PhD thesis, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, (2006).
- [107] L. Canham. "*Pore type shape, size, volume and surface area. In L Canham, editor, Porous silicon in Properties of Porous Silicon, page 84*". Institution of Engineering and Technology, London, (1997).
- [108] V. Lehmann, R. Stengl, and A. Luigart. "On the morphology and the electrochemical formation mechanism of mesoporous silicon". *Materials Science and Engineering B*, **vol. 6970** :page 11, (2000).
- [109] H. Ouyang and P. M. Fauchet. "Biosensing using porous silicon photonic bandgap structures". *Proc. SPIE 6005*, **vol. 6970** :page 600508–1, (2005).
- [110] A.G. Cullis and N.J. Long. "*Microscopy of semi-conducting materials*". Institute of Physics, Bristol, Angland, (1991).
- [111] Y. Nakamura K. Takemoto and O. Nittono. "Microstructure and Crystallinity of N-Type Porous Silicon". *Jpn. J. Appl. Phys.*, **vol. 33** :page 6432, (1994).
- [112] M. I. J. Beale, N. G. Chew, M. J. Uren, A. G. Cullis, and J. D. Benjamin. "Microstructure and formation mechanism of porous silicon". *Appl. Phys. Lett.*, **vol. 46** :page 86, (1985).

- [113] G. Bomchil, R. Herino, K. Barla, and J. C. Pfister. "Pore size distribution in porous silicon studied by adsorption isotherms". *J. Electrochem. Soc.*, **vol. 130** :page 1611, (1983).
- [114] G. Dolino, D. Bellet, and C. Faivre. "Adsorption strains in porous silicon". *Phys. Rev.*, **vol. 54** :page 17919, (1996).
- [115] A. I. Mamykin, A. Y. Il'in and V. A. Moshnikov, A. A. Mamykin, A. I. Pershin, and N. E. Mokrousov. "Nuclear magnetic resonance investigation of the surface structure of porous silicon". *Semiconductors*, **vol. 29** :page 979, (1995).
- [116] C. Faivre, D. Bellet, and G. Dolino. "Investigation of phase transitions of organic fluids confined in porous silicon". *Thin Solid Films*, **vol. 297** :page 68, (1997).
- [117] A. Janshoff, K. P. S. Dancil, C. Steinem, D. P. Greiner, V. S.-Y. Lin, C. Gurtner, K. Mote-sharei, M. J. Sailor, and M. R. Ghadiri. "Macroporous p-type silicon fabry-perot layers. Fabrication, characterization, and applications in biosensing". *J. Am. Chem. Soc.*, **vol. 120** :page 12108, (1998).
- [118] O. Worsfold, N. H. Voelcker, and T. Nishiya. "Biosensing Using Lipid Bilayers Suspended on Porous Silicon". *Langmuir*, **vol. 22** :page 7078, (2006).
- [119] A. G. Cullis, L. T. Canham, and O. D. Dosser. "Porosity determinations in buried and surface layers of porous silicon". *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, **vol. 256** :page 7, (1992).
- [120] D. Brumhead, L. T. Canham, D. M. Seekings, and P. J. Tufton. "Gravimetric analysis of pore nucleation and propagation in anodised silicon". *Electrochimica Acta*, **vol. 38** :page 191, (1993).
- [121] S. Lazarouk, P. Jaguiro, S. Katsouba, G. Maiello, S. La Monica, G. Masini, E. Proverbio, and A. Ferrari. "Visual determination of thickness and porosity of porous silicon layers". *Thin Solid Films*, **vol. 297** :page 97, (1997).
- [122] C. Pickeringa, L. T. Canhama, and D. Brumhead. "Spectroscopic ellipsometry characterisation of light-emitting porous silicon structures". *Applied Surface Science*, **vol. 63** :page 22, (1993).
- [123] V. V. Ratnikov. "Determining the porosity of synthetic opals and porous silicon by x-ray methods". *Phys. Solid State*, **vol. 39** :page L550, (1997).
- [124] J. L. Cantina, M. Schoisswohla, A. Grosmana, S. Lebiba, C. Ortegaa, H. J. von Berdelebena, É. Vázsonyib, G. Jalsovszkyc, and J. Erostyák. "Anodic oxidation of p- and p+-type porous silicon : surface structural transformations and oxide formation". *Thin Solid Films*, **vol. 276** :page 76, (1996).
- [125] J. M. Buriak. "Organometallic Chemistry on Silicon and Germanium Surfaces". *Chemical Reviews*, **vol. 102** :page 1271, (2002).

- [126] F. Cunin, J. M. Devoisselle, and M. J. SAILOR. "Microparticules « intelligentes » de silicium poreux pour la détection d'agents chimiques et biologiques ". *Technique de l'ingénieur*, vol. **RE49** :page 1, (2006).
- [127] R.S. Muller R.C. Anderson and C.W. Tobias. "Investigations of porous silicon for vapor sensing". *Sens. Actuators A*, vol. **2123** :page 835, (1990).
- [128] V. V. Doan and M. J. Sailor. "Luminescent Color Image Generation on Porous Silicon". *Science*, vol. **256** :page 1791, (1992).
- [129] V. S. Y. Lin, K. Motesharei, K. P. S. Dancil, M. J. Sailor, and M. R. Ghadiri. "A porous silicon-based optical interferometric biosensor". *Science*, vol. **278** :page 840, (1997).
- [130] M. P. Schwartz<sup>1</sup>, C. Yu, S. D. Alvarez, B. Migliori, D. Godin, L. Chao, and M. J. Sailor. "Using an oxidized porous silicon interferometer for determination of relative protein binding affinity through non-covalent capture probe immobilization". *Physica Status Solidi (A)*, vol. **204** :page 1444, (2007).
- [131] C. Xiao, R. Boukherroub, J. T. C. Wojtyk, D. D. M. Wayner, and J. H. T. Luong. "Structure characterization of porous silicon layers based on a theoretical analysis". *Langmuir*, vol. **18** :page 4165, (2002).
- [132] C. Steinem, A. Janshoff, V. S.-Y. Lin, N. H. Völcker, and M. R. Ghadiri. "DNA hybridization-enhanced porous silicon corrosion : mechanistic investigations and prospect for optical interferometric biosensing". *Tetrahedron*, vol. **60** :page 11259, (2004).
- [133] N. H. Voelcker, I. Alfonso, and M. R. Ghadiri. "Catalyzed oxidative corrosion of porous silicon used as an optical transducer for ligand-receptor interactions". *ChemBioChem*, vol. **9** :page 1776, (2008).
- [134] A. O. Jane, E. J. Szili, J. H. Reed, T. P. Gordon, and N. H. Voelcker. "Porous silicon biosensor for the detection of autoimmune diseases". *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, vol. **6799** :page 679908, (2007).
- [135] M. G. Berger, C. Dieker, M. Thonissen, L. Vescan, H. Luth, H. Munder, W. Theiss, M. Wernke, and P. Grosse. "Porous superlattices : a new class of Si heterostructures". *J. Phys. D Appl. Phys.*, vol. **27** :page 13333, (1994).
- [136] G. Vincent. "Optical properties of porous silicon superlattices". *Appl. Phys. Lett.*, vol. **64** :page 2367, (1994).
- [137] C. Pacholski, M. Sartor, M. J. Sailor, F. Cunin, and G. M. Miskelly. "Biosensing using porous silicon double-layer interferometers : reflective interferometric Fourier transform spectroscopy". *J. Am. Chem. Soc.*, vol. **127** :page 11636, (2005).
- [138] M. Qian, X.Q. Bao, L.W. Wang, X. Lu, J. Shao, and X.S. Chen. "Structural tailoring of multilayer porous silicon for photonic crystal application". *J. Cryst. Growth*, vol. **292** :page 347, (2006).

- [139] L. Pavesi and P. Dubos. "Random porous silicon multilayers : Application to distributed bragg reflectors and interferential fabry-perot filters". *Semicond. Sci. Technol.*, **vol. 12** :page 570, (1997).
- [140] E. Guillermain, V. Lysenko, R. Orobtschouk, T. Benyattou, S. Roux, A. Pillonnet, , and P. Perriat. "Bragg surface wave device based on porous silicon and its application for sensing". *Appl. Phys. Lett.*, **vol. 90** :page 241116, (2007).
- [141] M. M. Orosco, C. Pacholski, G. M. Miskelly, and M. J. Sailor. "Protein-coated porous-silicon photonic crystals for amplified optical detection of protease activity". *Adv. Mater.*, **vol. 18** :page 1393, (2006).
- [142] K. A. Kilian, T. Böcking, K. Gaus, M. Gal, and J. J. Gooding. "Peptide-modified optical filters for detecting protease activity". *ACS Nano*, **vol. 1** :page 255, (2007).
- [143] L. Pavesi. "Porous silicon dielectric multilayers and microcavities". *Rivista del Nuovo Cimento*, **vol. 20** :page 1, (1997).
- [144] M. A. Anderson, A. Tinsley-Bown, P. Allcock, E. A. Perkins, P. Snow, M. Hollings, R. G. Smith, C. Reeves, D. J. Squirrell, S. Nicklin, and T. I. Cox. "Sensitivity of the optical properties of porous silicon layers to the refractive index of liquid in the pores". *Phys. Status Solidi, A Appl. Res.*, **vol. 197** :page 528, (2003).
- [145] L.M. Bonanno and L.A. DeLouise. "Whole blood optical biosensor". *Biosens. Bioelectron.*, **vol. 23** :page 444, (2007).
- [146] H. Ouyang, L. A. DeLouise, B. L. Miller, and P. M. Fauchet. "Label-free quantitative detection of protein using macroporous silicon photonic bandgap biosensors". *Anal. Chem.*, **vol. 79** :page 1502, (2007).
- [147] C. Moussard. "*Biologie moléculaire biochimie des communications cellulaires*". De Boek, Paris, France, (2005).
- [148] R. H. Unger, A. M. Eisentraut, M. S. McCall, and L. L. Madison. "Glucagon antibodies and an immunoassay for glucagon". *J Clin Invest*, **vol. 40** :page 1280, (1961).
- [149] V. Chamard, G. Dolino, and F. Muller. "Origin of a parasitic surface film on p1 type porous silicon". *J. Appl. Phys.*, **vol. 84** :page 6659, (1998).
- [150] H. Ouyang, M. Christophersen, R. Viard, B. L. Miller, and P. M. Fauchet. "Macroporous silicon microcavities for macromolecule detection". *Adv. Funct. Mater.*, **vol. 15** :page 1851, (2005).
- [151] Y. Watanabe, Y. Arita, T. Yokoyama, and Y. Igarashi. "Formation and Properties of Porous Silicon and Its Application". *J. Electrochem. Soc.*, **vol. 122** :page 1351, (1975).
- [152] T. Unagami. "Formation Mechanism of Porous Silicon Layer by Anodization in HF Solution". *J. Electrochem. Soc.*, **vol. 127** :page 476, (1980).

- [153] W. Theiß and S. Hilbrich. "Refractive index of porous silicon. In L. Canham, editor, *Porous silicon in Properties of Porous Silicon*, page 223". Institution of Engineering and Technology, London, (1997).
- [154] C. Pena and J. Torres. "Calculation of optical constants in porous silicon thin films using diffused and specular reflectance measurement". *Surface Review and Letters*, **vol. 9** :page 1821, (2002).
- [155] D. S. Bethune. "Optical harmonic generation and mixing in multilayer media : analysis using optical transfer matrix techniques". *J. Opt. Soc. Am.*, **vol. 6** :page 910, (1989).
- [156] D. A. G. Bruggeman. "Berechnung verschiedene physikalischer konstanten von heterogenen substanzen". *Ann. Phys.*, **vol. 5** :page 636, (1935).
- [157] H. Boulehdid. "*Elaboration et caractérisation d'une membrane cationique monosélective par modification chimique d'un film ETFE*". PhD thesis, Université libre de Bruxelles, (2008).
- [158] N. Lorrain, J. Barrault, Y. Dumeige, and M. Dribek. "*Note technique : Simulation de spectres de réflectances par la méthode des matrices de transfert de structures en monocouches ou multicouches (microcavités)*". GMNP-FOTON, Lannion, France, (2010).
- [159] E. V. Astrova, V. B. Voronkov, A. D. Remenyuk, and V. B. Shuman. "Variation of the parameters and composition of thin films of porous silicon as a result of oxidation : Ellipsometric studies". *Semiconductors*, **vol. 33** :page 1149, (1999).
- [160] M. H. Leea, D. A. Brass, R. Morrissa, R. J. Compostoa, and P. Ducheyne. "The effect of non-specific interactions on cellular adhesion using model surfaces". *Biomaterials*, **vol. 26** :page 1721, (2005).
- [161] L. G. Woolford. "A Grignard Condensation of Glutaraldehyde". *The Journal of Organic Chemistry*, **vol. 23** :page 2042, (1958).
- [162] Y. Kim, M. Hong, H. K. Shon, W. Chegal, H. M. Cho, D. W. Moon, H. Kim, and T. G. Lee. "Protein quantification on dendrimer-activated surfaces by using time-of-flight secondary ion mass spectrometry and principal component regression". *Applied Surface Science*, **vol. 255** :page 1110, (2008).
- [163] D. G. Kurth and T. Bein. "Thin Films of (3-Aminopropyl)triethoxysilane on Aluminum Oxide and Gold Substrates". *Langmuir*, **vol. 11** :page 3061, (1995).
- [164] B. Xia, S. J. Xiao, D. J. Guo, J. Wang, J. Chao, H. B. Liu, J. Pei, Y. Q. Chen, Y. C. Tang, and J. N. Liu. "Biofunctionalisation of porous silicon (PS) surfaces by using homobifunctional cross-linkers". *J. Mater. Chem.*, **vol. 16** :page 570, (2006).
- [165] R. Liu, T. A. Schmedake, Y. Y. Li, M. J. Sailor, and Y. Fainman. "Novel porous silicon vapor sensor based on polarization interferometry". *Sensors and Actuators B*, **vol. 87** :page 58, (2002).

- 
- [166] T. Watanabe, Y. Okawa, H. Tsuzuki, S. Yoshida, and Y. Nihe. "Glucose Oxidase-Modified SnO<sub>2</sub> Electrode as Electrochemical Glucose Sensor". *Chemistry Letters*, **vol. 17** :page 1183, (1988).
- [167] M. L. Williamson, D. H. Atha, D. J. Reeder, and P. V. Sundaram. "Anti-T2 monoclonal antibody immobilization on quartz fibers : stability and recognition of T2 mycotoxin". *Analytical Letters*, **vol. 22** :page 803, (1989).
- [168] M. Masoom and A. Townshend. "Cyclic regeneration of nicotinamide adenine dinucleotide with immobilized enzymes : Flow-injection spectrofluorimetric determination of ethanol". *Anal. Chim. Acta*, **vol. 185** :page 49, (1986).
- [169] G. J. Moody, G. S. Sanghera, and J. D. R. Thomas. "Modified platinum wire glucose oxidase amperometric electrode". *Analyst*, **vol. 111** :page 1235, (1986).
- [170] J. L. Koenig H. Ishida. "A fourier-transform infrared spectroscopic study of the hydrolytic stability of silane coupling agents on E-glass fibers". *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, **vol. 18** :page 1931, (1980).
- [171] E. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing, and I. Lundström. "Structure of 3-aminopropyl triethoxy silane on silicon oxide". *Journal of Colloid and Interface Science*, **vol. 147** :page 103, (1991).
- [172] K.C. Vranckena, P. Van Der Voorta, K. Possemiersa, and E.F. Vansant. "Surface and structural properties of silica gel in the modification with gamma-aminopropyltriethoxysilane". *Journal of Colloid and Interface Science*, **vol. 174** :page 86, (1995).
- [173] A. W. Flounders, D. L. Brandon, and A. H. Bates. "Immobilization of thiabendazole-specific monoclonal antibodies to silicon substrates via aqueous silanization". *Applied biochemistry and biotechnology*, **vol. 50** :page 265, (1995).
- [174] H. Ouyang, L. A. DeLouise, M. Christophersen, B. L. Miller, and P. M. Fauchet. "Bio-sensing with one-dimensional photonic bandgap structure". *Proc. SPIE*, **vol. 5511** :page 71, (2004).
- [175] R. A. Williams and H. W. Blanch. "Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications". *Biosensors Bioelectronics*, **vol. 9** :page 159, (1994).
- [176] P. Esser. "Principles in adsorption to polystyrene". *Nuc. Bull.*, (**no. 6**) :page 3, (1988).
- [177] S. Ben Rejeb, M. Tatouliau, F. A. Khonsari, N. F. Durand, A. Martel, J. F. Lawrence, J. Amouroux, and F. Le Goffic. "Functionalization of nitrocellulose membranes using ammonia plasma for the covalent attachment of antibodies for use in membrane-based immunoassays". *Analytica Chimica Acta*, **vol. 376** :page 133, (1998).
- [178] G. Fleminger, B. Solomon, T. Wolf, and E. Hadas. "Single step oxidative binding of antibodies to hydrazide-modified Eupergit C". *Appl Biochem Biotechnol*, **vol. 26** :page 123, (1990).



---

**VU :**

**Le Directeur de thèse**

**VU :**

**Le Responsable de l'École Doctorale**

**VU pour autorisation de soutenance**

**Rennes, le**

**Le Président de l'Université de Rennes 1**

**Guy Cathelineau**

**VU après soutenance pour autorisation de publication :**

**Le Président de Jury,**