



HAL
open science

Optimisation d'un microcapteur GaAs à ondes acoustiques et de sa biointerface pour la détection de pathogènes en milieu liquide

Vivien Lacour

► **To cite this version:**

Vivien Lacour. Optimisation d'un microcapteur GaAs à ondes acoustiques et de sa biointerface pour la détection de pathogènes en milieu liquide. Acoustique [physics.class-ph]. Université de Franche-Comté; Université de Sherbrooke (Québec, Canada), 2016. Français. NNT : 2016BESA2037 . tel-01513048

HAL Id: tel-01513048

<https://theses.hal.science/tel-01513048>

Submitted on 24 Apr 2017

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.

THÈSE EN COTUTELLE

Présentée

à L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ
spécialité Sciences pour l'Ingénieur et Microtechniques

à L'UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE
pour obtenir le titre de
PHILOSOPHIÆ DOCTOR (Ph. D.) DE L'UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE
spécialité Génie Électrique

Par

Vivien LACOUR

OPTIMISATION D'UN MICROCAPTEUR GAAS A ONDES ACOUSTIQUES ET DE SA BIOINTERFACE POUR LA DETECTION DE PATHOGENES EN MILIEU LIQUIDE

Soutenue publiquement le 9 décembre 2016 devant la commission d'examen :

Corinne DEJOURS	Professeur à l'Université de Bordeaux 1	Présidente du jury
Jean-Pierre CLOAREC	Professeur à l'École Centrale de Lyon	Rapporteur
Stéphane DURAND	Maître de Conférences HDR à l'Université du Maine	Rapporteur
Eric H. FROST	Professeur à l'Université de Sherbrooke (Canada)	Rapporteur
Farid BENSEBAA	Agent de Recherche au NRCC (<i>National Research Council of Canada</i>)	Examineur
Céline ELIE-CAILLE	Maître de Conférences à l'Université de Franche-Comté	Co-encadrante
Jan J. DUBOWSKI	Professeur à l'Université de Sherbrooke (Canada)	Co-directeur
Thérèse LEBLOIS	Professeur à l'Université de Franche-Comté	Co-directrice

REMERCIEMENTS

Une thèse est bien plus qu'un travail personnel, c'est aussi le fruit d'une aventure collective. Ce projet en cotutelle réalisé entre deux établissements, de deux pays différents, a impliqué de nombreuses personnes qui ont participées, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail. Je souhaite avant tout remercier mes encadrants : Thérèse, Jan et Céline, pour la rigueur scientifique dont ils font preuve, leurs qualités humaines et pour m'avoir toujours soutenu dans les moments les plus difficiles (et ils ont été nombreux... particulièrement en fin de thèse). Je leur suis reconnaissant de tous les conseils judicieux et les remarques pertinentes prodigués au cours de ces quatre intenses années de recherche.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur Jean-Pierre Cloarec, professeur à l'Ecole Centrale de Lyon, Monsieur Eric Frost, professeur à l'Université de Sherbrooke et Monsieur Stéphane Durand, maître de conférences à l'Université du Maine qui ont accepté d'être rapporteurs et d'avoir bien voulu porter un regard critique sur mes résultats. Je remercie également Madame Corinne Dejous et Monsieur Farid Bensebaa de faire partie du jury et de s'être rendus disponibles pour assister à ma soutenance.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel de l'Institut FEMTO-ST, plus particulièrement le département MN2S et son directeur, Wilfrid Boireau, ainsi que l'équipe Bio Micro Device que j'ai intégré dans les premières années de sa création. J'ai apprécié les moments passés avec Franck, Annie, Jean-François, Alain, Audrey et Clélia et je souhaite que leur aventure dure encore de nombreuses années. Merci à Jean-François en particulier pour ses nombreuses suggestions et son aide dans l'utilisation du vibromètre et des analyseurs de réseau. Merci à tous les thésards, ex-thésards et stagiaires de l'équipe pour leur bonne humeur quotidienne, nos conversations scientifiques passionnées (cela arrivait de temps à autre...) ou pour leur contribution à ce travail. Je pense notamment à Sameh, Charles-Louis, Juliana, Fabien, Boris, Julien et Naïm, et souhaite bon courage à ceux qui continuent l'aventure. Je n'oublie pas, évidemment, de remercier les deux tourtereaux et anciens colocataires de bureau au LPMO, Alexia et Guillaume pour votre bonne humeur quotidienne ainsi que Simon, le chimisto-punk Sherbrookoïse, qui m'a offert de précieux conseils et contacts avant mon départ au Canada.

Mes remerciements s'adressent, de la même façon, à toutes les personnes que j'ai pu cotoyer à l'Institut Interdisciplinaire d'Innovation Technologique (3IT) à Sherbrooke, notamment à l'ensemble des collègues du Laboratoire de Semi-conducteurs Quantiques et Bio-nanotechnologies Photoniques dans lequel j'ai été accueilli chaleureusement pendant près de deux années. Je voudrais remercier Khalid and Walid pour leur aide dans les domaines respectifs des lasers et de la biologie. *Many thanks to all my fellow PhD and postdoc colleagues, Srivatsa, Reza, Elnaz, Romain, Neng, Lilian and Hemant for the numerous and fruitful discussions and for all friendly moments we spent together.* Je remercie également l'Unité mixte internationale LN2 (Laboratoire Nanotechnologies & Nanosystèmes), son directeur actuel, Michael Canva, son prédécesseur, Vincent Aimez, pour leur participation au financement de l'un de mes séjours Canadien. Ils ont également permis de débloquer de nombreuses situations administratives complexes inhérentes à la cotutelle.

Bien évidemment, ces travaux n'auraient pas pu être réalisés sans l'aide et les précieux conseils des staffs techniques du Laboratoire de Nanofabrication et Nanocaractérisation (LNN) et du Laboratoire de Caractérisation et de Synthèse des Matériaux (LCSM) côté Québécois, et de la centrale MIMENTO côté Français. Un grand merci, en particulier, à Marie-Josée du LNN pour sa contribution aux techniques de gravure plasma et à Laurent de MIMENTO pour ses formations et ses conseils concernant le travail en salle blanche. Je remercie le laboratoire de Patrick Ayotte à Sherbrooke qui m'a permis de découvrir le FTIR avant que mon laboratoire Québécois ne s'en procure un. Je tiens à remercier Sarah et Guillaume pour leur aide dans l'interprétation de mes résultats sur cet instrument.

Merci à Sarah qui a partagé une partie de ma vie au Canada, qui a été un soutien sans faille et aujourd'hui une amie de cœur. Merci à mes autres colocataires du 913 BS et amis rencontrés à Sherbrooke, Thomas, Hugo, Christelle, Céline, Valérie, Bertrand, Loïc, Léo et Laure qui m'ont fait découvrir la culture québécoise et avec lesquels je garderai à coup sûr le contact. Merci aussi à mes amis de longue date, Célia, Alice, Émilie, Max, Thomas et Jean-Noël pour tous les agréables moments passés ensemble bien que vous n'ayez pas toujours saisi l'intérêt de mes recherches. Un grand merci à Barbara, ma compagne, de m'avoir supporté au quotidien, d'avoir relu mon manuscrit et de m'avoir encouragé dans les moments les plus difficiles de cette fin de thèse.

Enfin, mes dernières pensées se tournent vers mes parents et ma famille que je remercie pour leurs encouragements et leur soutien. J'espère que vous garderez de bons souvenirs de votre séjour au Canada. Merci pour tout.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	i
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xix
LISTE DES ACRONYMES.....	xxi
INTRODUCTION GENERALE.....	xxv
CHAPITRE 1 État de l'art et positionnement du biocapteur en Arséniure de Gallium ..	1
1.1 Contexte général	1
1.2 Les biocapteurs.....	4
1.2.1 Définition	4
1.2.2 Étude de développement des biocapteurs dans le monde	5
1.2.3 Un bref historique des biocapteurs	6
1.3 Transduction acoustique : positionnement	7
1.3.1 Classification des transducteurs.....	7
1.3.2 Dispositifs de détection à ondes acoustiques.....	9
1.3.3 Comparaison des dispositifs acoustiques.....	15
1.4 L'Arséniure de Gallium comme matériau piézoélectrique.....	17
1.4.1 Les propriétés de l'Arséniure de Gallium.....	17
1.4.2 Quelques exemples de biocapteurs à base d'Arséniure de Gallium	18
1.5 Interface de reconnaissance biologique.....	19
1.5.1 Classification des biorécepteurs.....	19
1.5.2 Techniques d'immobilisation	21
1.5.3 Stratégie de biorecognition	24
1.6 Biofonctionnalisation de l'Arséniure de Gallium.....	25
1.6.1 Les monocouches auto-assemblées.....	25
1.6.2 Formation de SAMs d'alkanethiols sur Arséniure de Gallium.....	27
1.6.3 Stratégie d'immobilisation.....	28
1.6.4 Immobilisation des anticorps	31
1.7 Techniques de régénération	32
1.7.1 Désorption de SAM d'alkanethiols.....	33
1.7.2 Ré-initialisation des biorécepteurs.....	35

1.7.3	Architecture auto-régénérable	37
1.7.4	Stratégie employée sur GaAs	37
CHAPITRE 2	Modélisation et microfabrication du transducteur GaAs	39
2.1	Introduction	39
2.2	Modélisation.....	40
2.2.1	Relations fondamentales dans un cristal piézoélectrique	40
2.2.2	Propagation des ondes de volume	44
2.2.3	Modèle électrique du résonateur.....	51
2.2.4	Modèle éléments finis.....	56
2.3	Conception et structure du capteur.....	60
2.4	Réalisation des membranes résonantes	62
2.4.1	Stratégie de microfabrication.....	62
2.4.2	Préparation des wafers.....	64
2.4.3	Usinage par gravure humide.....	65
2.4.4	Usinage par gravure plasma	75
2.4.5	Dépôt des électrodes	83
2.5	Réalisation d'une interface fluidique	86
2.5.1	Stratégie de réalisation d'une interface fluidique	86
2.5.2	Interface intégrée sur le GaAs	87
2.5.3	Structures fluidiques rapportées par film sec	88
2.6	Conclusion.....	94
CHAPITRE 3	Fonctionnalisation chimique et biochimique de l'interface de GaAs : caractérisations et optimisations.....	97
3.1	Introduction	97
3.2	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	98
3.2.1	Principe de fonctionnement	98
3.2.2	Techniques de mesures.....	100
3.3	Caractérisation infrarouge de SAM ou biointerface sur GaAs	102
3.3.1	Techniques employées et post-processing.....	102
3.3.2	Montages expérimentaux et méthodologie de mesure	105
3.4	Préparation de SAM sur GaAs	110
3.4.1	Protocole de formation de SAM.....	110
3.4.2	Tension de surface des SAMs	112
3.5	Spectres IR de référence.....	114

3.6	Formation et cinétique d'adsorption d'architectures mixtes de thiols sur GaAs....	117
3.6.1	Adsorption mixte simultanée	117
3.6.2	Cinétique d'adsorption.....	121
3.6.3	Formation de SAMs mixtes par remplacement de thiols.....	123
3.7	Optimisation et densification de SAM	126
3.7.1	Densification sur monocouches simples.....	126
3.7.2	Densification sur monocouches mixtes	130
3.8	Immobilisation des récepteurs immunologiques	132
3.8.1	Analyse de la cinétique de greffage des anticorps par FTIR	132
3.8.2	Caractérisation du greffage de l'anticorps avec différentes architectures de SAM par FTIR.....	134
3.8.3	Caractérisation du greffage avec différentes architectures de SAM par spectroscopie à décharge lumineuse	136
3.9	Conclusion.....	138
CHAPITRE 4 Régénération de la biointerface.....		141
4.1	Introduction	141
4.2	Matériel et méthode de caractérisation de surface.....	142
4.2.1	Microscopie à force atomique.....	142
4.2.2	Spectrométrie photoélectronique X	143
4.2.3	Microscopie à fluorescence	145
4.2.4	Ellipsométrie	145
4.2.5	Profilométrie	146
4.3	Régénération par voie chimique	147
4.3.1	Études des chimies de désorption	147
4.3.2	Efficacité de la régénération de la biointerface.....	150
4.4	Photo-oxydation UV : principe et stratégies.....	153
4.4.1	Principe de la photo-oxydation	153
4.4.2	Stratégie de régénération UV	156
4.4.3	Méthodologie de mesure des surfaces photo-oxydées.....	158
4.5	Photo-oxydation UV : Régénération de surface par laser KrF.....	160
4.5.1	Montage et protocole de régénération par laser KrF	160
4.5.2	Photo-oxydation du GaAs avec le laser KrF	164
4.5.3	Mesures XPS de la désorption de la SAM.....	166

4.5.4	Influence de la densité d'énergie, du nombre d'impulsions et de l'environnement d'exposition.....	171
4.5.5	Cycle de régénération	175
4.6	Photo-oxydation UV : Patterning de surface.....	176
4.7	Conclusion.....	179
CHAPITRE 5 Tests du capteur acoustique en GaAs		181
5.1	Introduction	181
5.2	Montages expérimentaux	181
5.2.1	Mesures à l'analyseur d'impédance	181
5.2.2	Mesures vibrométriques	184
5.2.3	Mesures en milieu liquide.....	185
5.3	Caractérisation électrique et vibroacoustique du résonateur.....	186
5.3.1	Séries de transducteurs fabriquées.....	186
5.3.2	Tests des résonateurs pour différentes épaisseurs de membrane.....	187
5.3.3	Impact de la géométrie des électrodes	190
5.3.4	Caractérisation des composantes hors plan à l'aide du vibromètre.....	192
5.4	Caractérisation du résonateur dans des milieux variés.....	193
5.4.1	Déviations en température.....	193
5.4.2	Impact du support sous le résonateur et considération électrique	195
5.4.3	Impact des propriétés mécaniques et électriques d'un liquide en contact avec le GaAs.....	197
5.5	Perspectives pour la détection de bactéries	199
5.6	Conclusion.....	201
CONCLUSION GENERALE.....		203
ANNEXE A – Etat de l'art des temps d'analyse et gammes de mesure pour différentes méthodes de détection de bactéries		207
ANNEXE B – Classification des transducteurs		215
ANNEXE C – Transducteurs à ondes acoustiques		217
ANNEXE D – Procédé de microfabrication des dispositifs à membrane en gravure humide.....		219
ANNEXE E – Procédé de microfabrication des cellules fluidiques par film sec		223
ANNEXE F – Théorie sur la spectroscopie vibrationnelle		225
ANNEXE G – Paramètres majeurs pour la configuration du FTIR.....		227

ANNEXE H – Tableau des assignements des vibrations d’interêt en spectroscopie infrarouge	229
ANNEXE I – Module de conditionnement et d’extraction de bactéries issues des eaux industrielles.....	231
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	235

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : (a) Secteurs d'intérêt pour la détection de pathogènes et (b) organismes pathogènes les plus couramment détectés par les techniques d'analyses actuelles. Adapté de Lazcka et al. ³	1
Figure 1.2 : Limite de détection (CFU/mL) versus durée d'analyse (h) pour différentes techniques de détection de pathogènes. L'ensemble des références utilisées dans ce graphique a été répertorié dans le tableau de l'annexe A. Les groupements correspondent aux catégories de détection : biocapteurs électrochimiques (noir), biocapteurs sensibles aux variations de masse ou à des paramètres mécaniques (rouge), biocapteurs optiques (bleu), tests immunologiques (violet), techniques de détection d'acides nucléiques (vert) et culture (orange).....	4
Figure 1.3 Architecture d'un biocapteur	5
Figure 1.4: Evolution du nombre de publications totales et avec le terme « biosensor » dans la base de données Scopus entre 1886 et 2015.....	6
Figure 1.5: Principe de fonctionnement de la technique SPR ²⁷	8
Figure 1.6: Classification des dispositifs à ondes acoustiques	9
Figure 1.7 : Représentation schématique des déplacements au cours de la propagation (a) d'une onde longitudinale et (b) d'une onde transverse (adapté de Bolt et al. ²⁸).....	10
Figure 1.8: Schéma de principe d'une microbalance à cristal de quartz (QCM) ⁴⁴	12
Figure 1.9: Schéma de résonateurs couche mince à ondes de volume (FBAR) ⁴⁵	12
Figure 1.10: Propagation d'une onde de Lamb à déformation symétrique (a) et antisymétrique (b). Graphique représentant les vitesses des différents modes de Lamb en fonction du produit fréquence-épaisseur ²⁹ (c).....	15
Figure 1.11: Classification des biorécepteurs	19
Figure 1.12: Représentation d'un anticorps ⁷⁶	20
Figure 1.13: Méthodes d'immobilisation chimique et physique des biorécepteurs ⁷³	22
Figure 1.14: Schéma représentant la structure d'une monocouche auto-assemblée ⁸⁷	26
Figure 1.15: Architecture de SAM constituée de (a) MHDA/MUDO, (b) MHDA/DDT et (c) thiols PEG-biotin	30
Figure 1.16: Principe d'activation des groupes carboxyle pour la formation d'une liaison amide avec une amine primaire ¹³⁵ et schéma d'une biointerface MHDA/MUDO après activation, immobilisation des anticorps et désactivation des sites actifs restants	32
Figure 2.1: Maille cristalline du GaAs	43
Figure 2.2: Surface des lenteurs dans le plan (100) du GaAs pour les deux modes de cisaillement quasi-transversaux (lent et rapide) et pour le mode longitudinal	46
Figure 2.3: Schémas représentant les différents types d'excitation : a) excitation dans l'épaisseur (TFE), b) excitation par champ latéral (LFE) et c) excitation par champ magnétique (EMAT) ¹⁸⁸	47
Figure 2.4: Changement de repère avec les angles d'Euler	48
Figure 2.5: Schéma d'un résonateur excité par champ électrique latéral avec l'épaisseur de la plaque résonante h, la distance inter-électrode (gap) g, la largeur des électrodes w et la longueur cumulée des électrodes a.	51

Figure 2.6: Schémas du (a) modèle distribué (ligne de transmission) ⁴⁹ et du (b) modèle à éléments localisés (modèle de <i>Butterworth-Van Dyke</i>)	52
Figure 2.7: Modèle à éléments localisés représentant un résonateur LFE en contact avec un liquide dont les propriétés électriques sont modélisées par les composants R_L et C_L ¹⁹⁴	56
Figure 2.8: (a) Modèle de simulation COMSOL® représentant les différents domaines avec leur affectation et (b) représentation du maillage du modèle	57
Figure 2.9: Résultats de simulation : (a et b) courbe de module et de phase de l'impédance pour la fréquence f_0 , (c) déplacement de matière dans la plaque à cette même fréquence d'excitation (d) en vue de coupe et (e) vecteur champs électrique (flèches rouges) et gradient de potentiel (gris) représentés dans la section droite de la plaque résonante.....	58
Figure 2.10: Courbes de déplacement en surface et courbe de phase de l'impédance en fonction de la fréquence sur une gamme 20-125 MHz. Vue en coupe du déplacement pour les 3 premiers modes de cisaillement d'épaisseur.	59
Figure 2.11: Courbes montrant l'influence de la température sur le module d'impédance autour de la résonance pour les valeurs : $T=20, 50, 80, 110^\circ\text{C}$	60
Figure 2.12: Schémas représentant le capteur résonant en GaAs fonctionnalisé en vue de dessus (gauche) et de dessous (droite).	61
Figure 2.13: Schéma de principe chronologique des grandes étapes de fabrication du capteur.....	62
Figure 2.14: Diagramme des processus de fabrication des membranes résonantes (a) en gravure humide double face et (b) en gravure sèche simple face.....	63
Figure 2.15: Montage utilisé pour la gravure humide de wafers 2 ou 3 pouces, avec bain de gravure réfrigéré ($T = 0^\circ\text{C}$) et agitation magnétique.....	68
Figure 2.16: (a) Masques de gravure des membranes et des indicateurs de gravure et (b) représentation de l'ordre des masques par rapport au wafer de GaAs.....	69
Figure 2.17: (a) Représentation des plans du GaAs en fonction de l'orientation du wafer et (b) exemple de gravure humide anisotrope d'un wafer de GaAs ²⁰⁴	71
Figure 2.18: (a) Image MEB d'une coupe de membrane de GaAs usinée par gravure humide et représentations schématiques (b) du profil rentrant et (c) du profil sortant d'une gravure anisotrope du GaAs.....	73
Figure 2.19: Image au microscope (a) d'un trait de découpe usiné chimiquement selon la direction $\langle 0 \bar{1}1 \rangle$ et (b) d'un croisement de deux lignes de découpe.	74
Figure 2.20: Images MEB (a) d'une membrane, (b) d'un défaut formé (bulle d'air) lors d'une gravure, (c) d'un angle de membrane et (d) du zoom sur cet angle.....	74
Figure 2.21: Schéma (a) d'un réacteur de plasma couplé à l'induction ²⁰⁵ et (b) de l'intérieur d'une chambre de gravure plasma ICP ²⁰⁶	76
Figure 2.22: Images MEB de gravures plasma du GaAs avec un masque de SiO_2 et avec le substrat (a-c) collé ou (d-f) non-collé au porte-échantillon.	79
Figure 2.23: Images MEB de gravures plasma du GaAs avec un masque de $\text{SiO}_2 + \text{Ni}$ et avec le substrat collé au porte-échantillon; (a) vue en coupe et (b) zoom sur le flanc de la membrane.....	81
Figure 2.24: Images au microscope optique des défauts de gravure induits par la re-déposition de produit de réaction ou de débris de résine lors du processus de gravure plasma.....	81

Figure 2.25: Mesures profilométriques (a) d'une marche et d'un fond de membrane gravé par plasma, (b) avec ou (c) sans défaut.	82
Figure 2.26: Motifs et masque des contacts électriques et des électrodes.	84
Figure 2.27: Images MEB (a) des électrodes déposées sur une surface usinée (membrane) et (b) agrandissement sur le dépôt de la piste électrique sur le flanc de gravure.	85
Figure 2.28: (a) Schéma d'exposition de résine sur une zone usinée et (b) image au microscope d'un dépôt de Cr/Au en fond de membrane.	85
Figure 2.29: Les 3 différentes stratégies de conception de la cellule fluïdique : cellules fluïdiques intégrées dans le GaAs (a) avec les ouvertures traversantes ou (b) les ouvertures débouchantes sur la face opposée et (c) cellule fluïdique rapportée sur le GaAs.	87
Figure 2.30: Images au microscope de différentes cellules microfluidiques usinées par gravure humide sur la face arrière du transducteur en GaAs.	87
Figure 2.31: (A) Images du remplissage d'une cellule fluïdique, réalisée sur verre, sans (a-b) ou avec guides de phase (c-f) ²²² . (B) Schémas représentant le mécanisme de remplissage d'une cellule comprenant des guides de phase ²²²	89
Figure 2.32: Diagramme du processus de fabrication de la cellule fluïdique par laminage de film sec (Ordyl SY300).	90
Figure 2.33: (a) Schéma de principe de l'usinage ultrasonore et (b) image au microscope d'un trou débouchant réalisé par usinage ultrasonore sur un substrat de verre Borofloat (500µm d'épaisseur) pour réaliser une ouverture fluïdique.	90
Figure 2.34: Images au microscope de films secs (a) sur silicium ou (b-c) sur verre seul ou sur verre avec une couche de d'aluminium (d) sur la face supérieure ou (e-f) sur la face inférieure respectivement avant et après gravure de l'aluminium. L'échantillon (c) a été développé à l'acétone tandis que les autres l'ont été avec la solution BMR.	93
Figure 2.35: Modification apportée sur le schéma du procédé de fabrication de la cellule fluïdique sur verre.	93
Figure 3.1: Montage simplifié d'un FTIR ²²⁴	99
Figure 3.3: Représentation graphique d'une réflexion simple en ATR ²²⁷	101
Figure 3.4: Spectre de transmission du GaAs sur la gamme 1-22µm (adapté de <i>II-VI Infrared</i> ²³³)	103
Figure 3.5: Spectromètre FTIR <i>Vertex 70v</i> et microscope FTIR <i>Hyperion 2000 (Bruker Optics)</i>	104
Figure 3.6: (a) Spectres infrarouges d'un même échantillon après 2 à 20 min de pompage du compartiment de mesure et (b) évolution de l'absorbance de pics correspondants aux éléments atmosphériques CO ₂ et H ₂ O (positions A, B et C du graphe (a)) en fonction du temps de pompage	105
Figure 3.7: Support à échantillon(s) multi-dimension avec tables d'alignement pour analyse FTIR	106
Figure 3.8: (a) Spectres infrarouges d'échantillons de GaAs avec SAM de MHDA mesurés simultanément et (b) transmission/reflexion du faisceau IR entre deux surfaces réfléchissantes	106
Figure 3.9: Système ASC permettant la mesure en série de plusieurs échantillons au FTIR	108
Figure 3.10: Application de contrôle de l'ASC.	109
Figure 3.11: Spectres FTIR mesurés avec et sans l'ASC.	109
Figure 3.12: (a) Support multi-échantillons en Téflon et (b) Protocole standard de fonctionnalisation de substrats GaAs(100)	110

Figure 3.13: Angles de contact statique avec différentes mouillabilités: hydrophile, hydrophobe et superhydrophobe.....	112
Figure 3.14: (a) Angles de contact mesurés sur GaAs désoxydé ou après fonctionnalisation par SAM de MUDO, MHDA, MHDA:DDT (1:1), MHDA:DDT (1:9) et DDT et (b) quelques exemples de goutte.....	113
Figure 3.15: Spectre infrarouge complet du composé MHDA sous forme (a) de poudre et (b) de SAM sur GaAs	114
Figure 3.16: Spectre infrarouge complet du composé MUDO sous forme (a) de poudre et (b) de SAM sur GaAs	116
Figure 3.17: Spectre infrarouge complet des thiols PEG-biotine sous forme (a) de poudre et (b) de SAM sur GaAs	117
Figure 3.18: (a) Absorbance et (b) position des pics $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ des SAMs sur GaAs en fonction de la composition des solutions mixtes $(\text{MHDA})_x:(\text{MUDO})_{1-x}$ (trait plein). Les résultats expérimentaux en absorbance sont comparés aux données publiées par Marshall et al. (trait pointillé) ²³⁷	119
Figure 3.19: (a) Spectres infrarouges des groupes CH_2 et COOH après activation par EDC/NHS pour des SAMs de MHDA et MHDA:MUDO (1:1) sur GaAs (b) absorbance des pics $\nu\text{C}=\text{O}$ et $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ en fonction du ratio MHDA:MUDO en solution	120
Figure 3.20: Spectres de la région des méthylènes pour les SAMs de MHDA, DDT, MHDA:DDT (1:1) et MHDA:DDT (1:9) reconstitués sur GaAs	121
Figure 3.21: (a) Cinétique d'auto-assemblage du MHDA (trait plein), MHDA:MUDO (1:1) (trait pointillé), MHDA:MUDO (1:9) (trait en point-tiret) et MUDO (trait en tiret) sur substrat de GaAs et (b) dérivée des 4 courbes de Langmuir illustrant le temps pour atteindre la saturation pour chaque SAM.....	122
Figure 3.22: (a) Absorbance du pic de CH_2^{as} pour une SAM de MHDA immergée dans une solution éthanoïque de MUDO et (b) Intensité d'absorbance pour les vibrations $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ et νCOOH pour 0h, 6h et 25 h d'immersion.....	124
Figure 3.23: (a) Absorbance du pic de CH_2^{as} pour une SAM de MUDO immergée dans une solution éthanoïque de MHDA et (b) Intensité d'absorbance pour les vibrations $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ et νCOOH pour 0h, 25h et 65h d'immersion.....	125
Figure 3.24: (a) Région νCH_2 du spectre IR des SAMs de MHDA, MUDO and MUDA formées dans l'éthanol ou dans le mélange EtOH:H ₂ O (2:1) et (b) Schéma de principe des phénomènes lors de l'auto-assemblage des différentes monocouches dans l'éthanol et dans le mélange EtOH:H ₂ O	127
Figure 3.25: Absorbance et nombre d'onde des vibrations $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ pour les SAMS constituées (a) de MHDA et (b) de MUDO en fonction du pourcentage d'eau dans la solution de thiols	128
Figure 3.26: (a) Densité optique à $\lambda = 600\text{nm}$ mesurée sur les solutions de thiols avec différents ratios EtOH:H ₂ O et (b) absorbances et positions de la vibration $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ pour des échantillons ré-immérgés en solution de thiols	129
Figure 3.27: (a) Absorbances et (b) positions du pic $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ en fonction du rapport X/1-X des solutions MHDA:MUDO solubilisées dans un mélange EtOH:H ₂ O (2:1).....	131
Figure 3.28: Représentation schématique des proportions MHDA/MUDO dans la SAM en fonction du rapport des composés en solution pour des monocouches préparées dans l'éthanol et dans le mélange EtOH:H ₂ O (2:1)	131

Figure 3.29 Spectre FTIR d'anticorps immobilisés sur une SAM de MHDA sur GaAs(100).....	132
Figure 3.30: Intégrale des bandes méthylène et amide I et II en fonction du temps d'incubation des échantillons de GaAs fonctionnalisés par du MHDA activés dans une solution d'EDC/NHS et immergés dans une solution d'anti- <i>E. coli</i>	133
Figure 3.31: (a) Analyse FTIR du greffage d'anticorps en fonction des différentes architectures (100%, 90%, 50%, 10% MHDA, 100% MUDO et PEG-biotin) et (b) évaluation de l'intégrale des bandes Amide I et II pour chaque architecture.....	135
Figure 3.32: Principe de fonctionnement de la spectroscopie à décharge lumineuse (SDL) avec un exemple appliqué à la caractérisation de couches protéiques	137
Figure 3.33: (a) Profil SDL d'arsenic et de carbone pour un échantillon de GaAs avec des anticorps immobilisés sur une SAM de MHDA et (b) profil de carbone pour des échantillons avec des anticorps immobilisés sur des SAMs de MHDA, MUDO:MHDA (1:1), MUDO:MHDA (9:1) et MUDO	138
Figure 4.1 Principe de la technique d'ellipsométrie	146
Figure 4.2 Spectre infrarouge des échantillons SAMs de MHDA sur GaAs (100). Effet du temps d'immersion dans une solution de peroxyde d'hydrogène	147
Figure 4.3 Efficacité dans le retrait de la SAM de MHDA sur GaAs(100) (visualisé par l'absorbance du pic de CH ₂ ^{as}) en fonction du temps d'immersion dans les différentes solutions	149
Figure 4.4 (a) Schéma montrant la fonctionnalisation puis l'immobilisation d'anticorps, la régénération par gravure humide et la re-thiolation avec une nouvelle SAM de MHDA et (b) spectres FTIR montrant les vibrations en élongation des CH ₂ et des bandes amides aux différentes étapes de la régénération de la biointerface.....	151
Figure 4.5 Exemples d'images AFM de la surface de GaAs(100) (a) initialement fonctionnalisée avec une SAM de MHDA et (b) refunctionalisée avec une seconde SAM de MHDA après 2min de gravure dans une solution de 3 NH ₄ OH : 1 H ₂ O ₂ : 100 H ₂ O	152
Figure 4.6 Représentation schématique illustrant l'impact des défauts de cristallinité dans le processus de photo-oxydation UV des SAMs sur substrat or et l'influence des longueurs de chaînes alkyles ¹⁶²	154
Figure 4.7 Principe de photo-oxydation UV d'une SAM de MHDA formée sur GaAs (100)	155
Figure 4.8: Positionnement fréquentiel des sources lumineuses utilisées dans le cadre de ma thèse, par rapport à celles utilisées dans la littérature	156
Figure 4.9: Montage (a) de la diode laser (405-450nm) avec lentille et table de déplacement et (b) laser excimer KrF (248nm). (L'aligneur n'est pas représenté ici).....	157
Figure 4.10 Zone d'exposition aux UVs et zones de mesure sur les échantillons de GaAs	159
Figure 4.11 Spectres FTIR centrés sur les régions CH ₂ et As-O mesurés sur des échantillons de GaAs fonctionnalisés avec du MHDA, avant et après exposition (en milieu aqueux) par chacune des trois sources : diode laser bleu, lampe à mercure et laser KrF	160
Figure 4.12: Coefficient d'absorption (α) du GaAs en fonction de l'énergie des photons (hv). Adapté de Casez et al. ³⁰⁷	162
Figure 4.13: Schéma de montage du laser excimer KrF, avec représentation de la cellule fluide et des 4 masques de projection utilisés lors des expériences	163

Figure 4.14 Spectres FTIR centrés sur les régions des méthylènes et des oxydes d'arsenic, mesurés sur des échantillons de GaAs bulk en fonction du nombre d'impulsions utilisé pour photo-oxyder sa surface nue..	164
Figure 4.15 Evolution du rapport d'intensité entre les zones irradiées et non-irradiées pour les pics As-O à 835cm^{-1} et 1075cm^{-1} et la bande OH à 3250cm^{-1} en fonction du nombre d'impulsions	165
Figure 4.16 Spectre XPS de « survol » pour les parties irradiées et non-irradiées par le laser KrF d'un échantillon de GaAs(100) fonctionnalisé avec une SAM de MHDA	167
Figure 4.17 Contributions XPS de Ga 3d et S 2p / Ga 3s d'une SAM de MHDA formée sur GaAs(100) pour les parties non-exposées (a et c) et exposées (b et d) en milieu aqueux.....	170
Figure 4.18 Image au microscope optique (50x) des frontières entre les zones exposées ou non, pour une densité d'énergie de $98\text{mJ}/\text{cm}^2$	172
Figure 4.19 (a) Image AFM de la zone de transition entre partie irradiée et non-irradiée du GaAs(100) fonctionnalisé de MHDA et (b) spectre FTIR focalisé sur la région des méthylènes et celle des pics d'As-O	172
Figure 4.20 Rapport d'intensité entre surface exposée et surface non-exposée de GaAs fonctionnalisé au MHDA pour les vibrations CH_2^{asy} , CH_2^{sy} , As-O et de la bande OH en fonction (a) de la densité d'énergie et (b) du nombre d'impulsions	174
Figure 4.21 Absorbance du pic $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ en fonction de la concentration en H_2O_2 du milieu d'exposition pour des échantillons de GaAs(100) fonctionnalisés avec du MHDA, irradiés ou non par $35\text{mJ}/\text{cm}^2$ et 1000 impulsions.....	175
Figure 4.22 Régénéralité de la fonctionnalisation : Evolution de l'absorbance du pic de vibration CH_2^{asy} avec les étapes de fonctionnalisation, photo-oxydation et désoxydation.	175
Figure 4.23 Procédé standard de photo-patterning UV révélé par fluorescence	177
Figure 4.24 Images au microscope à fluorescence des échantillons de GaAs(100) fonctionnalisés par des PEG-biotin, patternés puis coatés de NeutrAvidin afin de tester la capture des microsphères fluorescentes	178
Figure 5.1: Photographies (a) du module de test temporaire, (b) d'une interface de test permanente et (c) du circuit de calibration.....	183
Figure 5.2: Interface graphique du programme d'acquisition et de contrôle sous Matlab® : (a) fenêtre de réglage des paramètres d'acquisition et (b) fenêtre d'affichage des résultats	184
Figure 5.3: (a) Schéma de principe et (b) photographie du système de mesure vibrométrique par interféromètre à sonde hétérodyne ³²⁰	185
Figure 5.4: Module fluidique pour les tests en milieu liquide (a) Schéma (b) photographie et (c) zoom sur la platine porte échantillon.....	186
Figure 5.5 : Mesures d'impédance en module et en phase du mode de cisaillement pour un échantillon massif (série B) (a) à sa fréquence fondamentale et (b) à sa 7ème harmonique et (c-d) pour deux membranes à respectivement $266\mu\text{m}$ (série D) et $62\mu\text{m}$ (série E)	188
Figure 5.6: Géométries d'électrodes étudiées	190
Figure 5.7: (a) Nombre de pics présents à $\pm 50\text{kHz}$ du pic de résonance principal, (b) phase et (c) fréquence du pic principal sur des mesures de phase d'impédance selon le type d'électrodes.....	191
Figure 5.8: Module et phase de la composante hors plan du déplacement pour un mode fondamental de cisaillement d'épaisseur	193
Figure 5.9: Schéma du montage de régulation en température	194

Figure 5.10: (a) Module (rouge) et phase (bleu) de l'impédance en fonction de la fréquence et (b) variation de la fréquence de résonance en fonction de la température (échantillon de la série C)	195
Figure 5.11: (a) Spectres en phase et module pour différents supports et (b) valeur du module d'impédance (noir) et de l'amplitude du pic de module (bleu) à la fréquence de résonance en fonction de la conductivité des supports.	196
Figure 5.12: Module de l'impédance à la résonance en fonction de la conductivité de l'électrolyte en contact avec le résonateur	198
Figure 5.13: (a) Exemple d'image au microscope de bactéries <i>E. coli</i> immobilisées sur la surface d'un échantillon de GaAs (fonctionnalisé avec l'architecture PEG-biotin) et (b) taux de couverture par mm ² de la bactérie <i>E. coli</i> sur les trois architectures : MHDA, MHDA:MUDO (1:9) et PEG-biotin	199

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Chronologie des premiers biocapteurs ^{8,9}	7
Tableau 1.2: Caractéristiques générales des transducteurs acoustiques ⁵⁶	16
Tableau 1.3: Exemples de biocapteurs acoustiques ^{46,57-59}	17
Tableau 1.4: Applications et moyens de détection de différents types d'éléments biologiques ⁸⁰	22
Tableau 1.5: Avantages et inconvénients des techniques d'immobilisation des biorécepteurs.....	25
Tableau 2.1: Paramètres électriques et mécaniques du GaAs.....	44
Tableau 2.2: Angles d'Euler pour réaliser la rotation du repère initial où $x, y, z = \langle 100 \rangle, \langle 010 \rangle, \langle 001 \rangle$ à un repère $X, Y, Z = \langle 100 \rangle, \langle 011 \rangle, \langle 0 \bar{1}1 \rangle$	49
Tableau 2.3: Comparaison des valeurs des trois premières harmoniques impaires obtenues par la simulation numérique et par le calcul analytique	59
Tableau 2.4: Résultats de gravure plasma du GaAs selon les masques utilisés.....	80
Tableau 2.5: Résultats de fabrication de cellules fluidiques selon la stratégie utilisée : (1) développement à l'acétone, (2) dépôt d'une couche d'Al en face arrière ou (3) en face avant.	92
Tableau 3.1: Valeurs d'absorbance pour le pic $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ pour les SAMs de MHDA, MUDO et MUDA auto-assemblées sur GaAs dans l'éthanol ou le mélange EtOH:H ₂ O (2:1)	128
Tableau 4.1 : Taux de gravure du GaAs(100) pour trois dilutions de la solution NH ₄ OH : H ₂ O ₂	150
Tableau 4.2 : Intensité d'émission de la lampe à mercure pour les différentes gammes de longueur d'onde	157
Tableau 4.3 : Caractéristiques des sources UV et paramètres d'exposition	160
Tableau 4.4 : Paramètres optiques et thermiques du matériau GaAs.....	161
Tableau 4.5 : Mesures ellipsométriques des échantillons de GaAs photo-oxydés en milieu aqueux ou dans une solution à 6.4mM de H ₂ O ₂	166
Tableau 4.6: Énergies de liaison obtenues expérimentalement pour chaque élément d'intérêt et leur correspondance dans la littérature (*Issue de « NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database », http://srdata.nist.gov/xps)	168
Tableau 4.7 : Concentration atomique (résultats XPS) des éléments C, O, As, Ga et S pour des échantillons exposés et non-exposés dans l'eau DI ou dans une solution à 0.02% de H ₂ O ₂	171
Tableau 4.8 : Paramètres d'exposition et procédure pour chaque échantillon patterné de GaAs(100) fonctionnalisé par une architecture PEG-biotin / NeutrAvidin / Microsphère	177
Tableau 5.1: Séries d'échantillons fabriqués et testés au cours de ces travaux	187
Tableau 5.2: Valeurs caractéristiques expérimentales et théoriques (calculées à partir de l'épaisseur du résonateur et des propriétés du GaAs) des résonateurs d'épaisseur 622 μm , 266 μm et 62 μm	189
Tableau 5.3: Valeurs caractéristiques obtenues par FEM pour différentes configurations d'électrodes	191
Tableau 5.4: Molarités et conductivités des solutions préparées	197

LISTE DES ACRONYMES

Acronyme	Signification en anglais	Signification en français
AFM	Atomic force microscopy	Microscopie à force atomique
ARN	Ribonucleic acid	Acide ribonucléique
ASC	"Automated sample changer"	
ATR	Attenuated total reflection	Réflectance totale atténuée
BAW	Bulk acoustic wave (device)	Dispositif à ondes de volume
BEIA	Bioluminescent enzyme immunoassay	
BSA	Bovine serum albumin	Albumine de sérum bovin
BVD	Butterworth-Van Dyke model	Modèle Butterworth-Van Dyke
CFU	Colony forming unit	Unité formant colonie
DDT	Dodecanethiol	
DFT	Discrete Fourier transform	Transformation de Fourier discrète
DI	Deionised (water)	Déionisée (eau)
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Diméthylsulfoxyde
DRO	Reactive oxygen species	Dérivé réactif de l'oxygène
E-beam	Electron-beam lithography	Lithographie à faisceau d'électrons
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide	
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ELFA	Enzyme-linked fluorescent assay	
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Méthode immuno-enzymatique
EMAT	Electromagnetic acoustic transducer	Transducteur acoustique électromagnétique
FBAR	Thin-film bulk acoustic (resonator)	
FEM	Finite element method	Méthode des éléments finis
FET	Field-effect transistor	Transistor à effet de champ
FIB	Focused ion beam	Sonde ionique focalisée
FITC	Fluorescein isothiocyanate	Isothiocyanate de fluorescéine
FPW	Flexural plate wave (resonator)	Résonateur à ondes de flexion
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
HDT	Hexadecanethiol	
ICP	Inductively coupled plasma	Plasma couplé par induction
IDT	Interdigital transducer	Electrode interdigitée
IMS	Immunomagnetic separation	Séparation immunomagnétique
IR	Infrared	Infrarouge
IRRAS	Infrared reflection absorption spectroscopy	Spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption
ISFET	Ion Sensitive Field Effect Transistor	Transistor à effet de champ sensible aux variations de concentration en ions
JFET	Junction field effect transistor	

LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	
LED	Light-Emitting Diode	Diode électroluminescente
LFE	Lateral field excitation	Excitation à champ latéral
LFIA	Lateral flow immunoassay	
LW	Love wave (device)	Dispositif à ondes de Love
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MCH	6-Mercapto-1-hexanol	
MCT	Mercury cadmium telluride	Tellure de mercure-cadmium
MEB	Scanning electron microscopy	Microscopie électronique à balayage
MEMS	Microelectromechanical systems	Microsystème électromécanique
MHDA	16-Mercaptohexadecanoic acid	
MOCSER	Molecular controlled semiconductor resistor	
MUDA	11-Mercaptoundecanoic acid	
MUDO	11-Mercapto-1-undecanol	
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification	
NHS	N-hydroxysuccinimide	
ODT	Octadecanethiol	
PBS	Phosphate buffered saline	Tampon phosphate salin
PCB	Printed Circuit Board	Circuit imprimé
PCR	Polymerase chain reaction	Réaction en chaîne par polymérase
PDMS	Polydimethylsiloxane	Polydiméthylsiloxane
PECVD	Plasma-enhanced chemical vapor deposition	Dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma
PEG	Polyethylene glycol	Polyéthylène glycol
PEG-biotin	Biotinylated polyethylene glycol thiols	Thiols polyéthylène glycol biotinylés
Pi	Isoelectric point	Point isoélectrique
PIN	Positive Intrinsic Negative (diode)	Diode à zones dopée P, intrinsèque et dopée N
pKa	Acid dissociation constant	Constante de dissociation acide
PM-IRRAS	Polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy	Spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase
PML	Perfectly matched layer	Couche absorbante parfaitement adaptée
QCM	Quartz crystal microbalance	Microbalance à cristal de quartz
S/N	Signal to noise ratio	Rapport signal sur bruit
SAM	Self-assembled monolayer	Monocouche auto-assemblée
SAW	Surface acoustic wave (device)	Dispositif à ondes de surface
SDL	Glow discharge spectrometry	Spectrométrie de décharge lumineuse
SH-APM	Shear-horizontal acoustic plate mode	
SIMS	Secondary ion mass spectrometry	Spectrométrie de masse à ionisation secondaire
SMA	SubMiniature version A (connector)	
SPR	Surface plasmon resonance	Résonance des plasmons de surface

STM	Scanning tunneling microscope	Microscope à effet tunnel
STW	Surface transverse wave (resonator)	Résonateur à ondes de surface transverse
TF	Fourier transform	Transformée de Fourier
TFE	Thickness field excitation	Excitation à champ dans l'épaisseur
TOF	Time of flight (analyzer)	Analyseur à temps de vol
TSM	Thickness shear mode (resonator)	Résonateur à ondes de cisaillement d'épaisseur
UV	Ultraviolet	
UVPO	UV Photooxidation	Photo-oxydation UV
XPS	X-ray photoelectron spectrometry	Spectrométrie photoélectronique X

INTRODUCTION GENERALE

Les besoins croissants dans différents domaines et dans de nombreuses situations, de donner une information en temps réel sur la présence d'un organisme biologique dans un environnement spécifique, ont motivé le développement d'une multitude de technologies de détection. Ces technologies se regroupent sous le terme de « biocapteur », outil de mesure employé pour détecter des éléments biologiques dans les domaines de l'agro-alimentaire, de l'environnement, du biomédical et de la biosécurité. L'industrialisation et le développement des échanges commerciaux alimentaires ont entraîné, ces dernières années, plusieurs crises sanitaires associées à une mauvaise gestion des produits de consommation (exemple : « *crise du concombre* » en France et en Allemagne en mai 2011¹) ou à un mauvais entretien des installations de conditionnement ou de traitement des eaux et/ou des aliments (exemple : *crise de la légionellose à Québec au Canada en 2012*²). Ainsi, l'utilisation de biocapteurs pour une détection rapide, sensible et sélective, d'organismes pathogènes répond aux inquiétudes quant aux risques d'infection pour la population. Ces raisons expliquent leur plein essor ces trente dernières années.

Les performances et les caractéristiques d'un biocapteur vont dépendre des technologies employées pour la capture de l'élément biologique (biointerface) et la conversion de cet événement en un signal mesurable (transducteur). Nous nous sommes focalisés sur l'étude d'un transducteur à ondes élastiques, celui-ci permettant d'effectuer des analyses directes (sans l'intervention de marqueurs) et en temps réel. Ils ont également l'avantage d'être facilement miniaturisables et peuvent être l'objet d'application portative. Historiquement, les premiers capteurs acoustiques utilisés sont les résonateurs à ondes élastiques de cisaillement dans le volume (TSM) dont la microbalance à quartz (QCM) est un exemple. Les premiers travaux sur le QCM ont été initiés par Sauerbrey en 1959. Dès lors, la structure, les matériaux employés et les procédés de fabrication pour les TSMs n'ont eu de cesse d'évoluer et de s'élargir.

Dans ce rapport, nous présentons un biocapteur à onde de cisaillement de volume conçu en arséniure de gallium (GaAs). Ce choix de matériau est motivé par plusieurs années de développement et d'étude de celui-ci, au sein de notre groupe, pour des applications acoustiques. Les plus récents travaux de recherche dans ce domaine ont été

conclus par la thèse d'Alex Bienaimé intitulée « Microcapteur en arséniure de gallium pour la détection de molécules dans un fluide ». Ces travaux donnèrent de solides bases sur la modélisation, la fabrication, la fonctionnalisation et le test de ces dispositifs. Cependant, les premiers résultats sur ce biocapteur ont montré les limites dans l'obtention des performances escomptées. Nous nous appuyerons sur ces travaux et ces résultats pour développer des pistes d'optimisation en termes de sensibilité et spécificité à travers l'étude de nouvelles structures, géométries et procédés pour la biointerface et le transducteur.

Dans le chapitre 1, nous énoncerons l'état de l'art des domaines explorés menant à la justification des choix sélectionnés pour la suite des travaux. Nous positionnerons, au préalable, le capteur étudié pour l'application ciblée dans un contexte global et par rapport aux autres technologies existantes.

Dans le chapitre 2, nous rappellerons les relations et modèles théoriques permettant de comprendre le fonctionnement du capteur et de prévoir, notamment via la simulation, les performances de celui-ci. Nous détaillerons également les techniques de fabrication employées au cours de ce travail pour l'élaboration du transducteur et de sa cellule fluide.

Dans le chapitre 3, nous analyserons et caractériserons l'interface de bio-reconnaissance utilisée pour la capture d'éléments biologiques. Après une étude des techniques employées, nous effectuerons les caractérisations fines de l'interface dans le but de comprendre les phénomènes à l'interface GaAs-biomolécule. Enfin nous discuterons des améliorations possibles pour augmenter le nombre de sites de reconnaissance, et par conséquent, pour optimiser la sensibilité du capteur.

Dans le chapitre 4, nous décrivons les procédés mis en oeuvre pour la régénération de la biointerface caractérisée précédemment, dans l'objectif de réduire le coût global d'utilisation du capteur. Nous prendrons soin de choisir des techniques permettant de préserver autant que possible la nature, le volume et la qualité du substrat régénéré afin qu'il conserve les mêmes propriétés de transduction.

Enfin dans le chapitre 5, nous donnerons les résultats de test du transducteur. Nous analyserons notamment les paramètres environnementaux pouvant influencer, de façon critique, les performances et la fiabilité du résonateur. Nous confronterons également les valeurs caractéristiques du dispositif réel avec les modèles étudiés dans le chapitre 2. L'ensemble des analyses effectuées dans ce chapitre, nous permettra de conclure sur

l'efficacité d'un tel capteur pour l'application visée et de dégager les perspectives d'optimisation.

CHAPITRE 1 État de l'art et positionnement du biocapteur en Arséniure de Gallium

1.1 Contexte général

La plupart des infections bactériennes sont liées à la présence de bactéries dans les eaux de consommation, dans la nourriture ou dans les systèmes de refroidissement ou d'aération qui leur offrent des conditions favorables à leur développement (température, présence de nutriments...). La présence de ces micro-organismes peut engendrer un risque à court terme pour le consommateur ou l'utilisateur des systèmes dans lesquels ils se développent. La plupart du temps, les infections qui en résultent sont bénignes (troubles gastro-intestinaux, diarrhées,...) comme celles occasionnées par certaines souches communes d'*Escherichia coli* (*E. coli*) mais d'autres souches peuvent s'avérer graves. De façon à prévenir ces infections, il est nécessaire de pouvoir détecter et identifier suffisamment tôt la présence des pathogènes dans les milieux à risques. L'industrie agro-alimentaire est le principal secteur concerné par la détection de bactéries suivi des environnements cliniques et des eaux de consommation ou eaux industrielles (Figure 1.1). Les analyses effectuées portent essentiellement sur la détection des bactéries telles que les salmonelles, l'*Escherichia coli*, les *Listeria*, les *Campylobacter* et les légionelles (Figure 1.1).

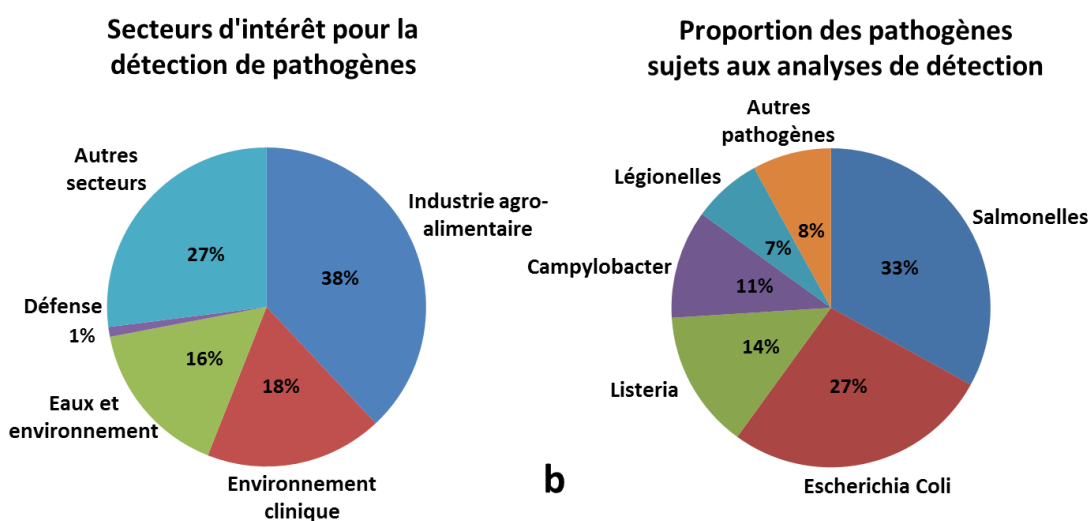


Figure 1.1 : (a) Secteurs d'intérêt pour la détection de pathogènes et (b) organismes pathogènes les plus couramment détectés par les techniques d'analyses actuelles. Adapté de Lazcka et al.³

Les organismes de surveillance, publics ou privés, emploient essentiellement des techniques de détection de pathogènes dites « conventionnelles » telles que la méthode de culture (comptage et analyse biochimique), les techniques de réaction en chaîne par polymérase (« Polymerase chain reaction », ou PCR) et méthodes immuno-enzymatiques (« enzyme-linked immunosorbent assay » ou ELISA). La méthode la plus répandue pour la détection de pathogènes (bactériens) est celle du comptage de colonies après culture cellulaire. Elle reste la plus précise et la plus robuste dans la détection de ces organismes et de leur quantification. Elle permet également d'y réaliser une analyse biochimique des organismes cultivés. Cependant cette technique nécessite beaucoup de temps, et un temps relativement variable selon le type ou la souche de bactérie à détecter. En général, le temps requis pour obtenir des résultats préliminaires est de 2 à 3 jours, mais peut aller jusqu'à 7 à 10 jours pour les confirmer⁴. A titre d'exemple, Artault et al. indiquent que le temps requis pour obtenir des colonies visibles avec des bactéries de *Listeria monocytogenes* est de 7 jours⁵.

Les techniques PCR combinées aux systèmes de détection ont, depuis une trentaine d'années, permis la détection de pathogènes via leur séquence ADN. Une cible ADN peut être amplifiée jusqu'à près de dix milliard de fois sur une gamme de 1h à 24h (en tenant compte du processus d'extraction de l'ADN), et avec des sensibilités, en théorie, en dessous d'une cellule. On trouve diverses techniques associées telles que la PCR temps-réel (« real-time PCR »), la PCR multiplexe (« multiplex PCR »), LAMP (« loop-mediated isothermal amplification »), NASBA (« nucleic acid sequence-based amplification ») ainsi que les techniques combinées avec l'ELISA, l'immunofluorescence ou l'électrophorèse. La PCR prend généralement de 5h à 24h pour produire un résultat de détection mais cela dépend fortement de la méthode utilisée. La PCR offre de meilleures spécificités, sensibilités, précisions et rapidités de détection pour l'analyse de petites quantités de pathogènes que les autres méthodes conventionnelles.

La détection immunologique n'est pas plus sensible et spécifique que les techniques PCR mais est généralement un peu plus rapide, plus robuste et a le potentiel de détecter également les biotoxines libérées par les organismes pathogènes. Cette catégorie regroupe les techniques ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay »), ELFA (« enzyme-linked fluorescent assay »), BEIA (« bioluminescent enzyme immunoassay »), LFIA (« lateral flow immunoassay ») ou encore IMS (« immunomagnetic separation »). Malgré leurs

bonnes performances et leur coût réduit, ces techniques souffrent du manque d'analyse en temps réel.

Ces trois catégories de méthode de détection sont couramment utilisées dans l'industrie et dans les laboratoires mais sont souvent considérées comme chronophages. Les domaines de l'industrie agro-alimentaire, du traitement des eaux, du diagnostic clinique dans lesquels ces techniques sont utilisées, sont demandeurs de nouvelles technologies plus rapides, fiables, spécifiques, sensibles et simples à mettre en place tout en conservant des coûts de vente et d'utilisation faibles. La possibilité de réaliser les analyses en temps réel est également une caractéristique clé pour ces détections. Ces dernières années ont vu le développement des activités de recherche dans le domaine des biocapteurs pour la détection des micro-organismes pathogènes. Ces biocapteurs pourraient ainsi accélérer les temps d'analyse tout en offrant une détection similaire aux techniques conventionnelles en terme de sensibilité. De plus, les biocapteurs offrent la possibilité de réaliser des dispositifs compacts pouvant permettre l'intégration ou le déplacement des systèmes sur site si nécessaire. Par exemple, le domaine médical cherche des solutions pour réaliser le diagnostic dans les cliniques voire au chevet des malades plutôt que dans un laboratoire. Il est également question pour ce type de technique d'avoir une plus grande simplicité de prise en main et mise en œuvre. Comme nous le verrons par la suite, les biocapteurs sont souvent classés par type de transduction (optique, électrochimique, piézoélectrique...) auquel est combinée une interface de reconnaissance biologique. La Figure 1.2 représente, en fonction de leur limite de détection et de leur temps d'analyse, de nombreuses références regroupées par catégories de détections (culture, tests immunologiques, PCR, biocapteur optique, biocapteur électrochimique et biocapteur sensible à l'ajout de masse). On remarque, comme indiqué précédemment, que les techniques conventionnelles demandent des temps d'analyse plus longs que les trois catégories de biocapteurs. Les biocapteurs n'atteignent pas encore l'état de l'art des limites de détection des méthodes conventionnelles mais nous pensons que les progrès dans ce domaine vont permettre dans un avenir proche de dépasser cette limite. En effet, ils ont encore du chemin à faire pour la spécificité afin d'éviter l'obtention de faux positifs.

C'est dans cette optique que nous proposons dans les travaux présentés ici, l'élaboration et l'étude d'un biocapteur à ondes acoustiques de volume. Par l'utilisation de l'arséniure de gallium comme matériau piézoélectrique, nous avons l'ambition de fabriquer un dispositif

permettant d'atteindre de meilleures performances que les microbalances à quartz (QCM) existantes. En conservant la gamme de durée moyenne d'analyse d'un QCM (30min à 4h), ses capacités de miniaturisation et en augmentant sa sensibilité (et spécificité), on obtiendrait ainsi un capteur idéal pour l'analyse et la détection de pathogènes sur site.

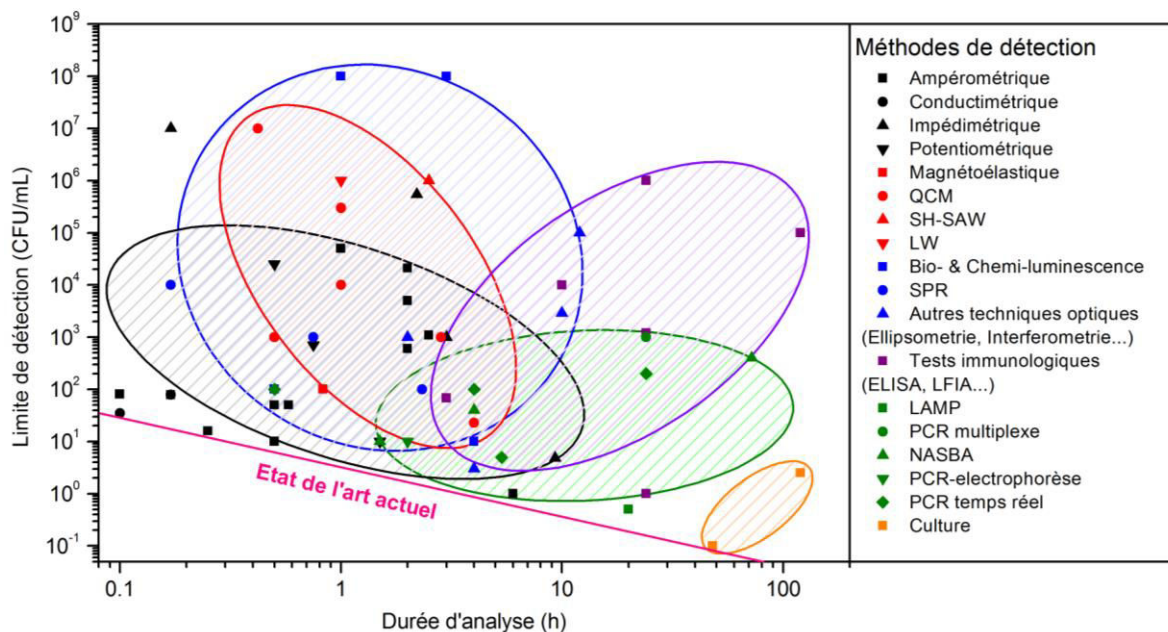


Figure 1.2 : Limite de détection (CFU/mL) versus durée d'analyse (h) pour différentes techniques de détection de pathogènes. L'ensemble des références utilisées dans ce graphique a été répertorié dans le tableau de l'annexe A. Les groupements correspondent aux catégories de détection : biocapteurs électrochimiques (noir), biocapteurs sensibles aux variations de masse ou à des paramètres mécaniques (rouge), biocapteurs optiques (bleu), tests immunologiques (violet), techniques de détection d'acides nucléiques (vert) et culture (orange)

1.2 Les biocapteurs

1.2.1 Définition

Un biocapteur est un outil analytique qui convertit la réponse à un événement biologique en un signal physiquement mesurable. On peut diviser le biocapteur en trois principaux éléments (Figure 1.3) : l'interface de biorecognition (2 et 3) permettant de détecter l'entité biologique cible, le transducteur (4) assurant la conversion de la réponse biologique en un phénomène physique et enfin l'interface de traitement du signal (5) permettant la mesure du phénomène physique⁶. Le biorécepteur peut être un microorganisme, une organelle, une cellule, une enzyme, un anticorps ou encore un acide nucléique. La transduction peut être optique, électrochimique, piezoélectrique, magnétique, thermométrique ou une combinaison d'une ou plusieurs de ces techniques. Les biocapteurs

sont utilisés dans de nombreuses applications pour le médical, l'environnement, l'agroalimentaire et la sécurité. Il est encore possible de différencier deux classes de biocapteurs, ceux à détection directe sans marquage de molécules, et ceux à détection indirecte nécessitant l'ajout d'une sonde (fluorophore, enzyme, nucléaire...).

La performance d'un biocapteur est fondée sur trois caractéristiques essentielles : sa sensibilité, sa spécificité et sa stabilité. La spécificité du biocapteur est sa capacité à sélectionner particulièrement une entité biologique en présence d'autres biomolécules alors que sa sensibilité est sa capacité à détecter une cible biologique. La stabilité quant à elle est basée sur la longévité de la même détection biologique du capteur.

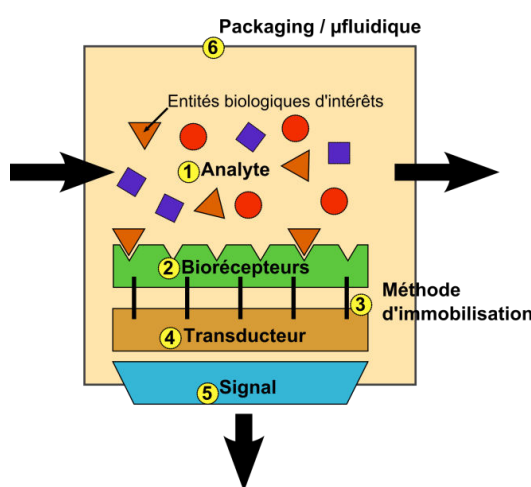


Figure 1.3 Architecture d'un biocapteur

1.2.2 Étude de développement des biocapteurs dans le monde

Le nombre de brevets avec le mot-clé « biosensor » dans le titre, depuis 1836 (date du début des archives) jusqu'à aujourd'hui est de 8967 brevets sur un total de 80 millions (soit 0.008%) selon European Patent Office. Mais c'est au cours des deux dernières décennies que le nombre de ces brevets a fortement augmenté : en 2015, il y en a eu 567 pour 160 022 brevets accordés (soit 0.72%) alors qu'en 1995 leur nombre était de 76 sur 78 300 brevets accordés (soit 0.10%). Depuis quelques années, le domaine le plus représenté est celui des technologies médicales avec 12 474 brevets déposés dans ce champ d'application pour l'année 2015.

Dans le monde, les pays les plus actifs dans le développement des biocapteurs sont les Etats-Unis, le Canada, le Japon, l'Allemagne et l'Angleterre. Le marché mondial des dispositifs de diagnostic *in vitro* a atteint 43.8 milliards de dollars en 2010 (Selon *Freedonia*).

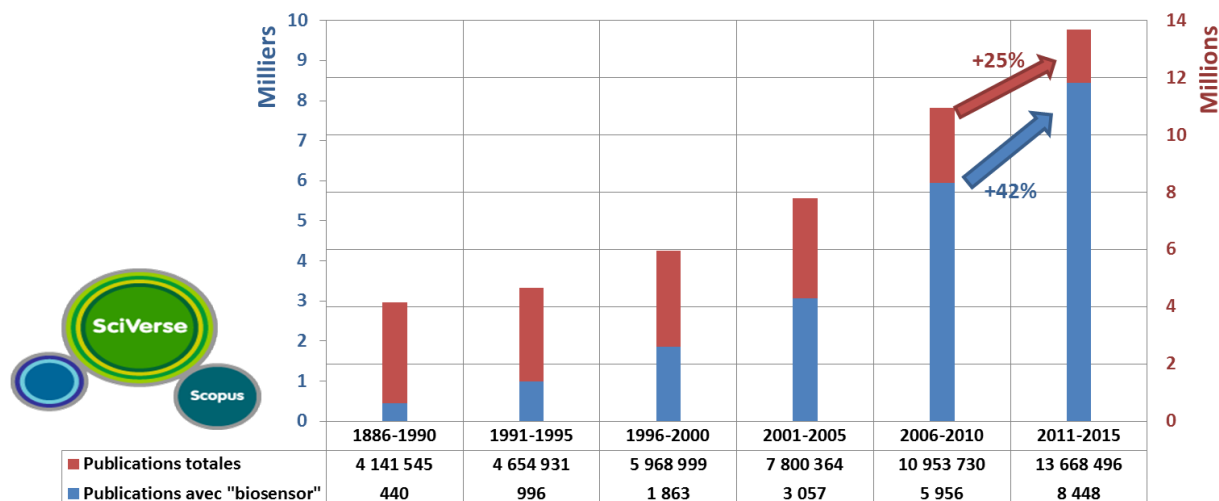


Figure 1.4: Evolution du nombre de publications totales et avec le terme « biosensor » dans la base de données Scopus entre 1886 et 2015

Dans la recherche, le nombre de publications concernant le domaine de la biodétection a également progressé. Entre 1886 et 1990, la base de données Scopus (*SciVerse*) dénombrait 440 publications dont le titre incluait le mot « biosensor(s) » sur 4 141 545 publications, tandis que 25 ans plus tard, ce sont 8448 articles avec ce mot clé qui ont vu le jour sur 13.7 millions de publications. On remarque même une progression plus élevée du nombre d'articles portant sur les biocapteurs comparée à la tendance générale du nombre de publications (Figure 1.4). Par exemple, on voit une augmentation de 42% du nombre d'articles avec le mot « biosensor(s) » entre ces cinq dernières années et les cinq précédentes, alors qu'elle n'est que de 25% pour le nombre de publications totales.

1.2.3 Un bref historique des biocapteurs

On estime que le développement du premier biocapteur est attribué à LC Clark⁷ qui fut l'inventeur d'une sonde à oxygène pour mesurer le taux d'oxygène dans le sang. Il utilisa cette sonde dans un dispositif appelé « enzyme electrode » en 1962. Le capteur est constitué de la sonde à oxygène, d'une membrane intérieure semi-perméable à l'oxygène, d'une fine couche d'enzymes (Glucose oxydase) immobilisée sur la sonde à oxygène et d'une membrane extérieure de dialyse.

C'est en 1983 que les fondements des techniques de bio-détection par résonance de plasmons de surface (SPR) sont établis par les travaux de Liedberg¹⁰. La même année, Guilbault¹¹ élabore les premiers capteurs basés sur le principe de la micro balance à quartz

pour des applications de détection de phase gazeuse. Puis, en 1986 ce même capteur est utilisé pour la détection d'interactions anticorps-antigènes par Muramatsu¹².

Par la suite, le développement des biocapteurs s'est réellement accéléré, pour exploser littéralement ces dernières années. En effet, les secteurs de recherche dans la détection d'explosifs, d'agents bactériologiques ou le dépistage et le suivi de maladies prennent une place de plus en plus importante dans notre société.

1962	• Capteur à Glucose basé sur une réaction enzymatique et une sonde à oxygène	Clark and Lyons
1969	• Le premier capteur potentiométrique et enzymatique pour la détermination de l'urée dans l'urine	Guilbault and Montalvo
1972	• Le premier capteur chimique basé sur le transistor à effet de champs sensible aux variations de concentration d'ions (ISFET)	Bergveld
1975	• Le premier immunocapteur potentiométrique	Janata
1976	• Le premier immunocapteur ampérométrique	Aizawa et al.
1983	• Le développement des techniques de résonance à plasmons de surface pour la biodétection	Liedberg et al.
1983	• Le premier capteur de gaz (formaldéhyde) à base de QCM	Guilbault
1986	• La première application de détection d'interactions antigènes-anticorps	Muralatsu et al.

Tableau 1.1: Chronologie des premiers biocapteurs^{8,9}

1.3 Transduction acoustique : positionnement

1.3.1 Classification des transducteurs

Toutes les combinaisons transducteur-biorécepteur ne sont pas équivalentes, certaines ne sont même pas possibles. A titre d'exemple, les biocapteurs enzymatiques ont souvent une transduction électrochimique comme c'est le cas pour le capteur de Glucose de Clark. Le type de biorécepteur va influencer le choix du transducteur utilisé pour la détection.

Par ailleurs, d'autres critères tels que la fabrication à bas coût, la miniaturisation du dispositif et la détection sans marquage doivent être pris en compte pour la sélection des transducteurs répondant à l'application souhaitée. Il existe un certain nombre de transducteurs classés selon leur méthode de mesure (Annexe B), trois sont essentiellement utilisés : les transductions électrochimiques, optiques et mécaniques.

Les **transducteurs électrochimiques** sont à l'origine des premiers biocapteurs, à l'instar du capteur de glucose de Clark. Ils sont très répandus et généralement peu coûteux

comparés aux autres modes de transduction. On peut les diviser majoritairement en quatre catégories, les capteurs ampérométriques¹³⁻¹⁵, potentiométriques¹⁶⁻¹⁹, conductimétriques²⁰ et impédimétriques²¹.

Les **transducteurs optiques** utilisent une large variété de méthodes optiques telles que la fluorescence, l'absorption, la réfraction, la chimiluminescence,... avec des applications de capteurs comme les guides d'ondes²² ou les réseaux de capteurs par fluorescence²³.

Parmi ces méthodes, la technique de **Résonance des Plasmons de Surface** (ou SPR) est celle qui détient la plus grande part de marché. Cela s'explique en partie par sa plutôt bonne sensibilité²⁴ mais aussi par le marketing réussi de l'entreprise Pharmacia puis de la firme GE Healthcare²⁵, leader dans le domaine, grâce à leurs investissements dans le développement de cette technologie²⁶.

Les plasmons de surface sont des oscillations de densité d'électrons libres dans un métal. Ces plasmons peuvent être excités quand une lumière polarisée est diffractée à l'interface entre un diélectrique et un métal pour un angle de réflexion total. L'angle de réflexion total dépend de l'indice de réfraction du média environnant le substrat. A l'angle où les plasmons sont excités, l'intensité de la lumière réfléchi présente un minimum. Cet angle dépend de la quantité de matière adsorbée à la surface (Figure 1.5). Le rayon réfléchi est ensuite détecté et analysé.

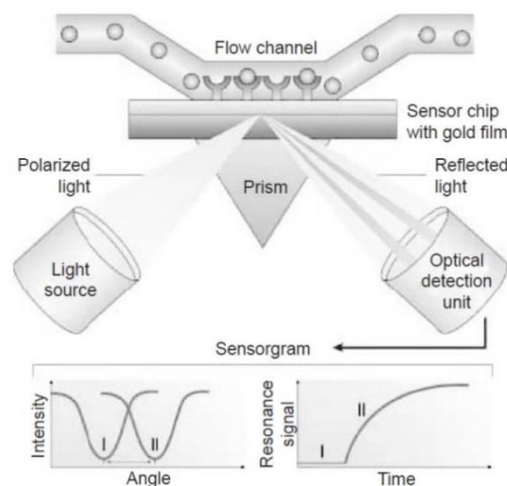


Figure 1.5: Principe de fonctionnement de la technique SPR²⁷

Un des inconvénients de la technologie SPR est que son efficacité est limitée aux 100 premiers nanomètres ce qui peut empêcher une analyse complète d'un organisme plus gros (une cellule par exemple). De plus, son coût est particulièrement élevé, notamment pour les

systèmes avec plusieurs capteurs utilisables en parallèle. C'est une technologie difficilement miniaturisable à court terme de par la présence des systèmes optiques, ce qui est une contrainte pour une analyse sur site.

1.3.2 Dispositifs de détection à ondes acoustiques

Les transducteurs résonants sont basés sur la génération et la détection d'ondes acoustiques. Ces ondes acoustiques, dans le cas d'un capteur, interagissent directement avec les éléments du milieu environnant. Ce type de capteur, dépendant de sa configuration, peut répondre à une large gamme de mesurandes physiques telles qu'une force, pression, température, ajout de masse, densité ou viscosité d'un liquide. De plus, ils peuvent être facilement fonctionnalisés par des récepteurs biologiques modifiant ainsi un ou plusieurs paramètres chimiques, optiques, ou physiques liés au transducteur. Ils ne requièrent pas un procédé de fabrication coûteux et ils ont la particularité d'être facilement intégrables (MEMS) et peuvent donc être utilisés pour des applications nomades. Pour la génération d'ondes acoustiques, ces dispositifs, nécessitent l'utilisation des effets piézoélectriques directs et inverses. Les matériaux piézoélectriques les plus couramment utilisés sont le quartz, le nitrure d'aluminium (AlN), le tantalate de lithium (LiTaO₃), le niobate de lithium (LiNbO₃), le zirconate de titanate de plomb (PZT), ou encore l'oxyde de zinc (ZnO).

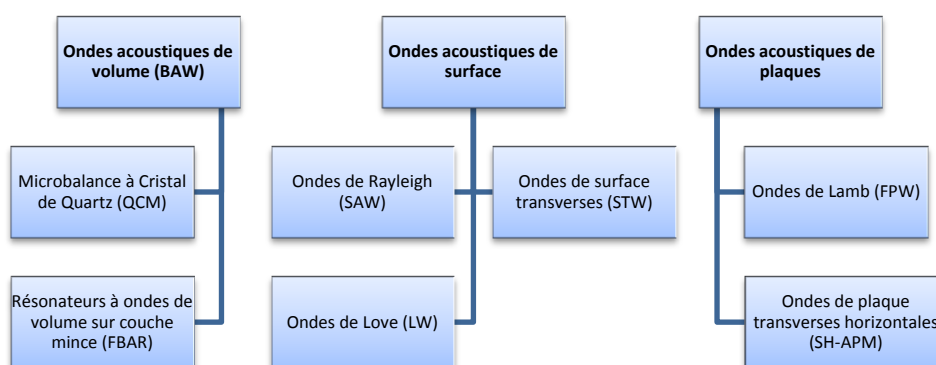


Figure 1.6: Classification des dispositifs à ondes acoustiques

Les transducteurs acoustiques peuvent être classés par le type d'onde générée. Une onde acoustique est une perturbation propagative de l'équilibre d'un milieu se déplaçant de proche en proche et revenant à un état d'équilibre par son élasticité. Les propriétés physiques du milieu agissent directement sur les conditions de propagation de l'onde et peuvent affecter ses vitesses de phase ou d'amplitude. On appelle ondes de volume, les

ondes se propageant dans un solide homogène considéré comme illimité. Si l'onde se propage dans un solide dit limité, deux cas de figure sont possibles. Soit le solide est limité par une surface libre d'un milieu, dans ce cas nous observerons des ondes de surface, soit il est limité par deux surfaces parallèles, auquel cas nous aurons des ondes de plaques. De plus, elles peuvent être longitudinales (ou de compression) ou transversales (ou de cisaillement), ce qui signifie que leur vibration est respectivement parallèle ou perpendiculaire à la direction de propagation (Figure 1.7). Ces dernières peuvent être polarisées verticalement ou horizontalement. Les ondes longitudinales ont une plus grande vitesse que les ondes transversales²⁹. Les différents transducteurs acoustiques, leurs modes de vibration et leur propagation sont représentés dans l'annexe C. Il existe cependant d'autres types de dispositifs à ondes acoustiques, plus rares, ce sont les « leaky SAW »³⁰, « surface skimming bulk waves »³¹ ou encore des dispositifs utilisant les ondes de Bleustein-Gulyaev^{32,33}.

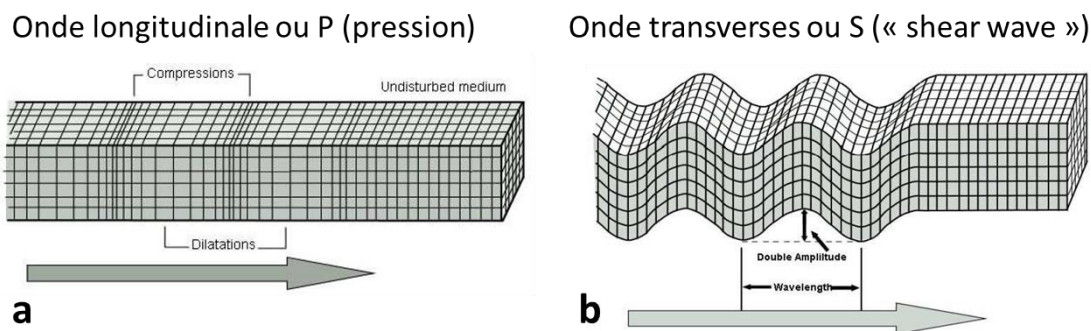


Figure 1.7 : Représentation schématique des déplacements au cours de la propagation (a) d'une onde longitudinale et (b) d'une onde transverse (adapté de Bolt et al.²⁸)

La plus ancienne application de capteurs à ondes acoustiques est la **microbalance à cristal de quartz (QCM)**. Elle fait partie plus généralement des dispositifs à **ondes de cisaillement d'épaisseur (TSM)**. Elle est constituée d'un disque cylindrique en quartz doté d'une électrode sur chacune de ces deux faces. Des ondes acoustiques de volume sont générées par l'application d'un potentiel électrique à leurs fréquences de résonance (4 – 150 MHz). Les QCMs fonctionnent en résonateur, et leur fréquence de résonance est inversement proportionnelle à l'épaisseur du cristal. Depuis les travaux de Sauerbrey³⁴ en 1959 puis ceux de King en 1964³⁵, les QCM sont devenus les capteurs à ondes acoustiques les plus répandus. Les capteurs commerciaux de la firme Q-Sense en sont des exemples, notamment avec le Q-Sense E4³⁶ qui atteint une sensibilité de l'ordre de 0.5 ng/cm². Poitras³⁷ détecte par exemple l'*E. coli* O₁₅₇:H₇, à l'aide de la technologie QCM-D de Q-Sense, avec une limite de détection de 3 x 10⁵ bactéries/mL.

La technologie QCM a évolué et on trouve désormais des réseaux multirésonateurs^{38,39} sur le même cristal permettant la détection de plusieurs éléments en parallèle.

Le principe de base des capteurs à ondes acoustiques est la diminution de la fréquence de résonance par ajout de masse sur la surface de celui-ci.

Sur une gamme donnée, la déviation en fréquence Δf due à l'ajout de masse Δm est quasi-linéaire, cette relation est donnée par l'équation de Sauerbrey³⁴ :

$$\Delta f = -\frac{\Delta m \times f_0^2}{A\sqrt{\mu\rho_q}} = C_f \Delta m \quad (1.1)$$

Δf étant la déviation de la fréquence de résonance f_0 , A la surface de l'électrode, μ le module de cisaillement (2.95×10^6 N/cm² pour le quartz) et ρ_q la densité du quartz (2.65 g/cm³). La sensibilité de masse C_f est d'environ 0.903 Hz/ng pour un cristal de 9MHz⁴⁰.

Le QCM peut fonctionner en milieu liquide grâce à la prédominance des modes de cisaillement d'épaisseur^{41,42}. Dans ce cas, l'équation de Sauerbrey n'est plus applicable car la densité et la viscosité du fluide affecte la fréquence d'oscillation. La relation qui exprime le fonctionnement du QCM en contact d'un milieu liquide est donnée par Kanazawa⁴¹.

Cette relation combinée avec l'équation (1.1) est la suivante :

$$\Delta f = -f_0^2 \left(\frac{\Delta m}{A\sqrt{\mu\rho_q}} + \sqrt{\frac{\rho_L \eta}{f_0 \pi \mu \rho_q}} \right) \quad (1.2)$$

où ρ_L et η sont respectivement la densité et la viscosité du liquide.

Dans le cas présenté sur la Figure 1.8, les ondes sont générées par une excitation à travers le volume, TFE (« *Thickness field excitation* ») mais il est aussi possible d'utiliser une excitation latérale⁴³ (LFE, « *Lateral field excitation* »). Cela permet notamment, dans certaines configurations, d'obtenir de meilleurs coefficients de couplage, mais aussi, dans le cas d'une application en milieu liquide, d'isoler la partie électronique de la surface d'analyse.

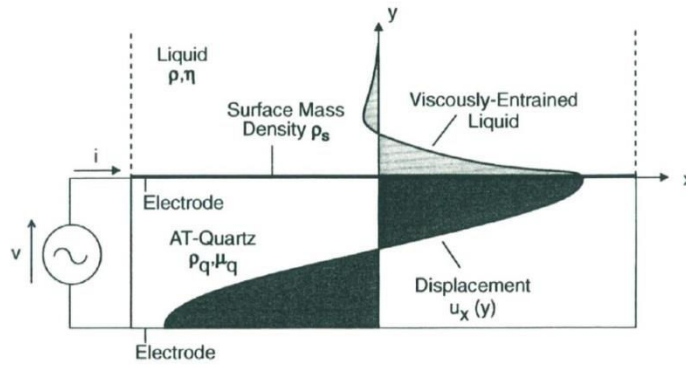


Figure 1.8: Schéma de principe d'une microbalance à cristal de quartz (QCM)⁴⁴

Les **résonateurs à ondes de volume en couche mince** ou **FBAR** (*Thin-Film Thickness Bulk Acoustic Resonator*), sont basés sur des modes d'épaisseur, qui contrairement aux TSM, sont de type longitudinal.

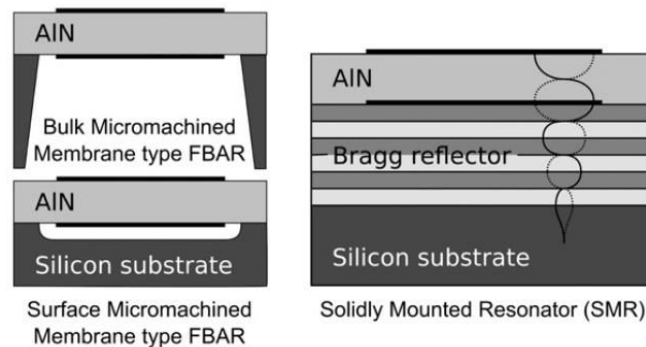


Figure 1.9: Schéma de résonateurs couche mince à ondes de volume (FBAR)⁴⁵

Ils sont fabriqués avec une couche très mince de matériau piézoélectrique, la plupart du temps AlN ou ZnO. Cela implique une fréquence de résonance très haute, de l'ordre de 1000MHz (Tableau 1.2) ce qui entraîne une sensibilité de masse très élevée. Deux architectures sont possibles (Figure 1.9) : soit la couche piézoélectrique est sous la forme d'un diaphragme suspendu soit cette couche est déposée sur un réflecteur de Bragg ou SMR (*Surface Mount Resonator*) qui agit comme un miroir acoustique. Le réflecteur de Bragg est constitué d'une alternance de couches d'impédances acoustiques différentes ; on retrouve dans la littérature les combinaisons AlN-SiO₂, ZnO-SiO₂ parmi les plus courantes. Cette architecture est intéressante car elle est plus robuste, notamment pour des applications de capteurs en milieu liquide comparée à la structure membranaire. A la différence des TSM, en milieu liquide, les vibrations normales à la surface (longitudinales) rayonnent dans le substrat ce qui rend le dispositif peu efficace pour des applications

biologiques. Néanmoins, en favorisant la génération d'ondes de cisaillement, leur fonctionnement pour ces applications, peut être améliorée⁴⁶.

Les **capteurs à ondes acoustiques de surface** ou **SAW** sont constitués d'une plaque épaisse d'un matériau piézoélectrique, typiquement Quartz (coupe ST), Niobate de Lithium ou Tantalate de Lithium. La génération d'ondes acoustiques de surface nécessite une configuration particulière des électrodes, ce sont des électrodes interdigitées ou IDT (*interdigital transducer*). Fondamentalement, elles sont constituées de deux peignes intercroisés, la période d'un IDT est l'espace entre deux doigts consécutifs sur le même peigne. Lorsqu'un potentiel alternatif est appliqué aux électrodes, une onde acoustique est générée et se propage dans la direction perpendiculaire des doigts. L'onde atteint une amplitude maximale lorsque apparaissent des interférences constructives, cela se produit lorsque la fréquence atteint une valeur de $f_0 = v/d$, où v est la vitesse de l'onde acoustique de surface dans le matériau et d la période inter-électrodes. La gamme de fréquence des SAWs est supérieure à 30MHz et a une limite supérieure dépassant le GHz. Deux configurations sont possibles : les SAWs à un port constitué d'un seul IDT, et les SAWs à deux ports avec ligne à retard, constitués de deux IDT séparés d'une certaine distance. Les SAWs sont très utilisés dans le domaine des télécommunications en tant que filtres mais il existe cependant des applications en tant que capteurs⁴⁷. La température, les contraintes, la pression, toute autre propriété des éléments immobilisés en surface sont autant d'exemples de mesurandes pour ce type de capteur.

Par comparaison avec les QCMs, le fait que les vibrations soient localisées à la surface du dispositif fait qu'ils sont plus affectés par les interactions de surface et donc plus sensibles. Cela en fait un capteur très utilisé pour détecter des gaz ou des vapeurs⁴⁸. Par contre la présence d'une composante de vibration normale à la surface dans le cas classique des ondes de Rayleigh fait que ces capteurs SAW sont peu adaptés pour des applications en milieu liquide. En effet, au contact du liquide, cette composante génère des ondes de compression dans le milieu ; l'énergie est ainsi dissipée dans le fluide, ce qui entraîne une forte atténuation de l'onde acoustique⁴⁹.

Dans les **capteurs à ondes de surface transverse (STW)**, l'ajout d'un réseau périodique métallique entre les IDTs permet de prévenir du rayonnement de l'énergie à l'intérieur du cristal⁵⁰, et de réduire la vitesse de l'onde en surface⁴⁹. Avec un choix astucieux de l'orientation du cristal, on peut obtenir un confinement des ondes transverses seules à la

surface du capteur. Si ces ondes transverses sont prédominantes, le capteur STW est à même de fonctionner en milieu liquide.

Les **capteurs à ondes de Love (LW)** sont similaires aux STW, ils impliquent également des ondes de cisaillement confinées sur leur surface supérieure.

Dans ce cas, le confinement de l'onde est obtenu par le dépôt d'une fine couche d'un matériau dans lequel l'onde acoustique aura une vitesse faible comparée à la vitesse dans le matériau piézoélectrique utilisé. Typiquement une fine couche de dioxyde de silicium (SiO_2) ou de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) est ajoutée et agit comme un guide d'onde gardant l'énergie de vibration localisée près de la surface (elle décroît ensuite exponentiellement dans le substrat). Cela a le même effet que pour les capteurs STW, l'opération en milieu liquide est permise par les modes de cisaillement⁵¹⁻⁵³.

Les ondes des transducteurs à **ondes de plaque transverse horizontale (SH-APM)** apparaissent dans les plaques ayant une épaisseur proche de la longueur d'onde. Les ondes de cisaillement sont générées par le moyen de deux IDTs positionnés sur une des surfaces de la plaque. Tout comme le capteur STW ou celui à ondes de Love, la prédominance des ondes transverses permet l'utilisation du dispositif en milieu liquide. La conséquence du confinement de l'énergie acoustique entre les deux faces de la plaque par comparaison avec les SAW, est que la sensibilité des SH-APM à la variation de masse dépend de l'épaisseur du substrat ; les oscillations de l'onde sont présentes sur les deux surfaces du cristal, ce qui rend le dispositif sensible des deux côtés. La gamme de fréquence des capteurs SH-APM est de l'ordre de 20-200 MHz⁵⁴.

Les capteurs à **ondes acoustiques de plaque en flexion (FPW)** ou à **ondes de Lamb** sont constitués de plaques très minces dont l'épaisseur est plus petite que la longueur d'onde (typiquement de l'ordre du micromètre), où une série de modes symétriques et antisymétriques est générée. Ces ondes ont un déplacement de particules similaire aux ondes de Rayleigh ; elles peuvent être considérées comme composées de deux ondes de Rayleigh se propageant sur chacune des faces de la plaque. Leur vitesse de propagation dépend de l'épaisseur de plaque et du matériau dans lequel elles se propagent. Les ondes de Lamb ont un certain nombre de modes, mais les modes S_0 et A_0 , respectivement symétrique et antisymétrique, sont les plus utilisés (Figure 1.10a et b). Ces deux modes présentent l'avantage de ne pas être dispersifs à des basses valeurs du produit fréquence-épaisseur et d'avoir des plages de fréquence pour lesquelles la variation des vitesses de

phase reste faible (Figure 1.10c). Les ondes de Lamb ont une vitesse de propagation plus petite que les SAWs, plus l'épaisseur de plaque diminue plus cette vitesse diminue. Elle peut devenir plus faible que la vitesse de l'onde dans les liquides, ce qui permet d'éviter l'atténuation de l'onde et donc permet leur utilisation dans ces milieux. La gamme de fréquence des ondes de Lamb est comprise entre 5 et 20 MHz.

Les capteurs FPW sont performants pour des mesures de propriétés fluidiques telles que la viscosité, ou pour la mesure de masse en milieu liquide. La sensibilité de masse peut être extrêmement élevée⁵⁵. Le principal inconvénient de cette structure est sa fragilité surtout en présence de liquide où la pression exercée sur la membrane peut être importante.

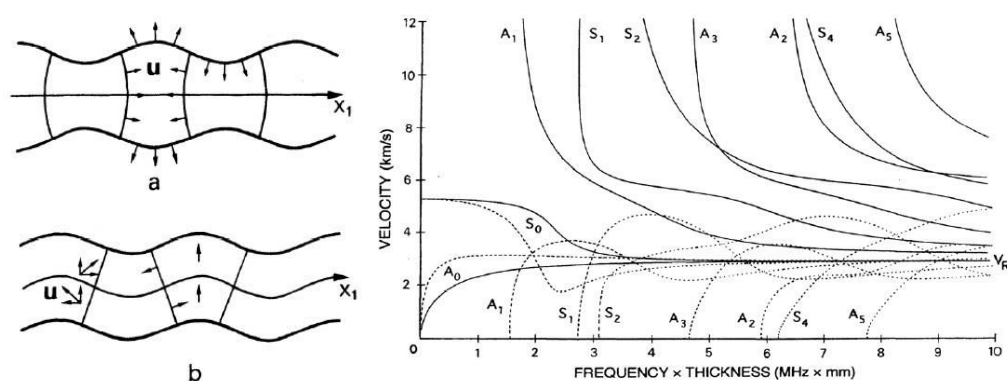


Figure 1.10: Propagation d'une onde de Lamb à déformation symétrique (a) et antisymétrique (b). Graphique représentant les vitesses des différents modes de Lamb en fonction du produit fréquence-épaisseur²⁹ (c)

1.3.3 Comparaison des dispositifs acoustiques

Parmi l'ensemble des dispositifs nous pouvons éliminer d'emblée les dispositifs à ondes de Rayleigh qui ne sont pas adaptés pour des mesures en milieu liquide. Les STW ont beaucoup de pertes et la couche sensible doit être située sur la face des électrodes, ceci étant peu recommandé en milieu liquide. Bien que les SH-APM puissent avoir la couche de détection sur la face opposée des électrodes, l'inconvénient est qu'ils ont une sensibilité limitée et que de nombreux modes sont excités simultanément à des fréquences proches. Parmi les FBAR, seuls les dispositifs à ondes de cisaillement peuvent opérer en milieu liquide, ils ont une bonne sensibilité mais leur procédé de fabrication est toutefois beaucoup plus complexe que pour les autres techniques.

Les capteurs LW ont des sensibilités élevées mais nécessitent une fine couche guidante pour confiner l'onde en surface, cette même couche permet aussi d'isoler les électrodes des liquides. Les capteurs à ondes de Lamb (ou FPW) sont propices aux mesures en temps réel

et ont l'avantage d'une très haute sensibilité. Par contre les ondes sont en partie atténuées en milieu liquide et la membrane nécessaire pour ces capteurs est très fragile. Enfin les TSMs ont l'avantage d'avoir une fabrication assez simple, même si leur sensibilité est plus limitée, ils fonctionnent parfaitement en milieu liquide et les électrodes (dans le cas d'une configuration d'excitation latérale) peuvent être séparées de la couche de reconnaissance.

Types de capteur	Types de déplacement	Gamme de Fréquence (MHz)	Sensibilité (cm^2/g)	Liquide	Ligne à retard ou Résonateur	Complexité de fabrication
TSM quartz (QCM)	Transverse	5 – 30	10 – 100	Oui	R	Faible
FBAR	Transverse	900 – 1000	400 – 700	Oui (Cisaillement)	R	Elevée
SAW (Rayleigh)	Vertical (transverse) et Longitudinal	30 – 500	100 – 500	Non	L ou R	Moyenne
SH-APM	Horizontal (transverse)	20 – 200	20 – 40	Oui	L	Moyenne
STW	Horizontal (transverse)	100 – 200	100 – 200	Oui	L ou R	Moyenne
LW	Horizontal (transverse)	100 – 200	150 – 900	Oui	L ou R	Elevée
FPW	Vertical (transverse) et Longitudinal	5 – 20	200 – 1200	Oui	L ou R	Elevée

Tableau 1.2: Caractéristiques générales des transducteurs acoustiques⁵⁶

Le Tableau 1.3 nous montre quelques caractéristiques de capteurs acoustiques provenant de diverses applications, on note que les applications avec les capteurs FBAR et LW ont de meilleures sensibilités. Les critères de coût et de simplicité de fabrication nous encouragent à étudier plus particulièrement les TSM.

Type de capteur	Fréquence d'opération (MHz)	Sensibilité en masse (cm ² /g)	Minimum détectable (ng/cm ²)	Bruit (Hz)	Application
QCM (QCM-D de Q-Sense)	5	11.3		0.3	Hybridation d'ADN57
TSM quartz (QCM)	10	54	5.2	1	Adsorption de couple anticorps-antigène (avidin anti-avidin BSA)46
FBAR (cisaillement)	790	741	2.3	864	
FBAR (longitudinal)	2000	468	21	15400	
FPW	1.5	200		1222	Antigène indicateur de cancer du sein (BrE-Ag) ⁵⁸
LW	89	950		12.5	Adsorption d'IgG de rat ⁵⁹

Tableau 1.3: Exemples de biocapteurs acoustiques^{46,57-59}

1.4 L'Arséniure de Gallium comme matériau piézoélectrique

1.4.1 Les propriétés de l'Arséniure de Gallium

L'une des originalités de ce projet réside dans l'utilisation de l'Arséniure de Gallium comme matériau de base du capteur. C'est un cristal semi-conducteur appartenant aux groupes III-V, il possède une structure cristalline zinc blende. Il est pourvu de bonnes propriétés optiques telle qu'une bande interdite (ou « gap ») directe. A l'inverse des semiconducteurs à bande interdite indirecte (Silicium, Germanium...), les matériaux à gap direct ont une probabilité de recombinaison radiative des porteurs de charges supérieure, c'est pourquoi ils sont privilégiés pour des applications d'émetteur de lumière. Le matériau est en effet très utilisé dans les domaines de l'optoélectronique intégrée notamment dans la fabrication de photodiodes ou de lasers⁶⁰. Il cumule de nombreuses autres propriétés encore peu exploitées mais toutes aussi intéressantes.

C'est également un matériau piézoélectrique sous sa forme de semi-isolant, dont les propriétés sont comparables à celles du quartz. Cette propriété va lui donner la possibilité de générer des ondes acoustiques par l'application d'un potentiel alternatif. Son coefficient de couplage, qui correspond au taux de conversion de l'énergie électrique en énergie mécanique, peut atteindre 6% contre 10% pour le quartz⁶¹ dans le cas d'ondes de volume en cisaillement d'épaisseur.

D'un point de vue mécanique, la dureté de l'AsGa est plus élevée que celle du Silicium mais moins que celle du Quartz. Par contre sa résistance mécanique est 1,5 fois plus importante que celle du Quartz mais deux fois moins que celle du Silicium. Malgré une

faible endurance mécanique, il bénéficie d'une résistance suffisante pour la majorité des applications micromécaniques⁶².

Avec ce matériau, nous disposons quasiment de l'ensemble des possibilités de microfabrication ou de miniaturisation du silicium, telles que les techniques de gravure sèche et humide, dopages, dépôt épitaxial ou de « bonding » (liaisons permanentes entre deux substrats).

1.4.2 Quelques exemples de biocapteurs à base d'Arséniure de Gallium

Plusieurs applications de biocapteurs utilisent l'Arséniure de Gallium comme matériau de base, la plupart de ces applications utilisent des méthodes de transduction électrochimiques. Ainsi, des JFETs en AsGa sont employés pour la détection de virus par l'intermédiaire d'une immobilisation de séquences peptidiques⁶³. Une autre approche existe, le MOCSER (« *molecularly controlled semiconductor resistor* »), utilisant également les jonctions FETs mais mesurant les variations du moment dipolaire de la couche moléculaire préparée à la place de l'électrode de grille⁶⁴. Wu⁶⁵ démontre l'efficacité d'un MOCSER pour la détection du monoxyde d'azote qui sont des molécules dans le système cardiovasculaire qui servent de défense contre les infections ou de régulateur de la pression artérielle. Il mesure les changements de résistivité dus à l'immobilisation du monoxyde d'azote (à une concentration inférieure à 1 μ M) sur une couche auto-assemblée d'hémine sur la surface de l'AsGa.

L'effet Hall a été utilisé⁶⁶ aussi comme moyen de transduction avec des dispositifs basés sur des hétérostructures de AlGaAs/InGaAs/GaAs pour la détection de brins d'ADN marqués par des microbilles magnétiques. Celles-ci sont immobilisées sélectivement sur la surface du biocapteur utilisant une hybridation spécifique de l'oligonucléotide complémentaire.

On trouve également des applications optiques utilisant notamment les techniques de photoluminescence pour la détection des bactéries *E. coli* sur des hétérostructures GaAs/AlGaAs épitaxiées⁶⁷. La limite de détection atteinte par ces dispositifs est de l'ordre de 10³ CFU/ml, en moins de 2h d'analyse.

O'Sullivan⁶⁸ a conçu un capteur miniature qui peut être implanté dans des animaux, et utilisant la détection par fluorescence. Le dispositif intégré est constitué d'une cavité laser émettant à 675nm, d'une diode PIN en GaAs et d'un filtre pour l'émission de fluorescence

permettant de détecter des biomolécules marquées par le fluorophore Cy5.5. Le capteur atteint une limite de détection de 50nM de molécules marquées *in vivo* et de 5nM *in vitro*.

1.5 Interface de reconnaissance biologique

1.5.1 Classification des biorécepteurs

Les biorécepteurs sont par définition des éléments biologiques (enzymes, cellules, tissus...) qui catalysent des réactions biochimiques ou interagissent avec des structures complémentaires modifiant les propriétés chimiques, physiques ou optiques d'un substrat. On peut classer les biorécepteurs en deux groupes (Figure 1.11) : ceux qui interagissent avec l'analyte, utilisés dans les biocapteurs d'affinité, et ceux qui reposent sur la réaction entre l'analyte et le biorécepteur, appelés biocapteurs catalytiques (ou enzymatiques). Dans ce dernier groupe, la biomolécule recherchée est dégradée, et ce sont les modifications des propriétés chimiques qui découlent de la réaction (diminution de la concentration d'un réactif, apparition d'un nouvel élément) qui sont détectées. Plus récemment, on pourrait ajouter une troisième catégorie, les récepteurs biomimétiques tels que les polymères à empreinte moléculaire⁶⁹. Ces derniers récepteurs peuvent combiner à la fois la fonction de reconnaissance d'un signal chimique et sa traduction en un signal électrique⁷⁰ cependant cette technologie est encore en phase de développement et la faible variété des molécules cibles possibles limite son utilisation. Nous présentons ci-dessous les trois catégories les plus communes de biorécepteurs : les enzymes, les acides nucléiques et les anticorps.

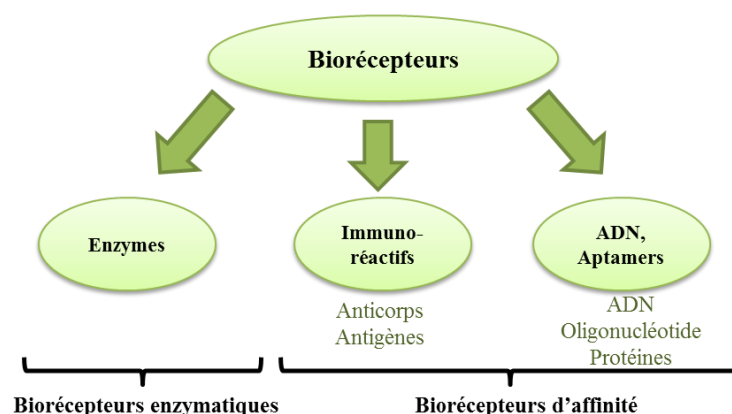


Figure 1.11: Classification des biorécepteurs

Les capteurs **enzymatiques** exploitent l'action d'une ou plusieurs enzymes dans le processus de détection, par exemple l'oxydoréductase qui est utilisée pour la détection de l'ascorbate⁷¹, du cholestérol⁷²... Elles possèdent un site actif qui leur confère la capacité de catalyser sur un substrat donné⁷³. De nombreux facteurs ont un impact sur la performance

des biocapteurs à base d'enzymes, comme l'utilisation d'un pH adapté, la température et dans certain cas, le type d'immobilisation choisi ainsi que la densité d'enzymes présentes sur la surface⁷⁴.

Les **acides nucléiques** peuvent être immobilisés sur un transducteur physique sous la forme d'un seul brin pour détecter un fragment d'ADN par hybridation ou en double brin pour les interactions avec les drogues synthétiques⁷⁵. Les biocapteurs basés sur l'ADN ou l'ARN ont une très grande sensibilité et sélectivité. Ceci est dû à l'affinité entre éléments complémentaires. A la grande différence des biorécepteurs protéiques, ils sont très robustes et spécifiques mais souffrent d'une perte d'efficacité de capture due à leur forte sélectivité.

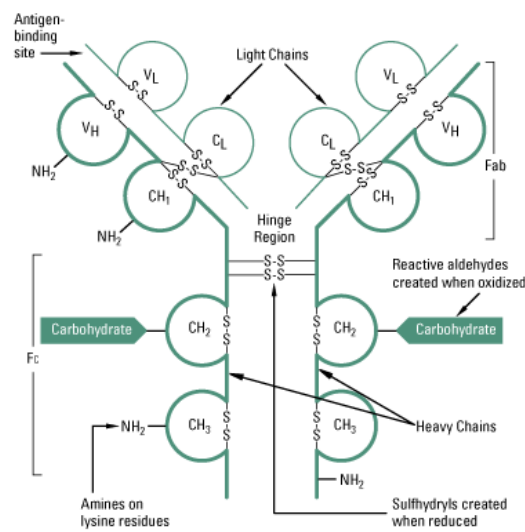


Figure 1.12: Représentation d'un anticorps⁷⁶

Un **anticorps** est une protéine de la famille des immoglobulines (Ig) utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes comme les bactéries, virus et protéines antigéniques. Ils ont la capacité de reconnaître et d'interagir de manière spécifique sur un antigène spécifique (virus, bactérie, hormone...). La masse moléculaire des anticorps varie entre 140 et 200 kDa⁴⁰. Ils sont composés de deux chaînes lourdes (environ 440 acides aminés chacune) et de deux chaînes légères (environ 220 acides aminés chacune). Les immoglobulines de type G, les plus abondants, ont une structure présentée sous la forme d'un Y qui peut se décomposer en deux parties : le Fragment *Antigen Binding* (F_{ab}) et le Fragment cristallisable (F_c). Il y a deux fragments F_{ab} variables et un fragment F_c qui est commun à tous les anticorps d'un même mammifère. Ces fragments, où sont organisés les acides aminés, comprennent de nombreuses fonctions carboxyles (-COOH), amines (NH₂), thiols (SH) et hydrates de carbones qui peuvent être

utilisées pour l'immobilisation à la surface du transducteur. Les régions variables du fragment F_{ab} (V_H et V_L) constituent les sites de reconnaissance (ou paratopes) de l'anticorps. Les forces joignant le complexe anticorps-antigènes ne sont pas covalentes (faible énergie de liaison), ce qui les rend réversibles. Les sites de combinaison des antigènes (épitopes) et des anticorps sont de petites portions constituées de quelques acides aminés, la surface de ces zones⁷⁷ est comprise entre 0.4nm^2 et 8nm^2 . Le mécanisme d'interaction entre les antigènes et les anticorps est le suivant : les forces de longues portées (centaine de nanomètres) ioniques et hydrophes attirent les deux entités l'une vers l'autre, elles dominent localement les énergies d'hydratation des deux biomolécules (l'eau est expulsée) puis les forces de van der Waals vont prédominer lorsque l'épitope et le paratope sont proches. Les interactions Ac-Ag sont dépendantes des paramètres de température, pH et force ionique de la solution environnante. Ces biorécepteurs d'affinité sont souvent associés aux transducteurs de variation de masse comme la microbalance à quartz⁷⁸ ou des transducteurs à résonance de plasmons de surface⁷⁹.

1.5.2 Techniques d'immobilisation

La méthode pour l'immobilisation de biorécepteurs est très importante car elle peut influencer la performance et le comportement de la biorecognition du capteur. Il est nécessaire de respecter plusieurs critères : le biorécepteur ne doit pas se désolidariser du substrat pendant l'activité de reconnaissance, il doit être stable dans le temps et doit résister aux modifications du milieu (température, pH...). De plus, il est important que la molécule immobilisée garde son activité biologique, une fois attachée sur la surface. Si elle comporte un ou plusieurs sites de capture, ils doivent être bien orientés pour conserver leur capacité de reconnaissance. Nous verrons plus tard, qu'il est essentiel de limiter les interactions non-spécifiques du substrat, or la méthode de greffage a un impact sur la non-spécificité du dispositif. Les méthodes d'immobilisation les plus courantes sont l'adsorption physique, le couplage covalent, le piégeage, la co-réticulation et la capture membranaire.

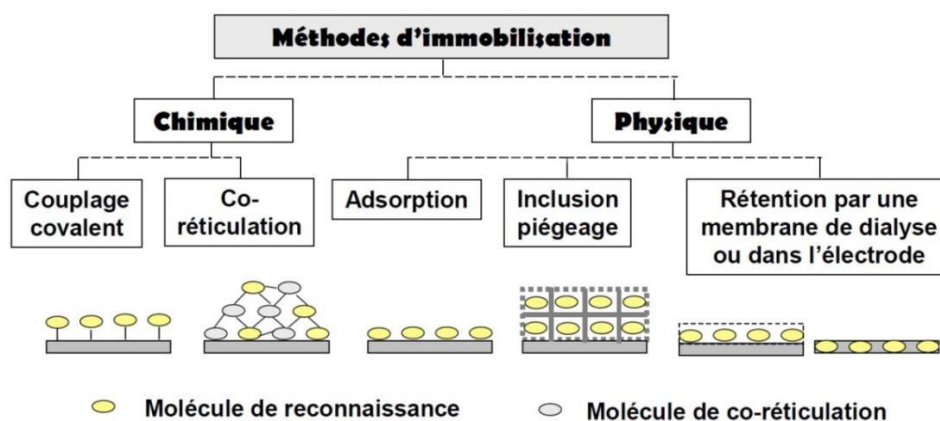


Figure 1.13: Méthodes d'immobilisation chimique et physique des biorécepteurs⁷³

La sélection d'une technique d'immobilisation appropriée dépend du domaine d'application, du type d'entité biologique à immobiliser, des propriétés physico-chimiques de l'analyte et même du transducteur utilisé. On note que pour l'immobilisation immunologique, les techniques d'adsorption physique et de greffage covalent sont souvent utilisées.

Éléments biologiques	Technique d'immobilisation	Transducteurs possibles	Domaines d'application
<ul style="list-style-type: none"> Cellules (bactéries, algues, cyanobactéries, levures) Organites (mitochondries, chloroplastes) 	<ul style="list-style-type: none"> Adsorption physique Inclusion/ Piégeage 	<ul style="list-style-type: none"> Optiques Piézoélectriques Thermiques (calorimétriques) Electrochimiques 	<ul style="list-style-type: none"> Agroalimentaire Environnement
<ul style="list-style-type: none"> Biomolécules (anticorps, enzymes, acides nucléiques) 	<ul style="list-style-type: none"> Adsorption physique Greffage covalent 	<ul style="list-style-type: none"> Piézoélectriques à ondes acoustiques (QCM, SAW...) Electrochimiques (Ampérométrie, Potentiométrie, Conductimétrie) Optiques (SPR, Infrarouge, Raman) 	<ul style="list-style-type: none"> Médical Agroalimentaire Environnement

Tableau 1.4: Applications et moyens de détection de différents types d'éléments biologiques⁸⁰

L'**adsorption**⁸¹ est une liaison à très faible énergie (van der Waals, force hydrophobe, liaison hydrogène...)⁸², elle est particulièrement utilisée pour les enzymes. Les conditions de liaison sont intimement liées à l'environnement extérieur ; en effet des modifications de la température, du pH, de la concentration ionique, le type de solvant peuvent causer la désorption de l'élément biologique de son support (bien que la plupart du temps l'adsorption de biomolécules soit quasi-irréversible).

La **co-réticulation**⁸³ est un procédé permettant la formation d'un réseau de protéines (à l'échelle moléculaire ou cellulaire...) assemblées par des liaisons covalentes au moyen d'agents de réticulation (glutaraldéhyde, hexaméthylène di-isocyanate...). Cette méthode présente cependant plusieurs inconvénients, comme par exemple la formation de multicouches d'enzymes qui affectent négativement l'activité d'immobilisation du dispositif. Les conditions de réaction, parfois trop agressives, peuvent également engendrer des modifications de l'intégrité de la structure et provoquer des pertes d'enzymes. De plus, cette technique d'immobilisation nécessite d'importantes quantités de matériel biologique.

Le **piégeage de molécules**⁸⁴ ou la rétention membranaire sont des méthodes généralement pratiquées pour l'immobilisation de cellules entières ou de micro-organismes en raison de leur taille importante. Les limitations de ce type de technique sont d'une part la possibilité de détachement des éléments biologiques pendant la reconnaissance et la faible reproductibilité des immobilisations.

Dans le cas des **liaisons covalentes**, la surface du capteur est chimiquement modifiée de façon à ce qu'elle acquière un groupe réactif permettant de fixer un élément biologique. Le couplage covalent peut éliminer de nombreux problèmes rencontrés avec les autres techniques telles que l'instabilité, l'agrégation des biomolécules ou la perte d'activité de reconnaissance⁸⁵. La fonctionnalisation chimique nécessaire pour ce type de fixation permet d'avoir un contrôle efficace de la densité, la reproductibilité, l'uniformité, et la distribution des biorécepteurs sur la surface. Les biomolécules telles que les enzymes et les protéines présentent de nombreux groupements fonctionnels utiles pour la fixation covalente ; cela inclut les groupements aminés (lysine), groupes carboxyles (aspartate, glutamate), sulfhydryle (cystéine), phénol, thiol, imidazole et hydrates de carbones. La liaison est généralement forte et ne sera pas rompue lors de la reconnaissance. Les réactifs chimiques utilisés pour le couplage covalent sont appelés *réactifs bifonctionnels*. Le choix des réactifs utilisés est déterminé par la nature de la surface d'immobilisation, le type de l'élément biologique à fixer et son orientation. Il est primordial de choisir une chimie adaptée dans le but de préserver au maximum l'activité de reconnaissance spécifique du biorécepteur. Les polysaccharides sont une catégorie de réactifs popularisés et développés par la firme GE Healthcare dans leur système de résonance plasmonique de surface (Biacore®). Ce sont des polymères (par exemple le Dextran) dont la structure permet une accroche covalente sur substrats solides et l'ajout de groupes fonctionnels leur permet l'immobilisation covalente de récepteurs. Dans certains cas ces réactifs bifonctionnels

s'arrangent sous la forme de monocouches, celles-ci sont appelées monocouches auto-assemblées (SAM). Elles se structurent par elles-mêmes, sans intervention externe, avec un haut degré d'organisation.

1.5.3 Stratégie de biorecognition

Selon l'application souhaitée, la sélection du biorécepteur est essentielle pour obtenir une bonne reconnaissance de l'élément biologique cible. Les critères décisifs sont l'efficacité de la biorecognition (spécificité, sensibilité), les conditions de détection, le type de biomolécules (protéine, ADN,...) et enfin le prix et la complexité du procédé.

Par rapport au modèle visé, c'est-à-dire la détection de pathogènes dans des eaux industrielles ou usées, le type d'élément biologique ciblé est la bactérie *Escherichia coli*. Les enzymes ne sont pas adaptées à la détection directe de cellules alors que les biorécepteurs d'affinités vont interagir plus spécifiquement au contact d'éléments biologiques plus complexes. Par rapport à d'autres récepteurs, tels que les acides nucléiques, les anticorps sont une solution intéressante et bon marché pour la capture des cibles biologiques.. Le défi est de pouvoir détecter ces organismes présents en très faible quantité dans un milieu complexe. Il faut donc opter pour une stratégie d'immobilisation des biorécepteurs optimale favorisant les interactions spécifiques et denses de l'antigène. Il est par conséquent important de sélectionner la bonne méthode d'immobilisation. Les différents avantages et inconvénients de chacune des techniques d'immobilisation sont résumés dans le Tableau 1.5.

A travers les caractéristiques de chacune des techniques d'immobilisation, le couplage covalent semble disposer de nombreux avantages et convenir à notre application. En effet, il permet l'immobilisation des anticorps de façon durable et efficace. L'orientation des anticorps est également un point clé pour la détection, puisque que le paratope doit être exposé directement vers l'analyte et les potentiels antigènes qu'elle contient. Le fait de pouvoir contrôler la densité des biorécepteurs permet, selon la taille et l'encombrement stérique de la biomolécule, d'optimiser leur interaction avec celle-ci.

Type	Technique d'immobilisation	Avantages	Inconvénients
Physique	Adsorption	Simple, bon marché, accessibilité des sites de liaison, utilisée pour les enzymes	Dépendance de l'efficacité de l'immobilisation par rapport au substrat, réversible, dépendance de la stabilité avec les paramètres environnementaux (pH, température...), formation d'agrégats, aucun contrôle de la densité de biorécepteurs
	Piégeage	Rapidité de l'immobilisation, large gamme de piégeages différents, employée pour les grosses biomolécules	Temps de réponse long, stabilité modérée, faible reproductibilité
Chimique	Co-réticulation	Pas de perte d'activité de la biomolécule, contrôle de la densité de biorécepteurs, utilisée pour les enzymes	Importante quantité de matière biologique nécessaire, immobilisation multicouche
	Liaison covalente	Haute efficacité et stabilité, contrôle de la densité de biorécepteurs, orientation des biorécepteurs possible, reproductibilité, liaison forte, employée pour les antigènes et les acides nucléiques	Utilisation de réactifs toxiques, distorsion éventuelle de la structure de l'élément biologique, plus complexe à mettre en œuvre

Tableau 1.5: Avantages et inconvénients des techniques d'immobilisation des biorécepteurs

1.6 Biofonctionnalisation de l'Arséniure de Gallium

1.6.1 Les monocouches auto-assemblées

Les molécules utilisées pour l'auto-organisation de monocouches sont constituées d'une fonction d'accroche sur le substrat, d'un espaceur et d'une fonction terminale. Le groupement d'accroche assure une liaison forte entre le substrat et la molécule constituant la monocouche, il peut modifier les propriétés électriques, chimiques, ou optiques de la surface. Les surfaces à base de silice réagissent avec des composés silanes ($-\text{Si}(\text{OR})_3$ trichlorosilanes ou $-\text{SiCl}_3$ trialkylsilanes) et les surfaces métalliques (Or, Argent, Platine...) réagissent avec les alkanethiols ($-\text{SH}$)⁸⁶. L'utilisation préférentielle d'un groupement

d'accroche se fera en fonction des propriétés électriques et chimiques désirées ainsi que de la stabilité de la couche.

L'espaceur aura un impact direct sur l'épaisseur de la couche et sur son organisation. Il constitue une barrière physique qui limite les interactions avec le substrat. L'espaceur peut être constitué de chaînes de différentes longueurs et de différentes natures : chaînes alkyles ($(\text{CH}_2)_n$), polyéthylènes glycol (PEG) $(\text{CH}_2\text{-O-CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{OH}$, cycles aromatiques... On peut toutefois ajouter qu'en général, les chaînes les plus longues, qu'elles soient alkyles ou autres, auront une cristallinité et une stabilité plus élevées⁸⁷.

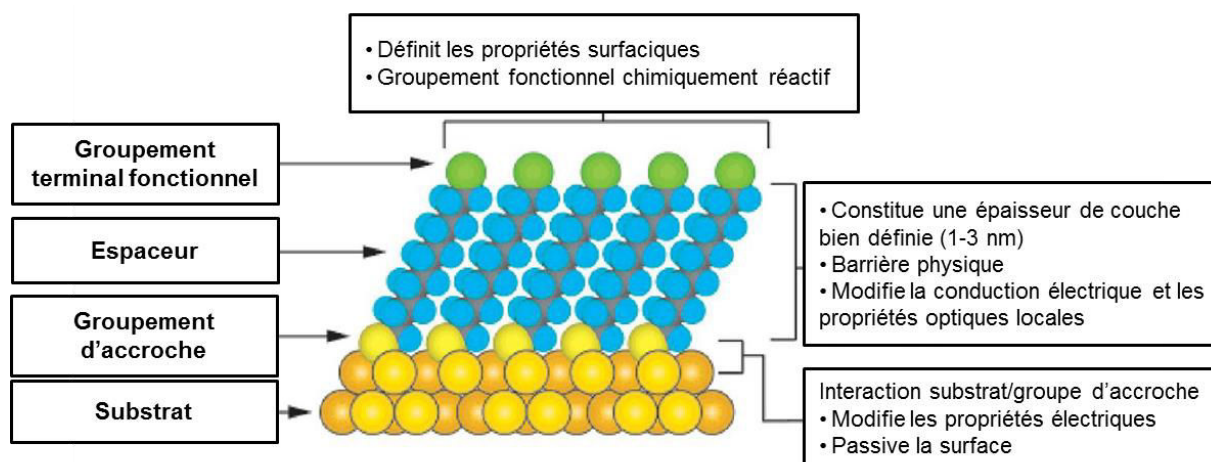


Figure 1.14: Schéma représentant la structure d'une monocouche auto-assemblée⁸⁷

La fonction terminale de la molécule va conférer de nouvelles propriétés surfaciques au substrat. C'est cette fonction qui réagira avec le biorécepteur. Parmi les fonctions les plus courantes, on trouve les groupements alkyle ($-\text{CH}_3$), carboxyle ($-\text{COOH}$), hydroxyle ($-\text{OH}$), amine ($-\text{NH}_2$), thiol ($-\text{SH}$) ou encore biotine.

L'immobilisation de la protéine (ou de l'anticorps dans notre cas) s'effectue via les groupements fonctionnels portés par les acides aminés particuliers de la protéine ou par des fonctions conjuguées sur celle-ci. Il est donc nécessaire d'avoir une fonction terminale de la monocouche réactive directement avec celle de la protéine ou via un intermédiaire. L'orientation de l'anticorps est également un élément important pour la réaction anticorps-antigène, elle peut être maîtrisée par l'utilisation d'un groupe fonctionnel terminal adapté. Pour que les paratopes de l'antigène soient orientés dans la bonne direction, Lebec et al.⁸⁸ montrent que des molécules terminées par un groupe COOH activé sont favorables à une bonne immobilisation de l'antigène en réagissant avec un de ces groupes amines. Les SAMs peuvent être formées en phase liquide ou gazeuse. La procédure de formation de

monocouches en phase liquide, consiste à immerger une surface dans une solution où sont diluées dans un solvant, des molécules pouvant s'auto-assembler (alkanethiols, alkylsilanes...). Au départ les molécules s'adsorbent facilement sur la surface pour ensuite s'auto-organiser lentement (plusieurs dizaines d'heures selon le type de molécules) et former des structures à haut degré d'organisation. Elles disposent d'une grande affinité entre elles leur permettant de s'assembler d'elles-mêmes. Cependant la préparation de SAM de qualité nécessite un contrôle absolu des paramètres du procédé. De nombreux solvants⁸⁹⁻⁹¹ peuvent être utilisés, les solutions doivent être généralement pures et dépourvues de toutes autres particules, l'incubation de l'échantillon doit se faire idéalement en l'absence de lumière. Les paramètres de concentration^{92,93}, de temps d'incubation^{92,93}, de température^{94,95} sont également essentiels. Si ces éléments ne sont pas bien définis, l'auto-assemblage risque d'engendrer des défauts structurels voire même de ne pas s'organiser.

1.6.2 Formation de SAMs d'alkanethiols sur Arséniure de Gallium

La surface de l'Arséniure de Gallium peut immobiliser des biorécepteurs, par les méthodes d'adsorption, de piégeage ou de couplage covalent. Nous avons vu que la SAM est une stratégie d'immobilisation de choix car elle permet de passiver la surface du matériau tout en proposant une forte densité de sites d'accroches pour les biorécepteurs. De plus, c'est un procédé qui est simple à mettre en place et, selon le type de molécules, peut être réalisé à moindre coût. L'auto-assemblage est une technique produisant beaucoup moins d'effluents de solvant que les méthodes de dépôt par « spincoating ». En revanche, les molécules solubilisées peuvent rarement être ré-utilisées, dû à une détérioration de celles-ci au cours du temps. Les SAMs peuvent conférer à un substrat des propriétés d'anti-adsorption⁹⁶, anti-encrassement⁹⁷, anticorrosion⁹⁸⁻¹⁰⁰ ou elles peuvent être utilisées pour modifier les tensions de surface du matériau¹⁰¹. Une surface non-protégée de GaAs peut relâcher des métaux lourds, tels que les AsOx, toxiques pour les cellules vivantes¹⁰². Or, certaines molécules utilisées en SAM permettent de rendre la surface d'arséniure de gallium moins toxique, même biocompatible¹⁰².

Les architectures à base d'alkanethiols sont probablement les plus utilisées pour fonctionnaliser les surfaces métalliques¹⁰³. Il a déjà été rapporté plusieurs fois dans la littérature qu'il est possible de former des SAMs de thiols sur GaAs avec une qualité d'organisation similaire à ce qu'il est possible d'obtenir sur substrat or¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Les SAMs sur GaAs ont beaucoup été utilisées et étudiées pour des applications dans le domaine de la

microélectronique et de la photonique^{107,108} notamment pour passiver la surface du matériau^{109,110}. Effectivement, une couche d'oxyde composée de Ga_2O , Ga_2O_3 , As_2O_3 , As_2O_5 et GaAsO_4 ¹¹¹, se forme naturellement sur la surface de l'Arséniure de Gallium. Ainsi en désoxydant au préalable cette surface, il devient possible de former des monocouches de thiols équivalentes à celles obtenues sur substrat or. Les travaux de Voznyy et Dubowski¹¹² ont permis de mieux comprendre les interactions entre les thiols et ce substrat. Ils en ont déduit que l'atome de soufre se lie préférentiellement à l'atome de gallium même si l'Arsenic et le Gallium constituent tous deux des sites potentiels pour l'immobilisation. Cette affinité avec le réseau cristallin de l'Arséniure de Gallium ne va pas forcément correspondre avec la cristallinité habituelle de la monocouche de thiols et probablement induire des défauts ponctuels au sein de celle-ci^{112,113}. McGuiness¹¹⁴ montre l'influence des plans cristallins de l'Arséniure de Gallium sur la formation de la monocouche d'octanethiol ; il observe la formation d'une structure de forme hexagonale pour les plans (111)As et (111)Ga et pseudo-hexagonale pour les plans (100) et (110). La procédure de formation de la monocouche passe par une désoxydation totale de la surface du cristal. Il existe différentes chimies pour désoxyder la surface du GaAs : solutions d'acides (HCl , H_3PO_4 ou H_2SO_4) ou de bases (NH_4OH). Contrairement au NH_4OH , les acides semblent modifier la stœchiométrie de la surface, en effet ils laissent plus particulièrement des surfaces riches en arsenic¹¹⁵, ce qui n'est pas favorable à une bonne organisation de la SAM. De plus, une surface riche en arsenic est extrêmement réactive et absorbe rapidement les contaminants de l'air ou ceux des solutions de rinçage^{116,117}.

1.6.3 Stratégie d'immobilisation

Les immunorécepteurs ont une taille, au minimum, d'un ordre de grandeur supérieur aux molécules utilisées dans les SAMs. Les anticorps, utilisés comme récepteurs biologiques dans notre cas, ont une taille évaluée à 10-20nm¹¹⁸, tandis que les molécules utilisées pour la SAM ont une longueur de l'ordre de 1 à 3 nm¹¹⁹. Ainsi un anticorps peut recouvrir jusqu'à 20 thiols. Cela signifie que la majorité des thiols présents en surface ne formeront pas de liaison covalente avec le récepteur bien que plusieurs thiols peuvent réaliser une liaison avec différents groupements amine de l'anticorps. Dans le but de faciliter l'immobilisation des récepteurs, de favoriser leur mobilité relative, d'améliorer la stabilité, la reproductibilité, et d'éviter les absorptions non-spécifiques sur la surface¹²⁰⁻¹²⁴, il est proposé d'utiliser une architecture dite « mixte ». Les architectures mixtes offrent beaucoup d'avantages pour des applications d'immunocapture. Il existe de nombreuses

possibilités où les critères tels que la distribution, l'accessibilité ou la fonctionnalité peuvent être définis par le choix des molécules employées dans la SAM. Certaines études sur la formation de SAMs mixtes sur substrat or ont révélé une augmentation par rapport à une SAM monomoléculaire, du nombre d'anticorps greffés sur ces surfaces^{123,124}. Généralement ces architectures sont composées de molécules « linker » permettant d'immobiliser les récepteurs, diluées avec d'autres molécules appelées « spacer » qui vont prévenir les adsorptions non-spécifiques sur la surface^{120,124,125}. L'alkanethiol utilisé comme « spacer » permet d'éviter l'encombrement stérique lié à l'immobilisation des anticorps. En effet, l'utilisation de « linker » dotés de chaînes plus longues que les « spacer » va permettre, dans le cas idéal, de rendre plus accessible les groupes de tête nécessaires à l'immobilisation des bio-récepteurs. L'utilisation d'un couple « spacer » / « linker » optimal est déterminé pour offrir le plus de degrés de liberté aux « linker » tout en évitant leur repliement. Cela aura pour conséquence de greffer une plus forte densité d'anticorps sur ce type d'architecture que sur des SAMs homogènes¹²⁶. Ce type d'effet a été étudié au sein de notre équipe de recherche notamment pour la fonctionnalisation des substrats de GaAs destinés à l'immobilisation de couche protéique^{127,128}. Les architectures mixtes étudiées sur or^{129,130}, ont mis en évidence la dépendance des propriétés de tension de surface en fonction de la longueur de chaîne alkyle, du groupe fonctionnel et du ratio entre les thiols utilisés. Dans une monocouche bi-structurée, on peut obtenir aussi bien des conformations simples avec une distribution et répartition homogène des molécules que plus complexes par la formation d'îlots de taille micro- ou nanométrique¹²⁹. La plupart du temps les monocouches mixtes sont élaborées à partir du mélange en solution des composés d'intérêts. La composition de la SAM ne va pas forcément refléter le rapport de concentration des molécules en solution¹³⁰. Une fois mélangées, les molécules peuvent avoir un comportement différent lors de leur auto-organisation sur la surface. D'où l'intérêt de caractériser les SAM mixtes afin d'établir une corrélation entre les pourcentages de thiols en solution et leur pourcentage sur la SAM constituée.

Différentes architectures seront étudiées dans ces travaux. L'approche de fonctionnalisation la plus utilisée est composée des deux alkanethiols suivants (Figure 1.15a) :

- L'acide 16-mercapto-1-hexadécanoïque (ou MHDA) constitué d'une chaîne de 16 carbones et d'un groupe terminal carboxyle. Sa formule linéaire est : $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{COOH}$.

- Le 11-mercapto-1-undecanol (ou MUDO) constitué d'une chaîne de 11 carbones et d'un groupe terminal hydroxyle. Sa formule linéaire est : $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{OH}$.

L'acide carboxylique est utilisé pour assurer un lien covalent avec l'anticorps (liaison amide), tandis que les thiols à terminaison hydroxyle permettent de passer le substrat et d'espacer les MHDA. La liaison covalente avec l'acide carboxylique est réalisée avec un des groupements amines de la protéine après une procédure dite d'activation du COOH. La différence de longueur de chaîne (15 méthylènes pour le MHDA et 11 pour le MUDO) permet de faciliter les interactions avec les protéines. Frederix et al. ont montré qu'une architecture mixte constituée de 95% de MUDO et 5% de MHDA donne une meilleure couverture d'anticorps¹²⁴ qu'avec des SAMs de MHDA pur. Par comparaison avec d'autres groupes terminaux (CH_3 , COOH , NH_2 , PheOH), il a été montré également que les thiols à terminaison hydroxyle limitent beaucoup plus les interactions non-spécifiques¹³¹. Il aurait été possible avec une architecture composée uniquement de molécules de MHDA, d'effectuer une étape de blocage des sites actifs par des protéines (BSA, par exemple) après immobilisation des anticorps. Cette stratégie permet d'éviter effectivement la non-spécificité pendant un certain temps mais n'est pas viable à long terme à cause de la dénaturation des protéines bloquantes au cours du temps¹³².

La seconde architecture (Figure 1.15b) est constituée à nouveau de MHDA mais cette fois-ci combiné avec l'alkanethiol suivant :

- Le 1-dodecanethiol (ou DDT) constitué d'une chaîne de 12 carbones et d'un groupe terminal méthyle. Sa formule linéaire est : $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CH}_3$

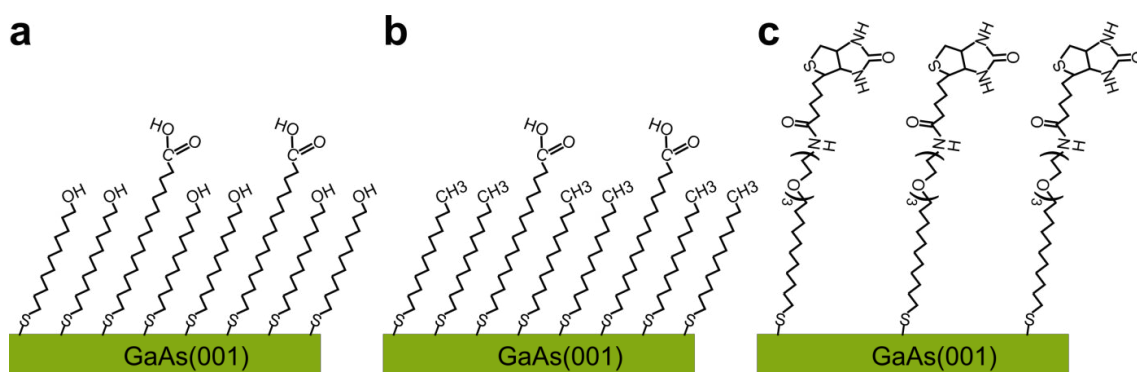


Figure 1.15: Architecture de SAM constituée de (a) MHDA/MUDO, (b) MHDA/DDT et (c) thiols PEG-biotin

Plus en marge, quelques études seront également effectuées sur l'architecture homogène (Figure 1.15c) dotée de l'alkanethiol suivant :

- Thiol polyéthylène glycol biotinylé (ou PEG-biotin) constitué d'une chaîne alkyle de 11 carbones, d'une chaîne de 3 éthylènes glycols et du groupe terminal biotine. Sa formule est HS-(CH₂)₁₁-EG3-Biotin.

Cette dernière utilise une autre stratégie d'immobilisation des anticorps et nécessite l'utilisation d'une protéine intermédiaire (Avidin, NeutrAvidin ou StreptAvidin) et d'anticorps conjugués avec de la biotine. L'avidine revêt une propriété de contrôle de l'orientation de l'anticorps contrairement aux autres techniques. Les interactions NeutrAvidin et biotine sont très fortes (même si non-covalentes) et très spécifiques rendant cette fonctionnalisation intéressante pour la réalisation de biointerfaces robustes^{133,134}. Le prix élevé de ces composés, face aux précédentes stratégies, reste toutefois le principal facteur limitant pour cette approche. De façon à conserver la même gamme de prix entre chaque fonctionnalisation, nous réduirons la concentration des molécules utilisées pour former cette architecture.

1.6.4 Immobilisation des anticorps

Le principe d'activation de l'acide carboxylique pour la formation d'une liaison covalente avec un groupement amine est détaillé dans cette partie (Figure 1.16) et concerne les architectures composées d'un acide carboxylique (MHDA). Dans un premier temps, la molécule d'EDC (1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide) forme, avec les groupements carboxyles, un composé intermédiaire o-acylisourea qui peut réagir avec un groupement d'amine primaire (-NH₂) pour former une liaison amide^{135,136} (après réaction, l'EDC est libéré dans la solution sous forme de dérivés d'urée). L'o-acylisourea est un intermédiaire très instable en solution aqueuse; si ce composé ne réagit pas rapidement avec l'amine primaire, il peut facilement s'hydrolyser pour retrouver sa forme carboxyle. Pour cette raison un autre composé est utilisé en conjonction de l'EDC, le N-hydroxysuccinimide (NHS) ou son analogue le sulfonate de NHS (Sulfo-NHS). Les esters de NHS sont relativement stables par rapport à l'hydrolyse¹³⁷ et sont moins labiles que l'o-acylisourea, ce qui permettra de conjuguer l'amine primaire à pH physiologique. A la différence du NHS, le Sulfo-NHS va préserver ou augmenter la solubilité du carboxylate à l'eau, grâce aux charges négatives du groupe sulfonate¹³⁵. Les groupements amines primaires sur les anticorps sont répartis essentiellement aux extrémités des chaînes N-terminal ou sur les résidus de lysine distribués sur l'ensemble de l'anticorps⁷⁶. Une fois les anticorps immobilisés, il est nécessaire de bloquer tous les groupes carboxyles n'ayant pas réagi avec une amine primaire de l'anticorps avec de l'éthanolamine. L'éthanolamine va

également former une liaison amide avec les acides carboxyliques de la SAM. Par sa petite taille, elle va s'insérer dans les interstices où les anticorps n'ont pas pu se greffer du fait de leur encombrement. Les sites actifs restant seront protégés par la fonctionnalisation hydroxyle de l'éthanolamine.

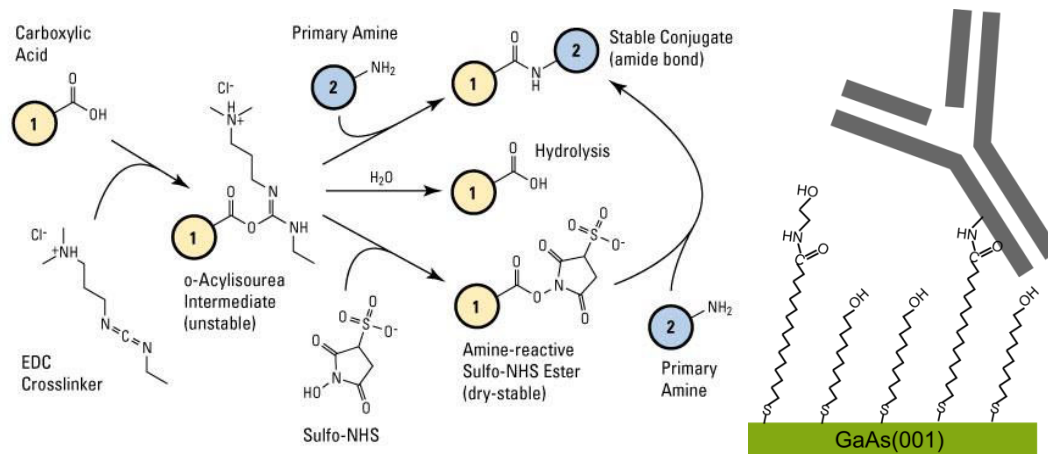


Figure 1.16: Principe d'activation des groupes carboxyle pour la formation d'une liaison amide avec une amine primaire¹³⁵ et schéma d'une biointerface MHTA/MUDO après activation, immobilisation des anticorps et désactivation des sites actifs restants

Pour ce qui est de l'architecture à terminaison biotine, le protocole est différent et nécessite l'utilisation d'anticorps biotinylés. La NeutrAvidin, une forme modifiée de l'avidine (protéine de blanc d'œuf d'oiseaux), est utilisée comme intermédiaire. Les avidines ou leurs dérivés ont une très forte affinité avec la biotine, sa constante de dissociation est de l'ordre de $K_d \approx 10^{-15} \text{ M}$ ¹³⁴. A la différence de l'avidine, la NeutrAvidin a un point isoélectrique (pI) plus faible (pI de 10 pour l'avidine tandis qu'il est de 6.3 pour la NeutrAvidin dans un tampon phosphate salin) éliminant les problèmes de liaison non-spécifique de l'avidine ce qui en fait la meilleure protéine pour les interactions avec la biotine¹³³. Des anticorps biotinylés sont ensuite immobilisés via une nouvelle interaction Biotine-NeutrAvidin. La BSA (Sérum d'Albumine de sérum bovin) est ensuite employée pour bloquer les sites de NeutrAvidin qui n'ont pas interagi avec un anticorps¹³².

1.7 Techniques de régénération

Dans le but de réduire le coût global d'utilisation du capteur, il est important d'envisager la possibilité de régénérer ce dernier. En effet, le coût de fabrication d'un capteur unitaire sera amorti d'une part par la production en lot mais également par la ré-utilisation des dispositifs. La régénération ouvre également des perspectives intéressantes dans la

récupération des éléments biologiques pour réaliser par exemple une analyse secondaire de ces éléments. Nous allons présenter dans cette partie, les différentes techniques de régénération employées à l'état de l'art, de façon à sélectionner celles permettant de préserver autant que possible la nature, le volume et la qualité du substrat régénéré. Nous pouvons classer ces méthodes en deux catégories : celles qui agissent à bas niveau sur le ligand et celles qui permettent de séparer l'élément biologique du biorécepteur. Enfin nous verrons plus succinctement les architectures d'auto-régénération.

1.7.1 Désorption de SAM d'alkanethiols

Les alkanethiols sont couramment utilisés pour la formation de SAM sur substrats métalliques ou sur certains semi-conducteurs de par leur facilité d'immobilisation et la forte liaison que peut avoir le soufre avec les molécules en surface procurant une stabilité appréciable de la SAM. On peut classer les techniques de régénération/désorption de SAM en deux catégories, celles opérées en milieu liquide et celles en milieu gazeux. Elles ont été développées pour nettoyer et régénérer les surfaces fonctionnalisées essentiellement sur substrat or¹³⁸⁻¹⁴² mais également sur cuivre, argent^{143,144}, InP¹⁴⁵ ou encore GaAs¹⁴⁶⁻¹⁵⁰. La résilience des alkanethiols sur or ou encore plus sur GaAs (énergie de liaison des thiols supérieure sur GaAs que sur or ou cuivre) rend le mécanisme de régénération relativement complexe car il est nécessaire de rompre la liaison thiol-substrat.

Les techniques en milieu gazeux comprennent, la désorption thermique^{140,146,151-154}, laser¹⁵⁵⁻¹⁵⁹, plasma^{141,160}, bombardement ionique¹⁴⁴, ou encore par photo-oxydation UV^{148-150,161-164}. La désorption thermique est une méthode relativement simple mais nécessite de hautes températures (au-delà de 200°C) pour ôter complètement la monocouche de thiols^{138,154}. C'est donc un processus qui risque d'endommager le matériau ou la plateforme de détection¹⁵². Sur GaAs, il a été montré que les alkanethiols commencent à se désorber lorsque la température excède 80°C¹⁶⁵. Il est possible de désorber les molécules en surface par effet thermique induit par laser^{156,158,159}, permettant une régénération locale de la surface ce qui facilite le patterning. L'inconvénient de cette dernière technique est la difficulté de déterminer la bonne énergie pour affecter suffisamment la SAM sans dépasser le seuil d'ablation du matériau. Les plasmas, souvent H₂, O₂, H₂O ou ozone, permettent à la fois d'oxyder la surface et de la graver simultanément^{141,160}. Les plasmas oxygène ou ozone provoquent une forte oxydation du substrat et des thiols, ce qui rend la surface particulièrement contaminée en sulfate et sulfonate dû à la ré-adsorption des molécules

après traitement¹⁴¹. En revanche, le plasma hydrogène n'oxyde pas la surface et semble très efficace pour la régénération de surface couverte de thiols. Le principal inconvénient des techniques plasma est qu'elles ne traiteront pas uniformément la surface de l'échantillon (effet de bords) et produiront une désorption hétérogène. La photo-oxydation UV est une technique relativement efficace, elle nécessite toutefois la maîtrise de l'environnement d'exposition, sans quoi il sera difficile de conserver une bonne reproductibilité du traitement. L'utilisation d'une chambre à atmosphère contrôlée reste la meilleure solution mais nécessite une mise en œuvre plus complexe. La nature de ce phénomène est encore sujette à discussion. Les utilisateurs de cette technique emploient essentiellement des lampes à mercure émettant dans les gammes UV-A, B et C et appliquent la photo-oxydation de SAMs sur substrat or¹⁶¹⁻¹⁶⁴, sur l'argent¹⁴³ et même sur GaAs¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

En milieu liquide, la technique de désorption la plus répandue est électrochimique, les thiols se désorbent (désorption réductrice) lorsque un potentiel négatif est appliqué au substrat immergé dans une solution aqueuse avec un électrolyte à pH neutre ou basique^{142,166-168}. L'inconvénient de cette technique est qu'une partie des thiols proches de la surface est réadsorbée sur le substrat lors de la réaction, particulièrement si ce sont des thiols à longues chaînes alcanes¹⁶⁷, entraînant un temps de traitement relativement long. De plus cette méthode ne peut être appliquée à des substrats non-métalliques comme le GaAs. Les techniques par attaque chimique humide sont également très utilisées et particulièrement variées^{138,145,169}. Elles sont plus simples à mettre en place, ne nécessitent pas d'équipements sophistiqués et peuvent être appliquées directement sur site. La plupart du temps, les solutions combinent un fort agent oxydant avec un acide ou une base. On peut trouver dans la littérature associée, l'utilisation de solutions telles que le piranha ($H_2O_2-H_2SO_4$), $H_2O_2-NH_4OH$ ¹³⁸, ou encore des solutions à base d'acide sulfochromique ($H_2SO_4-H_2CrO_4$)¹⁶⁹. Même si ces solutions peuvent être agressives, elles s'avèrent également particulièrement efficaces pour la régénération. Nous l'avons vu plus haut, la désorption par photo-oxydation est une technique efficace quoique difficile à maîtriser dans un environnement variable. Johnson et Mutharasan ont proposé une méthode de désorption d'alkanethiols sur or par photo-oxydation UV en milieu liquide¹³⁹. Les auteurs ont réalisé ce procédé en immergeant les échantillons fonctionnalisés dans une solution de peroxyde d'hydrogène concentrée tout en les exposant à une source UV (lampe à mercure). Cela a pour effet d'offrir une désorption beaucoup plus rapide et plus reproductible

qu'avec une photo-oxydation en air et sans toutefois altérer le matériau comme les techniques par attaque chimique pourraient le faire.

1.7.2 Ré-initialisation des biorécepteurs

La ré-initialisation des biorécepteurs est une stratégie permettant de dissocier le biorécepteur de l'élément biologique capturé, sans toutefois affecter l'architecture de capture. Elle consiste à vaincre les forces attractives entre le biorécepteur et l'analyte. La procédure de régénération en est donc écourtée et facilitée, elle est en revanche plus difficile à maîtriser et dépend fortement des affinités des liaisons anticorps-antigènes, entre acides nucléiques, récepteurs/ligands... D'un point de vue thermodynamique, on peut considérer les forces, liant le biorécepteur à l'analyte, comme enthalpique et entropique. Les interactions enthalpiques sont définies comme l'énergie totale du système thermodynamique. Cette énergie peut être décomposée en dégagement de chaleur (énergie cinétique) et en liaisons chimiques, ioniques ou charges polaires (énergie potentielle). L'énergie potentielle du système tend à être minimisée, celle-ci est extrêmement dépendante des caractéristiques du solvant environnant telles que sa force ionique ou son pH.

Pour les interactions entropiques, la seconde loi de la thermodynamique définit l'entropie d'un système comme un phénomène qui va le rendre toujours plus désordonné permettant de diminuer l'énergie potentielle de celui-ci. La diminution de l'entropie du système « biointerface » est causée par la liaison de l'analyte avec le récepteur. Dans certains cas, l'entropie est augmentée après la liaison du couple analyte/récepteur particulièrement lorsque l'analyte est partiellement ou totalement hydrophobe. Cela peut être expliqué, dans ce cas, par le recouvrement des molécules d'eau autour des sites hydrophobes à l'interface du solvant. Au moment de la liaison, les molécules d'eau sont libérées dans la solution induisant une augmentation de l'entropie globale.

La nature du solvant environnant la surface du capteur est un paramètre clé pour déterminer la liaison analyte/biorécepteur. Par altération ou modification chimique de ce solvant, on peut donc procéder à la régénération du couple récepteur/analyte. La technique la plus utilisée est probablement la régénération acido-basique qui consiste à utiliser un tampon avec un pH très faible ou très élevé¹⁷⁰, mais toutefois compris entre pH 2.5 et pH 11 pour éviter la dénaturation des biorécepteurs¹⁷¹. Cela amène au changement de l'enthalpie du système par la modification des charges entre l'analyte et les biorécepteurs et contribue à changer la force ionique de la solution. Le premier inconvénient de la

méthode est qu'elle est difficile à utiliser pour des systèmes dont la détection est électrochimique car elle risque d'affecter la mesure. De plus, elle n'est pas compatible pour la régénération de biorécepteurs fragiles pouvant être dénaturés de façon irréversible.

Les détergents peuvent être également utilisés à faible concentration et jouer un rôle clé dans la régénération d'interactions hydrophobes. Ils sont constitués d'une partie polaire (tête) très soluble et d'une queue aliphatique non-polaire donc hydrophobe qui va interagir avec les régions hydrophobes du biorécepteur ou de l'analyte. Le groupe terminal polaire va donc minimiser les répulsions et encourager la solubilité de l'analyte. Parmi les plus utilisés pour la solubilisation de protéines : le Tween20 (détergent doux non-ionique)¹⁷² ou le Sodium Dodecylsulfate (détergent abrasif ionique)¹⁷³. Ils ont l'avantage d'éviter une forte modification du pH de la solution mais il a été montré que des surfactants comme le SDS peuvent endommager la monocouche auto-assemblée¹⁷⁴.

Le SDS est considéré comme agent chaotropique et par conséquent à forte concentration, il a tendance à dénaturer les protéines. Le Triton X-100 ou le Tween20 sont souvent utilisés à la suite du SDS pour le neutraliser. De la même façon d'autres agents chaotropiques, tels que l'urée¹⁷⁵ ou le diméthylsulfoxyde (DMSO)¹⁷⁶, EDTA¹⁷⁷, peuvent être utilisés pour augmenter l'entropie du complexe biorécepteur-analyte et favoriser leur régénération.

La glycine est un acide aminé présentant deux régions, l'une chargée positivement (NH_3^+) l'autre négativement, et a un pKi compris entre 2 et 7. Elle agit comme un filtre pour les charges interfaciales (aide à réduire les forces enthalpiques). Tout comme la modification acido-basique, la glycine, peut avoir un impact non-négligeable sur les capteurs électrochimiques ou sur les protéines fragiles¹⁷⁸.

La température peut avoir un impact sur le comportement des biomolécules notamment sur leur énergie cinétique et ainsi surpasser la force de l'interaction. Cependant la plupart des protéines sont dénaturées à température trop élevée, cette méthode est utilisable exclusivement avec les biorécepteurs nucléotidiques¹⁷⁹.

De la même façon que pour la désorption de SAM, il est également possible de réaliser une régénération protéique électrochimique en appliquant un potentiel négatif ou positif sur la biointerface. La polarisation va être dépendante du pH de la solution et le pI des molécules greffées. La littérature sur ce type d'application reste succincte¹⁸⁰, beaucoup d'autres phénomènes peuvent entrer en jeu d'autant plus que si l'architecture de la biointerface combine une SAM et des protéines, il sera difficile de discriminer les deux parties.

Pour les architectures de biointerface utilisant le couple biotine/avidine (ou dérivé(s)), l'utilisation de la guanidine (pH 1.5 et à température ambiante) permet la dissociation des

deux entités¹⁸¹. La dissociation a également été montrée dans une solution aqueuse non ionique à une température supérieure à 70°C¹⁸².

1.7.3 Architecture auto-régénérable

Les deux catégories précédentes, à savoir le retrait des récepteurs uniquement ou de la monocouche et des biorécepteurs ne sont pas les seules possibilités pour régénérer les biointerfaces. Une alternative serait de constituer une interface en y ajoutant des éléments facilitant leur retrait, à titre d'exemple, Yoon et al. utilisent des dendrimères poly(amine) (PAMAM) conjugués avec de la d-desthiobiotin¹⁸³ présentant une moins forte affinité à la streptavidine ($5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$) que la biotine ($1 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$). Après interaction de la surface greffée de PAMAM avec la streptavidine, il est possible de dissocier cette dernière en y ajoutant de la biotine¹⁸³. On pourrait imaginer utiliser ce type d'architecture avec des anticorps également conjugués à la desthiobiotine et pouvoir régénérer le couple streptavidine/anticorps ou par la même occasion, changer le type de reconnaissance (par exemple modifier l'anticorps).

1.7.4 Stratégie employée sur GaAs

Les stratégies énoncées précédemment sont envisageables pour régénérer nos capteurs, elles présentent toutefois chacune leur lot d'avantages et d'inconvénients.

L'utilisation de températures ou de pH extrêmes, d'agents chaotropiques pour dissocier les complexes anticorps-antigènes sont souvent suivis d'une perte de l'activité biospécifique. Il est possible de sélectionner des complexes Ag-Ac avec un taux de dissociation facilitant la régénération. Cependant, un fort taux de dissociation est souvent associé avec une faible affinité ou sensibilité, ce qui aurait pour conséquence d'amoindrir les performances du capteur. Pour cette raison essentiellement, la régénération du niveau protéique seul n'est donc pas une stratégie envisagée dans ce travail, même s'il nécessite moins d'étapes que pour régénérer la totalité de la biointerface.

Nous opterons donc pour la désorption totale de la biointerface par les techniques détaillées dans la partie 1.7.1. Parmi ces techniques, nous mettrons de côté la désorption par plasma et le bombardement ionique pour des raisons d'accessibilité des équipements nécessaires, les désorptions thermiques et électrochimiques car leur efficacité sur GaAs reste encore à prouver. Deux méthodes ont été sélectionnées pour l'étude de la régénération de biointerface sur Arséniure de Gallium :

- L'attaque chimique, qui reste une technique extrêmement simple et facile à mettre en place, qui ne nécessite pas d'équipement sophistiqué et qui peut être réalisée *in situ*. Elle peut être réalisée, par exemple, avec le même circuit fluidique que celui utilisé pour la détection, à condition que celui-ci soit résistant aux chimies employées pour la gravure.
- La photo-oxydation UV en milieu liquide qui propose une régénération relativement rapide et efficace (moins de 15min¹³⁹), qui ne nécessite pas forcément d'équipements très onéreux (par exemple : lampe à mercure, LED UV) et offre des possibilités de « patterning » particulièrement intéressantes.

CHAPITRE 2 Modélisation et microfabrication du transducteur GaAs

2.1 Introduction

A travers l'état de l'art énoncé dans le premier chapitre, nous avons sélectionné les transducteurs à mode de cisaillement d'épaisseur pour : (1) leur capacité à fonctionner en milieu liquide, (2) leur plus grande facilité de conception et (3) leur bonne sensibilité pour l'application ciblée. Le dispositif sera constitué d'une membrane résonante en arséniure de gallium fonctionnant sur un mode de cisaillement qui est excité via ses propriétés piézoélectriques. La possibilité de générer des modes de cisaillement d'épaisseur dans une membrane d'arséniure de gallium a été validée par des recherches antérieures. La possibilité de concevoir le dispositif sur un mode de fonctionnement d'excitation par champ électrique latéral peut offrir de réels avantages pour ce type d'application. Les parties électriques peuvent notamment être découplées de la partie d'approvisionnement fluide ce qui facilite l'interfaçage à la fois fluide et électrique du dispositif. Nous pouvons décomposer ce chapitre en deux parties principales.

La première est un rappel des principes théoriques régissant le fonctionnement du transducteur. Dans cette partie, nous donnerons les relations permettant de valider les choix technologiques effectués par la suite et de prévoir les performances et notamment la sensibilité en masse des dispositifs à ondes de cisaillement. Nous verrons également les facteurs limitants des capteurs tels que leur sensibilité à la température et aux paramètres mécaniques et électriques des fluides étudiés. Et enfin, nous validerons cette étude par la réalisation d'un modèle de simulation par éléments finis et comparerons les valeurs de résonance calculées à celles obtenues expérimentalement.

La seconde partie de ce chapitre porte sur la réalisation du transducteur et de la partie fluide par des techniques de microfabrication en salle blanche. Pour la fabrication de la membrane, deux approches seront comparées, une approche par gravure humide et une autre par gravure plasma. De la même façon, deux stratégies seront employées pour l'élaboration des cellules fluidiques, soit en intégrant directement la cellule dans le substrat

de GaAs lors de la fabrication des membranes, soit en la réalisant sur un autre substrat reporté sur le transducteur.

Enfin nous discuterons des avantages de chacune des stratégies et de leur positionnement économique pour la réalisation d'un capteur à bas coût.

2.2 Modélisation

2.2.1 Relations fondamentales dans un cristal piézoélectrique

Ondes élastiques et piézoélectricité

L'arséniure de gallium étant piézoélectrique, ses propriétés lui confèrent la capacité de se polariser électriquement sous l'action d'une contrainte mécanique ou inversement. La nature cristalline du matériau nécessite que les lois régissant le comportement électromécanique du GaAs soient écrites sous forme tensorielle.

Les ondes élastiques peuvent être décrites, en quelque sorte, par la propagation d'une perturbation des éléments composants un milieu ou un matériau. Le milieu soumis à cette perturbation réagit pour revenir à sa position de repos créant ainsi des contraintes. Les ondes élastiques provoquent ainsi un déplacement de la matière qui varie dans le temps.

Les contraintes $[T_{ij}]$ générées par ce mouvement sont donc liées aux déformations $[S_{kl}]$ par la loi de Hooke :

$$T_{ij} = c_{ijkl} S_{kl} \quad i, j, k, l = 1, 2, 3 \quad (2.1)$$

avec c_{ijkl} les composantes du tenseur des constantes élastiques (rang 4) et S_{kl} les composantes du tenseur des déformations définies par :

$$S_{kl} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_k}{\partial x_l} + \frac{\partial u_l}{\partial x_k} \right) \quad (2.2)$$

où u_l et u_k correspondent respectivement aux coordonnées du vecteur de déplacement mécanique selon les directions l et k .

Dans un régime dynamique, le déplacement de la matière est exprimé par la relation suivante :

$$\frac{\partial T_{ij}}{\partial x_j} + f_i = \rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} \quad (2.3)$$

Cette relation constitue l'équation fondamentale de l'électrodynamique des milieux solides continus.

De par la symétrie des tenseurs $[T_{ij}]$ et $[S_{kl}]$, les égalités suivantes peuvent être admises :

$$c_{ijkl} = c_{jikl} = c_{jilk} = c_{ijlk} \quad (2.4)$$

Ce qui nous permet de simplifier le tenseur d'élasticité en groupant les termes (ij) et (kl) en α et β , donnant la correspondance suivante (notation de Voigt) :

(ij) ou (kl)	(11)	(22)	(33)	(23)	(13)	(12)
α ou β	1	2	3	4	5	6

La représentation matricielle des constantes élastiques est la suivante :

$$\begin{bmatrix} T_1 \\ T_2 \\ T_3 \\ T_4 \\ T_5 \\ T_6 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{13} & c_{14} & c_{15} & c_{16} \\ c_{21} & c_{22} & c_{23} & c_{24} & c_{25} & c_{26} \\ c_{31} & c_{32} & c_{33} & c_{34} & c_{35} & c_{36} \\ c_{41} & c_{42} & c_{43} & c_{44} & c_{45} & c_{46} \\ c_{51} & c_{52} & c_{53} & c_{54} & c_{55} & c_{56} \\ c_{61} & c_{62} & c_{63} & c_{64} & c_{65} & c_{66} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \\ S_4 \\ S_5 \\ S_6 \end{bmatrix} \quad (2.5)$$

La loi de Hooke devient alors :

$$T_\alpha = c_{\alpha\beta} S_\beta \quad (2.6)$$

Les tenseurs des contraintes et des déformations étant symétriques, nous pouvons écrire :

$$T_{\alpha} = c_{\alpha\beta} \frac{\partial u_l}{\partial x_k} \quad (2.7)$$

Toutefois, les calculs précédents ne tiennent pas compte de la piézoélectricité. Or un solide piézoélectrique couple les ondes élastiques et électromagnétiques.

Les tenseurs de contrainte mécanique et de déplacement électrique sont tous deux liés aux tenseurs de déformation et de champ électrique par le système d'équations suivant :

$$T_{ij} = c_{ijkl}^E S_{kl} - e_{kij} E_k \quad (2.8)$$

$$D_j = \varepsilon_{jk}^S E_k + e_{jkl} S_{kl} \quad (2.9)$$

Où e_{ijkl} et ε_{jk} sont respectivement les composantes du tenseur piézoélectrique et diélectrique. Dans ces expressions les constantes élastiques et diélectriques sont données respectivement à champs électrique et déformation constants.

Les équations (2.8) et (2.9) deviennent en notation matricielle :

$$T_{\alpha} = c_{\alpha\beta}^E S_{\beta} - e_{k\alpha} E_k \quad (2.10)$$

$$D_j = \varepsilon_{jk}^S E_k + e_{j\beta} S_{\beta} \quad (2.11)$$

Avec $i, j = 1, 2, 3$ et $\alpha, \beta = 1, 2, 3, 4, 5, 6$

Cas de l'arséniure de gallium :

L'arséniure de gallium est un cristal de type zinc blende constitué de deux structures cubique-face-centrée imbriquées et décalées d'un vecteur $a/4$ selon chacun des 3 axes cristallographiques (a étant le paramètre de maille) (Figure 2.1).

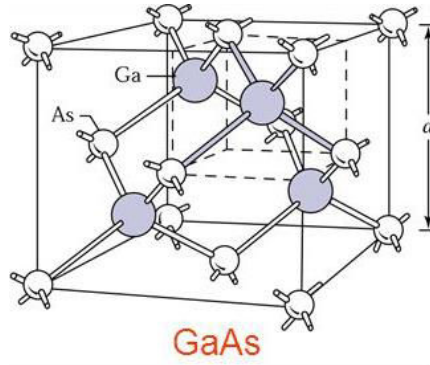


Figure 2.1: Maille cristalline du GaAs

La symétrie du cristal est de type $\bar{4}3m$ ce qui permet de simplifier les tenseurs élastique, piézoélectrique et diélectrique rendant une partie de leurs constantes nulles ou égales.

Ainsi le tenseur élastique simplifié est donné par :

$$[c_{\alpha\beta}] = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{12} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{11} & c_{12} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{12} & c_{11} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & c_{44} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & c_{44} \end{bmatrix} \quad (2.12)$$

Les constantes d'élasticité données en GPa dépendent de la température T selon les équations suivantes¹⁸⁴ :

$$c_{11} = 121.7 - 14.4 \cdot 10^{-3}T \quad (2.13)$$

$$c_{12} = 54.6 - 6.4 \cdot 10^{-3}T \quad (2.14)$$

$$c_{13} = 61.6 - 7 \cdot 10^{-3}T \quad (2.15)$$

La simplification du tenseur diélectrique donne ainsi :

$$[\varepsilon_{jk}] = \begin{bmatrix} \varepsilon & 0 & 0 \\ 0 & \varepsilon & 0 \\ 0 & 0 & \varepsilon \end{bmatrix} \quad (2.16)$$

avec l'unique constante diélectrique²⁹ $\varepsilon = 9.73 \cdot 10^{-11}$ F/m.

Enfin le tenseur piézoélectrique peut se simplifier sous la forme suivante :

$$[e_{j\beta}] = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & e_{14} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & e_{14} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & e_{14} \end{bmatrix} \quad (2.17)$$

avec la constante piézoélectrique²⁹ $e_{14} = -0,16 \text{ C/m}^2$

Les valeurs des paramètres mécaniques du GaAs à température ambiante sont résumées dans le tableau suivant :

Propriétés		Arséniure de Gallium	
		Valeurs	Ref.
Constante d'élasticité [GPa]	c_{11}	118.8	29
	c_{12}	53.8	
	c_{44}	59.4	
Constante piézoélectrique [C/m^2]	e_{14}	-0.16	
Constante diélectrique [F/m]	ϵ	9.73×10^{-11}	
Densité [kg/m^3]	ρ	5307	
Perte mécanique isotrope	η_s	0.00591	185

Tableau 2.1: Paramètres électriques et mécaniques du GaAs

2.2.2 Propagation des ondes de volume

Equation de Christoffel :

En intégrant l'équation de Hooke (2.1) dans la relation fondamentale de la dynamique,

$\rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} = \frac{\partial T_{ij}}{\partial x_j}$, on obtient l'équation d'onde dans le cas anisotrope :

$$\rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} = c_{ijkl} \frac{\partial^2 u_l}{\partial x_j \partial x_k} \quad (2.18)$$

La propagation d'une onde plane $\hat{u}_i = \hat{u}_i \exp(i\omega(t - \mathbf{s}\mathbf{n}\cdot\mathbf{x}))$ dans un solide piézoélectrique est régie par l'équation de Christoffel. Avec la vitesse $s(\mathbf{n}) = k(\mathbf{n})/\omega$ (en s/m) et la polarisation de l'onde \hat{u}_i .

Cette équation peut se résoudre sous la forme d'un problème aux valeurs propres avec cette équation²⁹ :

$$\rho \hat{u}_i = s^2 \Gamma_{il} \hat{u}_l \quad (2.19)$$

et avec $[\Gamma_{il}]$ le tenseur de Christoffel dont les composantes sont données par l'expression suivante²⁹ :

$$\Gamma_{il} = c_{ijkl} n_j n_k \quad (2.20)$$

Les vitesses de propagation des ondes planes et les coefficients de couplage électromécanique pour chaque direction dans le plan (100) sont déterminés par la résolution des valeurs propres de la matrice de Christoffel.

Pour chaque direction de propagation, on obtient trois vitesses de propagation correspondant aux racines de :

$$|\Gamma_{il} - \rho V^2 \delta_{il}| = 0 \quad (2.21)$$

où δ_{il} est le symbole de Kronecker et V la vitesse de propagation de l'onde.

Les trois vitesses de propagation sont notées (V_a , V_b , V_c) et chacune correspond à une polarisation. Les polarisations sont orthogonales entre elles. Comme nous l'avons vu dans la partie 1.3.2, l'onde dont la polarisation est dans le sens de propagation est appelée longitudinale, les deux autres sont transverses. Dans les milieux anisotropes, la polarisation de l'onde n'est pas exactement perpendiculaire ou parallèle à la direction de propagation on parle alors d'ondes quasi-transverses et quasi-longitudinale.

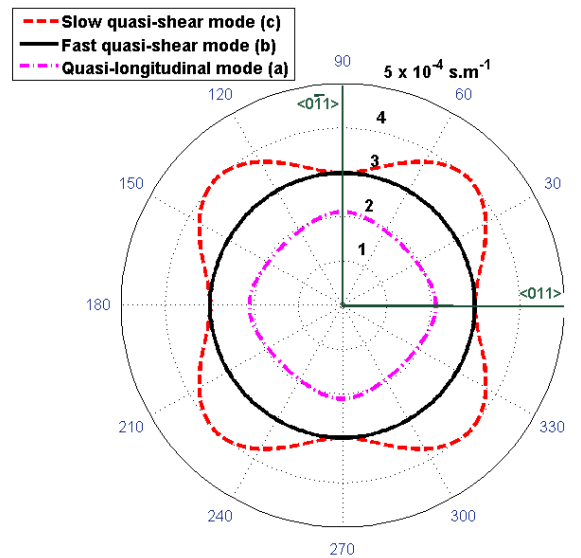


Figure 2.2: Surface des lenteurs dans le plan (100) du GaAs pour les deux modes de cisaillement quasi-transversaux (lent et rapide) et pour le mode longitudinal

On représente par une courbe polaire dite courbe des lenteurs l'inverse des vitesses des ondes élastiques selon chaque direction dans un plan du cristal étudié. Les graphes des lenteurs pour le GaAs ont été simulés à l'aide d'un programme, *SlownessBuddy 1.4* (développé par le Dr. Vincent Laude) permettant de tracer les courbes de lenteur pour les ondes de volumes et de surface grâce aux formulations de Christoffel. Ainsi la surface des lenteurs pour le plan (100) du GaAs est représentée sur la Figure 2.2.

Excitation électrique :

L'excitation électrique appliquée sur le matériau piézoélectrique pour générer les ondes acoustiques peut être de plusieurs types. Ces différents types d'excitation nécessitent des configurations d'électrodes différentes. Dans le cas le plus usuel, l'onde est excitée par un champ électrique orienté selon l'épaisseur du résonateur (TFE, « thickness field excitation ») comme c'est le cas dans la plupart des microbalances à cristal de quartz. Les électrodes sont alors disposées sur les deux faces opposées du matériau piézoélectrique (Figure 2.3a).

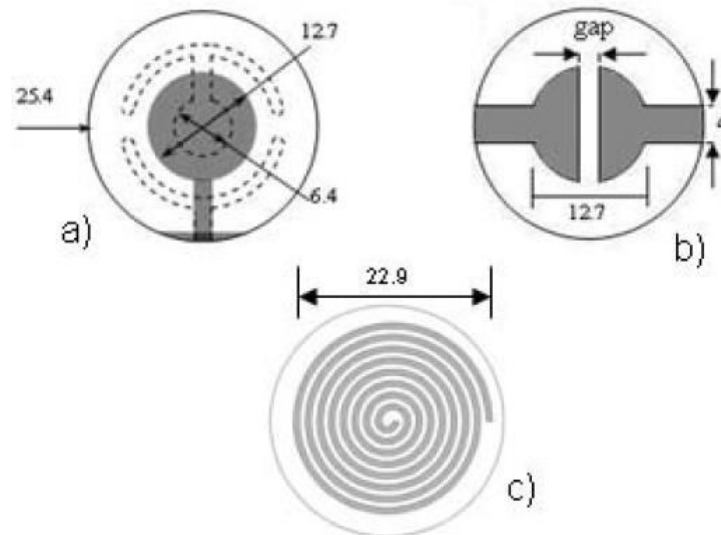


Figure 2.3: Schémas représentant les différents types d'excitation : (a) excitation dans l'épaisseur (TFE), (b) excitation par champ latéral (LFE) et (c) excitation par champ magnétique (EMAT)¹⁸⁸

Mais d'autres méthodes d'excitation telles que l'excitation par champ latéral (LFE, « lateral field excitation » représentée sur la Figure 2.3b) ou par champ magnétique (EMAT, « electromagnetic acoustic transducer » représentée sur la Figure 2.3c) sont possibles et peuvent se révéler intéressantes lorsque le transducteur est utilisé pour des applications de capteur chimique ou biologique. En effet, ces configurations permettent d'avoir les électrodes séparées de la partie fluidique du capteur ce qui facilite les connections électriques. De plus, les électrodes ne seront pas localisées dans la région de déplacement maximum, ce qui offre une meilleure stabilité et un facteur de qualité plus élevé^{186,187}. Nous avons choisi dans ce travail des électrodes en conformation LFE placées sur la surface opposée à la zone de capture biologique.

Coefficient de couplage électromécanique :

Le coefficient de couplage électromécanique K représente le rendement de conversion entre l'énergie électrique et l'énergie mécanique. Ce coefficient est propre à un matériau, à un type d'ondes et à une orientation particulière, il a une valeur comprise entre 0 et 1 (souvent exprimée en pourcentage). Dans de précédents travaux, le coefficient de couplage optimal a été déterminé en utilisant la méthode de Christoffel-Bechmann étendue¹⁸⁹. Sa valeur maximale a été déterminée pour les orientations $\langle 011 \rangle$ et $\langle 0\bar{1}1 \rangle$ du champ électrique dans le plan cristallographique (100) du GaAs. Cette valeur est égale à 6.66% pour les modes de cisaillement avec une excitation par champ électrique latéral. Des

résultats similaires ont été obtenus par Söderkvist¹⁹⁰. Parmi les trois modes de propagation et en considérant le plan d'excitation (100) seuls les modes quasi-transverses peuvent être excités par LFE car le mode quasi-longitudinal possède un coefficient de couplage électromécanique nul dans ce plan¹⁸⁹.

Rotation des matrices

Les trois matrices d'élasticité, diélectrique et piézoélectrique sont représentées dans un repère de référence dont les trois axes (x, y, z) correspondent respectivement aux directions cristallographique <100>, <010> et <001>. Selon la direction d'excitation et la direction de propagation de l'onde, ce repère doit subir une rotation à l'aide d'une matrice de changement de base (ou matrice de passage) afin de calculer les nouveaux coefficients correspondant à cette orientation.

La matrice de changement de base est donnée par :

$$P = \begin{pmatrix} \cos \gamma \cos \alpha - \sin \gamma \sin \alpha \sin \beta & \cos \gamma \sin \alpha + \sin \gamma \sin \alpha \sin \beta & -\sin \gamma \cos \beta \\ -\sin \alpha \cos \beta & \cos \alpha \cos \beta & \sin \beta \\ \sin \gamma \cos \alpha + \cos \gamma \sin \alpha \sin \beta & \sin \gamma \sin \alpha - \cos \gamma \cos \alpha \sin \beta & \cos \gamma \cos \beta \end{pmatrix} \quad (2.22)$$

où les angles α , β et γ sont les trois angles d'Euler et correspondent respectivement aux rotations du repère autour de l'axe z, autour de l'axe N et autour de l'axe Z (Figure 2.4).

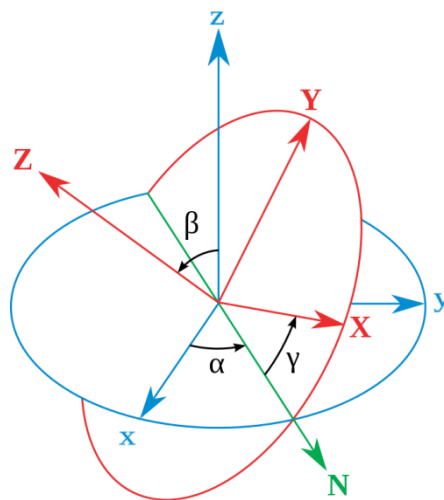


Figure 2.4: Changement de repère avec les angles d'Euler

Dans le modèle numérique introduit par la suite, nous aurons besoin des angles d'Euler pour orienter les directions $\langle 011 \rangle$, $\langle 0 \bar{1}1 \rangle$ et $\langle 100 \rangle$ du cristal respectivement selon les axes X, Y et Z. On obtiendra le plan d'excitation normal à l'axe Z et les deux directions possibles d'excitation selon les axes X et Y.

Les angles d'Euler sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

α	β	γ
45°	90°	90°

Tableau 2.2: Angles d'Euler pour réaliser la rotation du repère initial où $x, y, z = \langle 100 \rangle$, $\langle 010 \rangle$, $\langle 001 \rangle$ à un repère X, Y, Z = $\langle 100 \rangle$, $\langle 011 \rangle$, $\langle 0 \bar{1}1 \rangle$

Fréquence de résonance :

Dans le cas des modes TSM, l'onde acoustique se propage dans l'épaisseur du résonateur. La résonance est obtenue lorsqu'une onde stationnaire s'établit entre les deux faces du résonateur. La longueur d'onde doit être équivalente au maximum, au double de l'épaisseur.

La fréquence de résonance s'exprime donc selon l'équation suivante :

$$f_m = n \frac{V_m \left(1 - \frac{8K^2}{n^2\pi^2}\right)}{2h} \approx n \frac{V_m}{2h} \quad (2.23)$$

où V_m représente la vitesse de l'onde pour le mode m (longitudinal (c), cisaillement rapide et lent), n l'harmonique (avec $n=1$ pour la fréquence fondamentale) et h l'épaisseur du résonateur.

La vitesse de propagation pour l'onde quasi-transverse rapide (mode b) est donnée par :

$$V_b = \sqrt{\frac{\lambda_b}{\rho}} \approx \sqrt{\frac{c_{44}}{\rho}} = \sqrt{\frac{c_{44} + \frac{e_{24}^2}{\varepsilon_{22}}}{\rho}} = 3342 \text{ m.s}^{-1} \quad (2.24)$$

avec λ_b la valeur propre du mode considéré et $\overline{c_{44}}$ la constante d'élasticité durcie¹⁹¹.

La relation fréquence de résonance/épaisseur est donc donnée par :

$$f_b = n \frac{1671}{h} \quad (2.25)$$

Sensibilité du TSM par ajout de masse (cas idéal) :

L'accumulation d'une masse idéale à la surface du transducteur, provoque une augmentation de l'énergie cinétique, l'énergie potentielle reste quant à elle inchangée. On considère qu'une masse idéale est suffisamment fine et rigide et que son déplacement est uniforme selon son épaisseur. L'hypothèse de Rayleigh énonce que « *la résonance dans un système mécanique se produit aux fréquences auxquelles la densité d'énergie cinétique maximale U_k s'équilibre avec la densité d'énergie potentielle maximale U_p* »¹⁹². La fréquence de résonance va donc changer pour équilibrer les deux énergies lors d'un ajout de masse.

La densité d'énergie cinétique maximale d'un résonateur TSM est donnée par l'équation suivante⁴⁹ :

$$U_k = \frac{\omega^2}{2} \left(\rho_s u_{x0}^2 + \rho \int_0^h |u_x(y)|^2 dy \right) = \frac{\omega^2 u_{x0}^2}{2} \left(\rho_s + \frac{\rho t}{2} \right) \quad (2.26)$$

où ρ_s est la densité de masse surfacique (masse/surface) de la couche ajoutée et $u_x(y)$ et u_{x0} sont respectivement le déplacement de l'onde de cisaillement et son amplitude maximale, avec $u_x(y, t) = u_{x0} \cos\left(\frac{n\pi}{h}y\right) e^{j\omega t}$

La densité d'énergie potentielle maximale U_p est donnée par⁴⁹ :

$$U_p = \frac{c_{44} u_{x0}^2}{2 \lambda^2} \int_0^h \sin^2(ky) dy = \frac{c_{44} u_{x0}^2 h}{4 \lambda^2} \quad (2.27)$$

Les deux densités d'énergie étant en équilibre, on en déduit l'expression suivante :

$$\left(\frac{\omega_0}{\omega}\right)^2 = 1 + \frac{2\rho_s}{h\rho} \quad (2.28)$$

avec la pulsation sans masse ajoutée :

$$\omega_0 = \left(\frac{n\pi}{h}\right) \sqrt{\frac{c_{44}}{\rho}} \quad (2.29)$$

La variation de la fréquence de résonance pour un ajout de masse idéale est donc exprimée par l'équation de Sauerbrey :

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{\rho_s}{h\rho} = -\frac{2f^2\rho_s}{\sqrt{c_{44}\rho}} \quad (2.30)$$

2.2.3 Modèle électrique du résonateur

La Figure 2.5 représente le schéma d'un résonateur à ondes de cisaillement de volume constitué d'électrodes en configuration LFE.

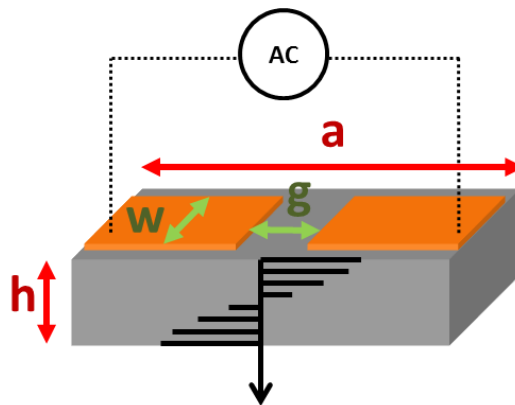


Figure 2.5: Schéma d'un résonateur excité par champ électrique latéral avec l'épaisseur de la plaque résonante h, la distance inter-électrode (gap) g, la largeur des électrodes w et la longueur cumulée des électrodes a.

Les caractéristiques électriques d'un résonateur peuvent être décrites par un circuit équivalent permettant d'obtenir l'impédance ou l'admittance sur la gamme de fréquences proches de la résonance. Deux types de modèles peuvent être considérés : un modèle à

éléments distribués (ou en ligne à transmission) ou un modèle à éléments localisés. Le modèle distribué⁴⁹, représenté sur la Figure 2.6a, utilise une ligne de transmission pour représenter la propagation de l'énergie acoustique à travers l'épaisseur du dispositif. Les variables acoustiques, les contraintes et la vitesse de propagation V sont couplés via un transformateur au port électrique. Le modèle comprend donc deux ports acoustiques et un port électrique. L'impédance caractéristique du matériau Z dépend de la densité ρ et de la vitesse de propagation par la relation : $Z = \rho V$. Les paramètres A , C_0 et $\Phi = \frac{e}{\epsilon_S} C_0$ correspondent respectivement à l'aire des électrodes, la capacité statique et le rapport du nombre de spires du transformateur. En déterminant l'impédance mécanique Z_s représentant la surface en condition de charge, la réponse électrique du système peut être obtenue.

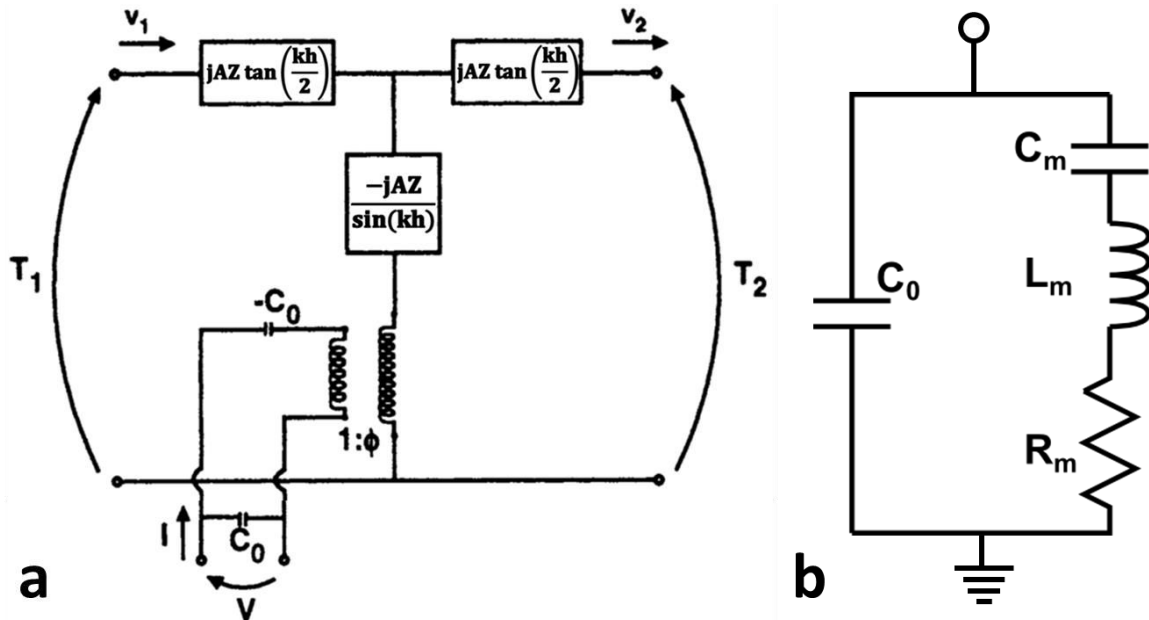


Figure 2.6: Schémas du (a) modèle distribué (ligne de transmission)⁴⁹ et du (b) modèle à éléments localisés (modèle de *Butterworth-Van Dyke*)

Le modèle à éléments distribués peut être réduit à un modèle plus simple à éléments localisés (Figure 2.66b) afin de décrire le comportement électrique aux alentours de la fréquence de résonance⁴⁹. Ce modèle est appelé le circuit *Butterworth-Van Dyke* (BVD). Le circuit simplifié est constitué d'une branche dite statique modélisant le comportement électrique de la structure hors résonance et d'une branche dite motionnelle modélisant le comportement du résonateur autour de la résonance. La valeur de la capacité statique C_0

située entre les électrodes est dépendante de la constante diélectrique du matériau et des propriétés géométriques de la membrane et des électrodes¹⁹³.

Son expression est donnée par :

$$C_0 = \frac{wh\varepsilon}{g} \quad (2.30)$$

où ε est la permittivité du matériau, w et g sont respectivement la largeur et la distance entre les électrodes (Figure 2.5).

Le comportement acoustique du résonateur est défini par les contributions motionnelles (L_m , C_m et R_m) qui dominent à proximité de la résonance.

Les expressions des paramètres C_m , L_m et R_m sont respectivement données par⁴⁹ :

$$C_m = \frac{8K^2 C_0}{(n\pi)^2} \quad (2.31)$$

$$L_m = \frac{(n\pi)^2}{8\omega^2 K^2 C_0} \quad (2.32)$$

$$R_m = \frac{\left(\frac{\pi}{2}\right)^2 \alpha}{K^2 \omega C_0} \quad (2.33)$$

où α , K et ω sont respectivement le facteur d'atténuation, le coefficient de couplage électromécanique et la pulsation de résonance¹⁹⁴.

Le facteur d'atténuation α peut être déterminé par :

$$\alpha = \frac{\eta\omega^2}{2V_b^3\rho} \quad (2.34)$$

où η est la constante de viscosité du matériau, V_b la vitesse de propagation de l'onde et ρ la densité.

Soit en combinant (2.33) et (2.34), R_m est donnée par :

$$R_m = \frac{\pi^2 \eta g}{8K^2 \rho V_b^2 w h \varepsilon} \quad (2.35)$$

L'admittance du résonateur peut alors être déterminée selon les paramètres de ce modèle par l'équation suivante :

$$Y(\omega) = j\omega C_0 + \frac{1}{Z_m} \quad (2.36)$$

Où Z_m est l'impédance motionnelle du circuit :

$$Z_m = R_m + j\omega L_m + \frac{1}{j\omega C_m} \quad (2.37)$$

La fréquence de résonance série est définie lorsque la réactance motionnelle est nulle :

$$\omega_s L_m - \frac{1}{\omega_s C_m} = 0 \text{ donnant : } f_s = \frac{1}{2\pi \sqrt{L_m C_m}} \quad (2.38)$$

La fréquence de résonance parallèle est définie lorsque la réactance totale (motionnelle + statique) est nulle :

$$f_p = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_m} \left(\frac{1}{C_m} + \frac{1}{C_0} \right)} \quad (2.39)$$

Enfin, on peut déterminer le coefficient de qualité du résonateur en employant l'équation suivante :

$$Q = \frac{2\pi f_s L_m}{R_m} \quad (2.40)$$

Modélisation en milieu liquide :

Lorsqu'une face du résonateur est en contact avec un liquide, sa fréquence et son amplitude sont affectées par la densité et la viscosité du liquide. Cet effet qui peut être intéressant pour la mesure des propriétés du liquide dans lequel est utilisé le capteur peut également être une limitation à la détection par modification de masse.

L'équation de Kanazawa et Gordon¹⁹⁵ donne une meilleure approximation de la fréquence de résonance lorsque le résonateur fonctionne en milieu liquide :

$$\frac{\Delta f}{f} = -\frac{1}{n} \sqrt{\frac{f \rho_l \eta}{\pi C_{44} \rho}} \quad (2.41)$$

avec ρ_l et η respectivement la densité et la viscosité du liquide.

On aura donc un impact des paramètres « mécaniques » du liquide (viscosité et densité) sur la fréquence de résonance. Cela va se traduire par une déviation de la fréquence de résonance comme nous le montre l'équation de Kanazawa et Gordon mais également par une atténuation de l'amplitude des pics de résonance. En effet, il a été montré que la résistance motionnelle du modèle, et donc de l'amortissement du système, est proportionnelle à $\sqrt{\rho_l \eta}$.¹⁹²

Pour un transducteur TSM à excitation dans l'épaisseur (TFE), le champ électrique est confiné dans la région située entre les deux électrodes ce qui n'engendre pas d'effet des propriétés électriques de l'environnement sur le fonctionnement du dispositif. Seules les variations des propriétés mécaniques, telles que la masse, la densité ou la viscosité, affectent le signal mesuré à cause des changements de la charge acoustique. Dans le cas d'une excitation par champ latéral, le champ électrique pénètre plus facilement dans le milieu adjacent, et la réponse sera sensible aux changements de conductivité ou de permittivité du milieu¹⁹⁶. La sensibilité aux variations des propriétés d'un liquide peut être expliquée par un modèle pseudo-LFE représenté sur la Figure 2.7¹⁹⁴. Selon Wang et al. lorsque un transducteur LFE fonctionne dans un liquide, ce dernier agit comme une électrode virtuelle qui entraîne en quelque sorte une excitation à travers l'épaisseur¹⁹⁴. Ce nouveau modèle d'excitation appelé pseudo-LFE est composé de deux circuits BVD en mode TFE en série avec un circuit équivalent représentant les propriétés électriques du liquide comprenant les composantes R_L et C_L . Ainsi dans le cas d'une géométrie

symétrique du transducteur, les valeurs R_1 , C_1 et L_1 , C_{10} seront respectivement égales aux valeurs R_2 , L_2 , C_2 , C_{20} .

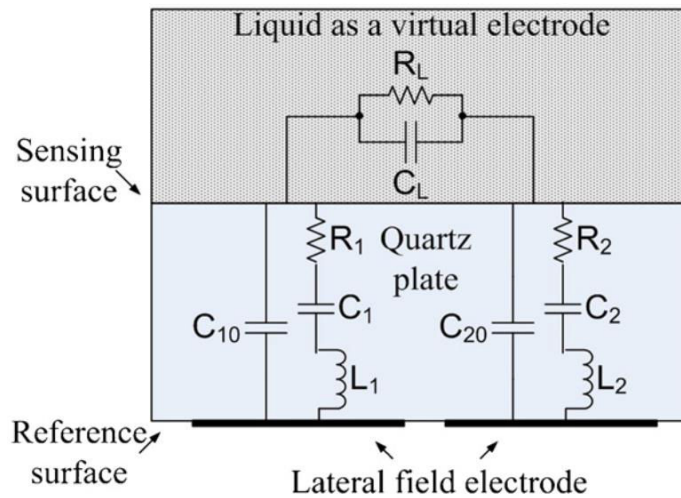


Figure 2.7: Modèle à éléments localisés représentant un résonateur LFE en contact avec un liquide dont les propriétés électriques sont modélisées par les composants R_L et C_L ¹⁹⁴

En résumé, lorsque le transducteur est en contact d'un liquide, il subira une atténuation de sa résonance due aux propriétés mécaniques et potentiellement électriques du fluide. Nous étudierons expérimentalement, dans le chapitre 5, le résonateur soumis à une électrolyte.

2.2.4 Modèle éléments finis

Un modèle de simulation par éléments finis (FEM, « Finite Element Method) a été élaboré pour prévoir le comportement de la structure résonante en condition idéale puis selon différentes variables environnementales. La modélisation a été réalisée avec le logiciel de simulation à éléments finis *COMSOL Multiphysics*®. Nous avons construit un modèle dans la physique « dispositifs piézoélectriques » du module « MEMS ». L'analyse des fréquences propres et l'analyse dans un domaine de fréquences sont les deux études utilisées dans ces travaux. Les paramètres géométriques introduits dans le modèle sont indiqués dans le Tableau 2.1 et la Figure 2.8a. Pour ce modèle, nous avons choisi une épaisseur de membrane de $70\mu\text{m}$ correspondant à une des plus fines membranes réalisées par microfabrication. *COMSOL Multiphysics*® utilise comme convention les orientations (100), (010) et (001) selon les axes x, y et z. Nous avons donc introduit une rotation de repère selon les angles d'Euler $\alpha=45^\circ$, $\beta=-90^\circ$ et $\gamma=-90^\circ$ afin d'obtenir les orientations déterminées dans de précédents travaux¹⁹⁷ : excitation selon $\langle 0 \bar{1}1 \rangle$ ou $\langle 011 \rangle$ et épaisseur

de la membrane selon la direction $\langle 100 \rangle$. L'ensemble des domaines créés a été affecté au matériau arséniure de gallium. La masse volumique, la matrice d'élasticité, la matrice de couplage et la permittivité relative sont préalablement incluses dans les paramètres du matériau. Nous n'avons pas introduit de couche de chrome ou d'or en raison de leur épaisseur négligeable (respectivement 5-10nm et 200-400nm) comparée à celle de la membrane d'arséniure de gallium. Nous avons ajouté dans le modèle piézoélectrique, un facteur de pertes mécaniques ($\eta_s=0.00591$) dans la structure de GaAs apparaissant dans les composantes imaginaires des rigidités mécaniques^{185,193}. Pour limiter les temps de calcul, nous avons réduit les dimensions latérales de la membrane sur le modèle à $400\mu\text{m}$ et ajouté des conditions de symétrie sur les faces latérales. Les deux autres faces latérales du modèle sont encastrées. Deux zones rectangulaires, de dimension $600\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$, ont été sélectionnées pour y ajouter la masse et le terminal (10V) d'excitation. Le gap géométrique les séparant est de $200\mu\text{m}$. Après de nombreux tests non concluants de simulation, nous avons décidé d'ajouter des couches absorbantes parfaitement adaptées (ou PML, « Perfectly matched layer ») dans les extrémités encastrées de la structure. Ces domaines PML sont utilisés pour simuler l'effet de la propagation et l'absorption des ondes élastiques dans ces régions (qui ne sont pas résolues dans les dimensions réelles). Les simulations du résonateur ont d'abord été considérées dans l'air.

Nous avons choisi un maillage triangulaire libre sur le plan de la membrane et un maillage distribué dans l'épaisseur (Figure 2.8b). La taille des éléments est comprise entre $14.4\mu\text{m}$ et $80\mu\text{m}$.

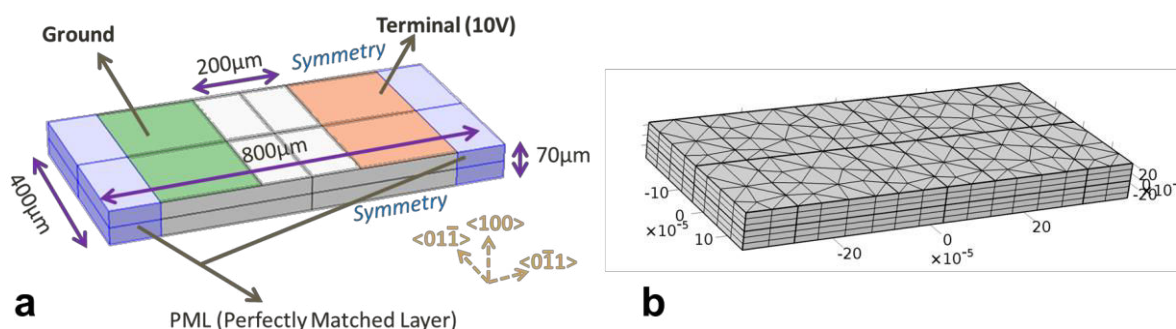


Figure 2.8: (a) Modèle de simulation COMSOL® représentant les différents domaines avec leur affectation et (b) représentation du maillage du modèle

Les simulations du transducteur ont tout d'abord été conduites en air à température ambiante. Nous avons pu déterminer la fréquence fondamentale de résonance des modes de cisaillement d'épaisseur ainsi que leurs harmoniques. Les courbes d'impédance (phase

et module) en fonction de la fréquence, obtenues par la simulation, ont été tracées sur la Figure 2.9a et b. Nous avons représenté également les déplacements de matière dans la structure respectivement en vue pleine et vue de coupe pour le mode fondamental qui a été déterminé par la simulation à $f_0 = 23.93$ MHz (Figure 2.9c et d). On remarque pour le champ électrique généré dans le matériau, que si la structure ou un autre milieu se prolongeait en dessous du transducteur, le champ y pénétrerait (Figure 2.9e). Ce type de transducteur sera donc sensible aux paramètres électriques du milieu en contact. Si l'on souhaite s'affranchir de cet effet, il est alors nécessaire de réduire le rapport : $R_E = \frac{\text{gap entre électrodes}}{\text{épaisseur de membrane}} = \frac{g}{t}$.

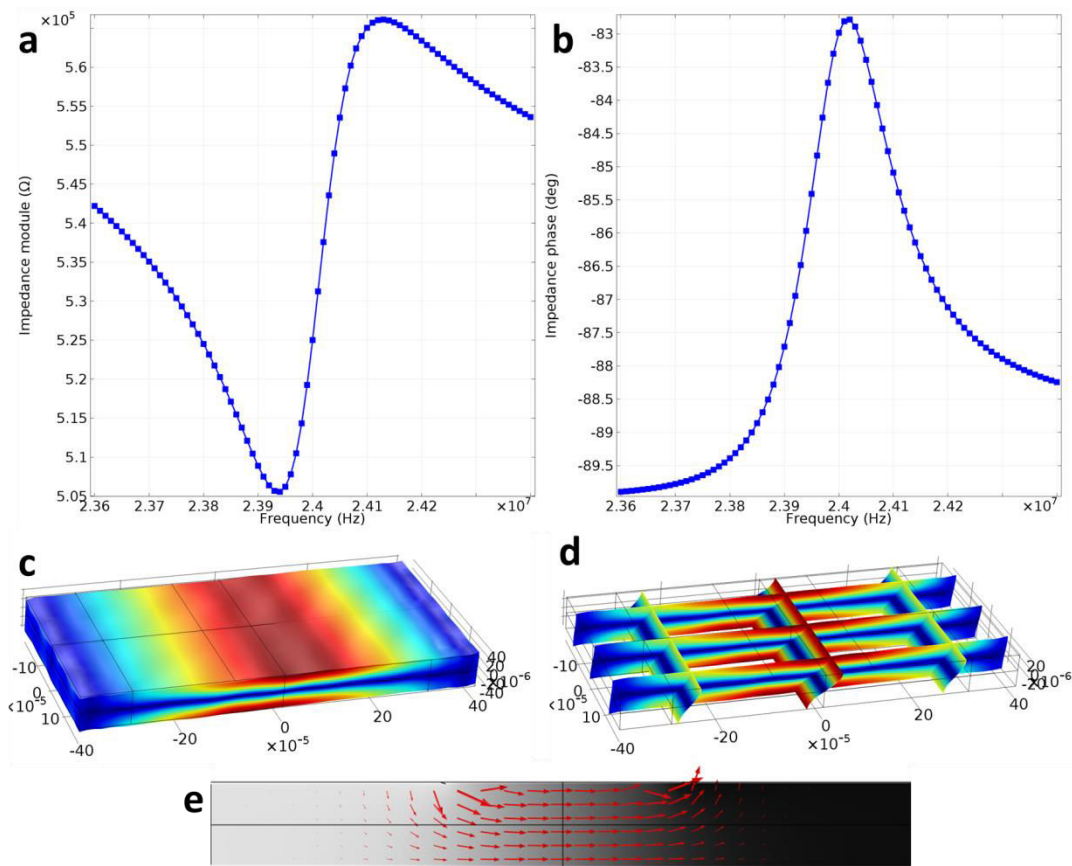


Figure 2.9: Résultats de simulation : (a et b) courbe de module et de phase de l'impédance pour la fréquence f_0 , (c) déplacement de matière dans la plaque à cette même fréquence d'excitation (d) en vue de coupe et (e) vecteur champs électrique (flèches rouges) et gradient de potentiel (gris) représentés dans la section droite de la plaque résonante.

Une étude dans le domaine fréquentiel a permis d'évaluer les fréquences de résonance sur une gamme de 20 MHz à 125 MHz sur laquelle sont situés les modes de cisaillement et leurs premières harmoniques pour cette épaisseur de membrane. Nous avons représenté la

phase de l'impédance et le déplacement de matière en fonction de la fréquence d'excitation. Nous pouvons observer les trois premières harmoniques impaires : f_0 (Figure 2.10), $f_{n=3}$ et $f_{n=5}$, accompagnées pour chacune du profil de coupe du résonateur. Les valeurs de fréquence obtenues sont cohérentes avec celles calculées analytiquement (Tableau 2.3). Sur le graphique de déplacement, on note également la présence de modes de flexion à harmonique élevée pour cette gamme de fréquence.

	Fréquences (MHz)		
	Fondamental	3 ^{ème} harmonique	5 ^{ème} harmonique
f_n simulation	23.93	72.15	122.4
f_n analytique	23.87	71.61	119.36

Tableau 2.3: Comparaison des valeurs des trois premières harmoniques impaires obtenues par la simulation numérique et par le calcul analytique

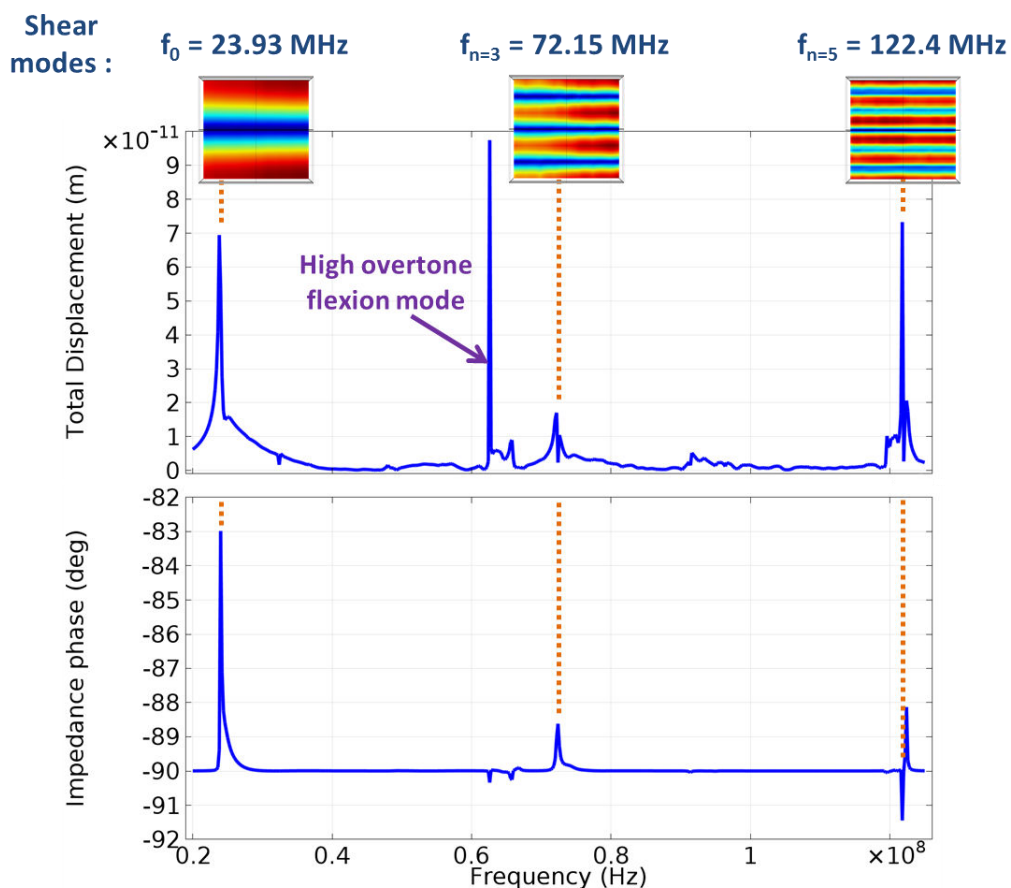


Figure 2.10: Courbes de déplacement en surface et courbe de phase de l'impédance en fonction de la fréquence sur une gamme 20-125 MHz. Vue en coupe du déplacement pour les 3 premiers modes de cisaillement d'épaisseur.

Nous avons vu dans la partie 2.2.1, que les constantes de rigidité du matériau sont dépendantes de la température¹⁸⁴. Nous avons donc inclus les relations linéaires entre les constantes et la température dans notre modèle. Puis nous avons simulé le comportement du transducteur à différentes températures sur une gamme de 20°C à 110°C afin d'évaluer l'impact de ce paramètre sur le mode fondamental de cisaillement. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 2.11 représentant le module de l'impédance en fonction de la fréquence, l'augmentation de la température provoque une déviation de la fréquence de résonance vers les plus basses fréquences. Le décalage obtenu entre 20°C et 100°C est de 0.12 MHz ce qui nous donne une déviation en fréquence équivalente à -60.2ppm/°C. Nous vérifierons expérimentalement cette valeur dans le chapitre 5.

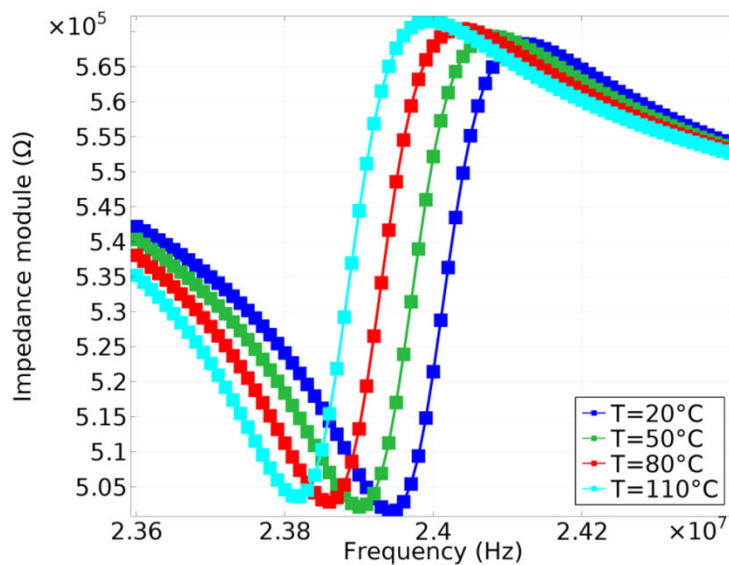


Figure 2.11: Courbes montrant l'influence de la température sur le module d'impédance autour de la résonance pour les valeurs : T=20, 50, 80, 110°C.

2.3 Conception et structure du capteur

Dans cette partie, nous allons établir un cahier des charges pour la conception du capteur en reprenant les points critiques de design évoqués dans des précédents travaux¹⁹⁷. Nous nous focaliserons sur la réalisation du transducteur en nous intéressant à différentes stratégies de microfabrication. La structure à excitation latérale a été déjà testée avec succès pour des détections en milieu liquide^{198,199}. Elle est constituée d'une membrane en arséniure de gallium sur laquelle sont déposées deux électrodes sur une face, et une interface de biorecognition sur l'autre (schéma représenté sur la Figure 2.12.). Nous évoquerons l'interface de biorecognition dans les chapitres 3 et 4. L'épaisseur de

membrane va jouer un rôle important pour la sensibilité du capteur : plus la membrane sera fine, plus la sensibilité sera élevée.

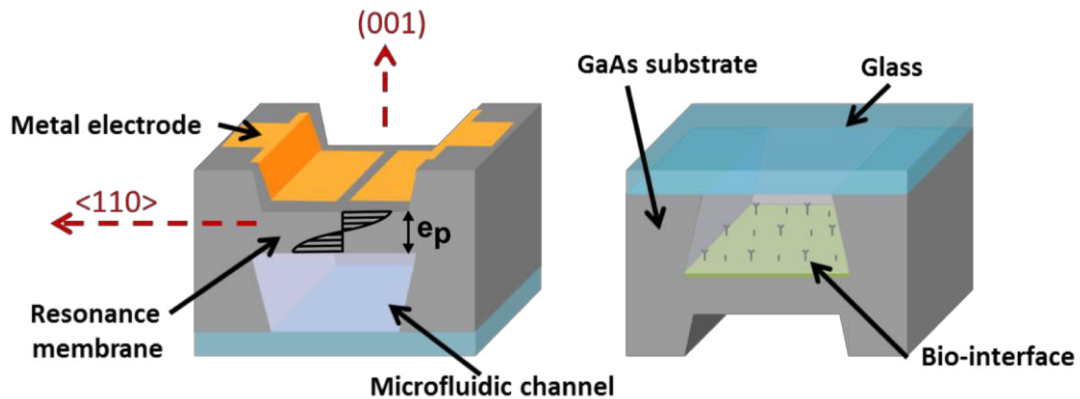


Figure 2.12: Schémas représentant le capteur résonant en GaAs fonctionnalisé en vue de dessus (gauche) et de dessous (droite).

Les études précédentes sur le transducteur font état d'un couplage entre les modes de résonance de la membrane et ceux du substrat¹⁹⁷, en résulte une forte atténuation des modes de membrane par rapport aux estimations théoriques. Ceci est provoqué par une perte d'énergie liée aux encastremements de la membrane lorsque le dispositif est maintenu en condition de test. Les dispositifs étaient alors constitués d'une membrane gravée sur une seule face et les électrodes étaient situées sur la face commune substrat/membrane facilitant le couplage des modes. Nous proposons, ici, une structure « enterrée » dans le substrat pouvant permettre de confiner l'onde dans la membrane uniquement. Cette structure qui sera usinée sur les deux faces du wafer permettra également d'atteindre plus facilement l'épaisseur de membrane. Nous souhaitons obtenir des membranes d'une épaisseur comprise entre 50 μm et 100 μm à partir d'un wafer épais de 625 μm en moyenne. La fréquence des modes fondamentaux sera, par conséquent, comprise entre 17 MHz et 33 MHz. Nous conserverons l'orientation des électrodes selon les directions $\langle 011 \rangle$ et $\langle 0 \bar{1}1 \rangle$, ce qui permettra selon les travaux de Bienaime et al.¹⁸⁹ d'obtenir le meilleur coefficient de couplage.

Dans cette partie nous verrons également la conception d'une cellule fluidique sur la face arrière du dispositif. Celle-ci sera utilisée pour l'analyse des liquides biologiques. Nous testerons plusieurs stratégies de conception. Elle sera constituée d'un port d'entrée, d'un port de sortie et sera dotée d'une structure favorisant la répartition homogène du fluide sur l'élément sensible du capteur.

Pour l'ensemble du procédé, nous sélectionnerons les techniques de réalisation à bas coût afin d'obtenir un dispositif économiquement intéressant et transférable industriellement.

2.4 Réalisation des membranes résonantes

2.4.1 Stratégie de microfabrication

Les principales étapes de fabrication du transducteur sont représentées sur la Figure 2.13. Elle se déroule en 4 étapes principales (A à D) avant l'obtention du dispositif (E). L'étape A concerne la préparation du wafer incluant les étapes de nettoyage, la désoxydation et l'amincissement du wafer détaillés dans la partie 2.4.2. Les étapes B1 et B2 (respectivement parties 2.4.3 et 2.4.4) abordent les deux stratégies d'usinage des membranes employées dans ce travail : par gravure humide et par gravure sèche (plasma). Le dépôt d'électrodes (C) est réalisé en parallèle avec l'usinage des membranes (B1 ou B2) lorsque ce dernier est effectué sur les deux faces du dispositif afin de limiter les risques de casse du substrat (partie 2.4.5). Enfin, deux stratégies seront étudiées pour la fabrication de la cellule et des canaux fluidiques. Ils peuvent soit être réalisés lors de l'usinage de la membrane (D1) comme cela est précisé dans la partie 2.5.2 soit être conçus indépendamment de celle-ci puis reportés sur le dispositif (D2) ; ce procédé est détaillé dans la partie 2.5.3.

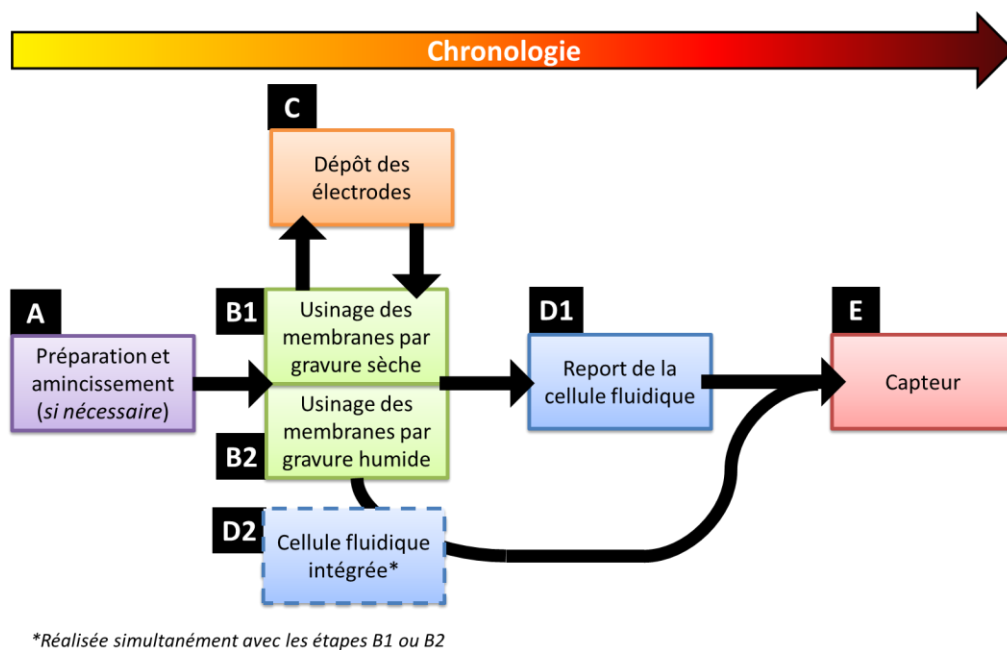


Figure 2.13: Schéma de principe chronologique des grandes étapes de fabrication du capteur.

Deux approches sont proposées pour la fabrication des membranes résonantes, l'une par usinage chimique en voie humide et l'autre par usinage plasma. La première stratégie présente l'intérêt d'être économique et nécessite peu de matériels sophistiqués. L'anisotropie spécifique du cristal d'arséniure de gallium pour ce type de gravure humide, offre de plus la possibilité de joindre les électrodes aux contacts électriques via des pistes déposées sur les flancs d'usinage. L'usinage plasma est une technique qui semble plus robuste et peut s'avérer plus reproductible mais demande plus d'étapes dans le procédé de fabrication. De plus, du fait de la verticalité des parois de gravure, il ne sera pas envisageable de graver les deux faces car les électrodes ne pourront pas y être déposées. Les deux diagrammes de la Figure 2.14 représentent les procédés de fabrication des structures résonantes.

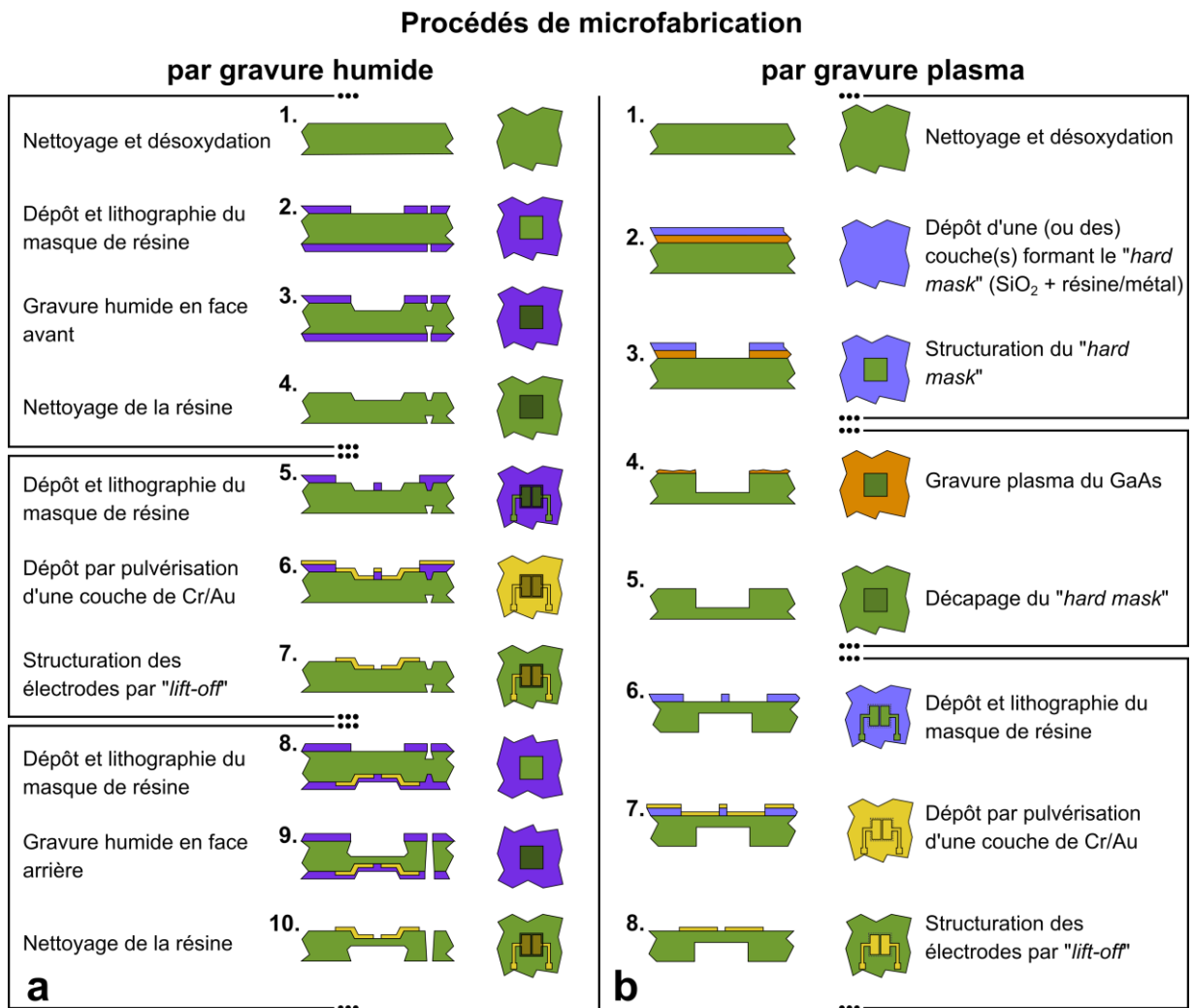


Figure 2.14: Diagramme des processus de fabrication des membranes résonantes (a) en gravure humide double face et (b) en gravure sèche simple face.

2.4.2 Préparation des wafers

Spécifications des wafers d'arséniure de gallium

Nous débutons le procédé avec des wafers de GaAs semi-isolants non-dopés, d'une épaisseur de $(625 \pm 25) \mu\text{m}$ et d'un diamètre de $(76.2 \pm 0.4) \text{mm}$ (3 pouces). Les wafers sont polis sur les deux faces. Concernant l'orientation cristalline, la face supérieure correspond au plan $(100) \pm 0.5^\circ$ tandis que les deux méplats, primaire et secondaire, sont respectivement orientés selon les plans $(011) \pm 0.5^\circ$ et $(0 \bar{1}1) \pm 0.5^\circ$. Enfin, la résistivité mesurée est de $2.79 \times 10^8 \Omega \cdot \text{cm}$.

Amincissement

Nous l'observerons plus tard, les gravures humides ou sèches du GaAs pour la structuration des membranes permettent difficilement d'atteindre les profondeurs adéquates pour obtenir l'épaisseur de membrane requise. Les wafers sont relativement épais ($\sim 600 \mu\text{m}$) et l'objectif visé pour les épaisseurs de membrane est de 50 à $100 \mu\text{m}$. Il peut être utile de réaliser un amincissement du substrat, simple ou double face, de façon à réduire, par la suite, le temps nécessaire aux gravures des membranes. Deux stratégies sont envisagées, soit un amincissement par gravure chimique ou un amincissement mécanique par polissage. Ces stratégies n'ont pas pu être mises en place lors de la réalisation des dispositifs pour les raisons détaillées ci-dessous.

L'amincissement chimique a été réalisé avec une recette à base d'acide orthophosphorique développée par Bienaime et al.^{189,197,200}. L'acide est combiné avec de l'eau oxygénée et de l'eau DI aux proportions suivantes : $7 \text{H}_3\text{PO}_4 : 5 \text{H}_2\text{O}_2 : 8 \text{H}_2\text{O}$. Le procédé est effectué sous agitation magnétique (500tr/min), à 0°C et aux conditions normales de pression. Le taux de gravure est d'environ $4.58 \mu\text{m}/\text{min}$ ¹⁸⁹ ce qui permet d'amincir le substrat de plusieurs centaines de microns en quelques heures. En revanche, même si la recette est considérée comme celle proposant l'état de surface le plus lisse, la planéité n'est pas optimale surtout pour de longues gravures. Cette stratégie a donc été écartée.

La seconde méthode consiste à réaliser un amincissement mécanique par polissage ce qui semble être la stratégie idéale pour cette étape. Cette technique permet d'amincir le substrat jusqu'à une épaisseur de $250 \mu\text{m}$ sans risque de trop le fragiliser pour la suite du

procédé. De par la toxicité des particules de GaAs, le polissage nécessite d'être effectué par une machine dédiée et dans un environnement permettant de protéger l'opérateur contre les particules nocives. Nous ne disposons pas de ce type d'appareil dans nos laboratoires, la prestation a donc été réalisée au sein de l'IEMN à Lille.

Malheureusement, par manque de temps les wafers amincis par polissage n'ont pas pu être employés pour la suite du procédé.

Nettoyage et désoxydation

Afin de retirer les impuretés minérales ou organiques présentes en surface du substrat, les wafers sont immergés successivement dans des bains d'acétone et d'éthanol pendant 5min sous ultrasons. Puis, ils sont plongés dans un bain d'ammoniaque (30%) pendant 2min de façon à retirer les impuretés présentes dans la couche d'oxyde et les résidus organiques restants²⁰¹. Cette étape permet d'améliorer la reproductibilité des étapes suivantes de gravure grâce à l'uniformisation de la couche d'oxyde native¹¹⁵. De plus, l'hydroxyde d'ammonium permet de conserver la stœchiométrie initiale de la surface de GaAs²⁰¹. A la suite de leur immersion dans la solution de NH_4OH , les wafers de GaAs sont rincés avec de l'éthanol anhydre.

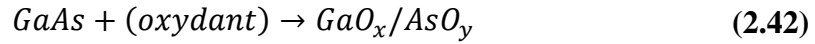
2.4.3 Usinage par gravure humide

La gravure humide

Les enjeux clés de cette technique sont d'obtenir une gravure relativement profonde ($>200\mu\text{m}$) avec une forte anisotropie pour obtenir une surface de membrane plane et une faible rugosité. A l'inverse des gravures sèches obtenues par bombardement ionique, les gravures humides conservent de bonnes propriétés électroniques en surface du matériau. Selon les réactifs utilisés et les conditions de gravures, l'usinage peut être isotrope ou anisotrope du fait de la nature cristalline de l'arséniure de gallium. Le contrôle des dimensions de la gravure (notamment la profondeur) peut en revanche être critique à cause de la forte dépendance des taux de gravure à la température, à l'agitation de la solution et aux orientations cristallines du substrat¹¹⁵. Le mécanisme sous-jacent de ce procédé peut être décomposé en deux étapes : une oxydation de la surface pour former des oxydes de Ga, d'As ou de GaAs, suivie d'une dissolution de l'oxyde par attaque chimique. La vitesse de gravure peut être limitée de deux façons : par la vitesse d'oxydation et de dissolution

(« réaction limitée ») ou par le transport des réactifs et leur renouvellement (« diffusion limitée »).

Une représentation simplifiée de la réaction d'oxydation qui a lieu lors de ce procédé est donnée par l'équation suivante¹¹⁵ :

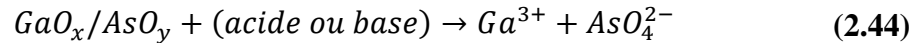


Le taux d'oxydation peut être calculé¹¹⁵ :

$$Taux_{ox} = k_{ox}[oxydant]^m\{GaAs\} \exp\left(-\frac{E_{ox}^*}{kT}\right) \quad (2.43)$$

où [oxydant] représente la concentration d'oxydant, m est le nombre de molécules impliquées dans l'oxydation d'un atome de Ga et d'un atome d'As, {GaAs} est la concentration surfacique effective des atomes de Ga et d'As, k_{ox} est la constante de réaction, E_{ox}^* est l'énergie d'activation pour la réaction, k est la constante de Boltzmann et T la température en Kelvin.

Alors que la dissolution des oxydes de surfaces est donnée par l'équation suivante¹¹⁵ :



Le taux de dissolution correspondant peut être obtenu par l'expression suivante¹¹⁵ :

$$Taux_{diss} = k_{diss}[acide\ ou\ base]^n\{oxyde\} \exp\left(-\frac{E_{diss}^*}{kT}\right) \quad (2.45)$$

où [acide ou base] représente la concentration d'acide ou de base, n est relié au nombre de H^+ ou OH^- impliqués dans la réaction de dissolution, {oxyde} est la concentration surfacique effective des atomes des espèces oxydée, k_{diss} est la constante de dissolution et E_{diss}^* est l'énergie d'activation pour cette réaction.

En modifiant les réactifs, la concentration, l'agitation ou encore les températures nous pouvons passer d'une réaction de type « réaction limitée » à « diffusion limitée ». Lorsque la gravure est de type « diffusion limitée », l'approvisionnement en réactif est insuffisant. Cette vitesse de diffusion est définie par la loi de Fick :

$$\frac{dn}{dt} = \frac{D S C}{\delta} \quad (2.46)$$

où D est le coefficient de diffusion ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), S la surface effective, C la concentration des espèces présentes en solution (mol/m^3) et δ l'épaisseur du film stagnant. Si la gravure est de type « diffusion limitée », l'attaque sera indifférente à l'orientation cristalline donc isotrope. A l'inverse si la gravure est de type « réaction limitée », l'attaque sera de nature plus anisotrope. Dans ce dernier cas de figure, la densité des atomes en surface, leur proportion (As ou Ga) et le type de liaison va générer des différences de vitesse de gravure selon les plans cristallins attaqués par les réactifs.

Pour ces travaux, nous préférons les attaques anisotropes permettant d'obtenir des membranes planes et des profils de gravures particuliers et utiles pour la suite du procédé. D'importants travaux, menés par Bienaime et al. ont fait ressortir une solution spécifique et des paramètres optimaux pour la micro-structuration de nos membranes²⁰⁰. Parmi les nombreuses solutions testées, les solutions à base d'acide orthophosphorique ont été sélectionnées pour leur grande stabilité. Le mélange 7 H_3PO_4 : 5 H_2O_2 : 8 H_2O permet d'obtenir une surface relativement lisse donc adaptée pour l'amincissement chimique des wafers tandis que la solution 1 H_3PO_4 : 9 H_2O_2 : 1 H_2O a montré d'excellentes caractéristiques pour la gravure des membranes^{189,200}. Cette solution permet un contrôle de la gravure avec une résolution de 10 angström en profondeur¹¹⁵. La présence d'une forte agitation (> 400 tr/min) a été démontrée comme un point essentiel pour assurer le renouvellement de la solution en surface du substrat et ainsi obtenir une meilleure homogénéité et réduire les effets de bord. L'agitation magnétique est particulièrement recommandée pour améliorer la gravure sans toutefois détériorer le masque de résine utilisé. Et enfin, la température de la solution, qui rappelons-le, a un impact sur la nature de la gravure, va permettre d'ajuster les taux de gravure. La relation entre le taux de gravure et la température suit la loi d'Arrhénius. Les vitesses de gravure à $T = 0^\circ\text{C}$ sont relativement faibles ($\sim 0.97 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ pour la solution de gravure des membranes) mais

peuvent être légèrement augmentées par l'agitation de la solution²⁰⁰. Or pour obtenir un bon contrôle des profondeurs de gravure, il est nécessaire d'abaisser la température. Pour l'ensemble des gravures chimiques effectuées dans cette partie, nous avons donc abaissé la température de gravure à 0°C, comme suggéré par Bienaime et al.¹⁹⁷.

Réalisation des membranes en gravure humide

Un montage a été conçu afin de pouvoir réaliser la gravure sous agitation magnétique, à $T = 0^{\circ}\text{C}$ ¹⁹⁷ et avec un support dédié pour des wafers de diamètre 2 et 3 pouces (Figure 2.15).

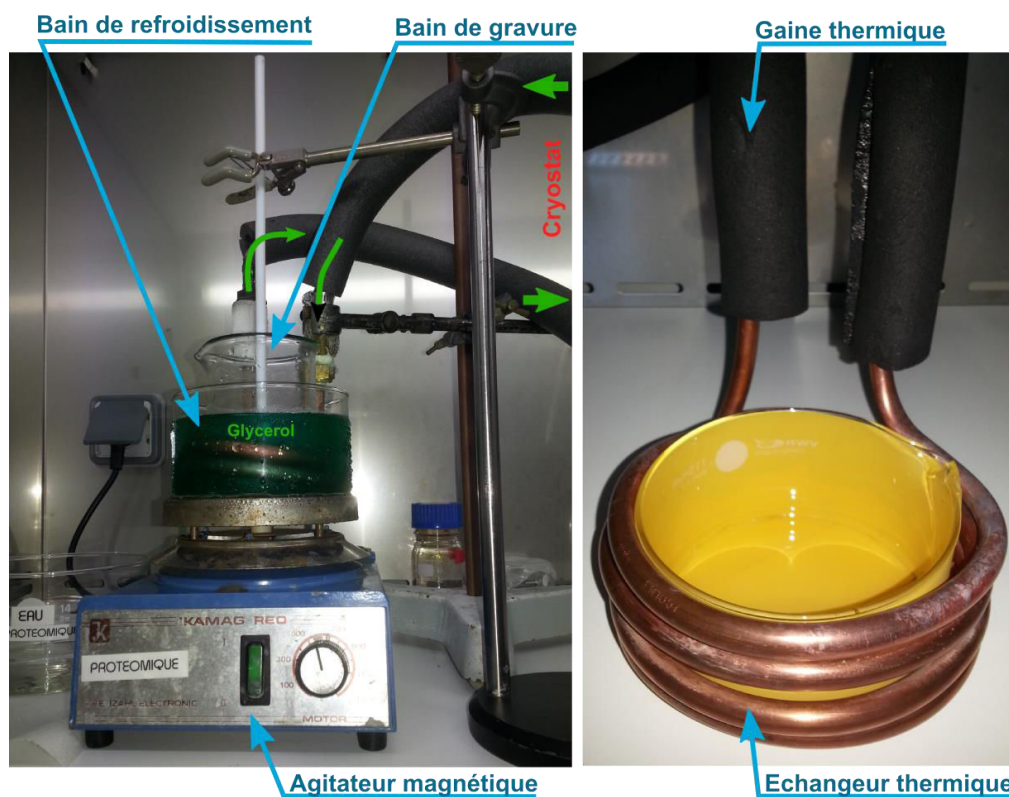


Figure 2.15: Montage utilisé pour la gravure humide de wafers 2 ou 3 pouces, avec bain de gravure réfrigéré ($T = 0^{\circ}\text{C}$) et agitation magnétique

La solution de gravure est placée dans un bain marie contenant du glycérol refroidi à 0°C. Le bain de refroidissement est contrôlé en température grâce à un échangeur thermique immergé et connecté à un cryostat (utilisant également du glycérol). La température de consigne du cryostat est fixée à -7.5°C pour obtenir une température de gravure constante de 0°C. Les tubes reliant le cryostat à l'échangeur thermique sont toutefois isolés par une gaine thermique. Le système d'agitation est placé en-dessous des béciers et l'agitateur magnétique (20mm de longueur) à l'intérieur du bain de gravure. Le ou les wafer(s) à

graver sont maintenus dans la solution de gravure à l'aide d'un support. Ils sont orientés face vers le bas, vers l'agitateur pour avoir une action directe de celui-ci sur le renouvellement des réactifs en surface. Nous avons testé la gravure simultanée des deux faces du wafer mais cette solution a été très vite abandonnée, car le rendu de la gravure sur la face supérieure est mauvais (forte rugosité, présence de produits de réaction non-dissous, taux de gravure lent, micro-masquage des flancs de gravure...) dû à un mauvais renouvellement de la solution de ce côté. Nous réalisons donc deux gravures « simple face » avec pour chacune l'autre face protégée par une couche de résine non-exposée ni développée.

Le procédé de base nécessite 3 masques différents : (1) un masque contenant les motifs de membranes et indicateurs de gravure, (2) un autre avec seulement les indicateurs de gravure (Figure 2.16a) et enfin (3) un pour les électrodes (Figure 2.26). Dans le cas, des membranes usinées sur les deux faces, nous utilisons deux fois le premier masque au cours du procédé (Figure 2.16b). La première fois le masque est utilisé pour réaliser les motifs sur la face avant (avant l'étape de dépôt des électrodes) puis la seconde fois sur la face arrière du wafer (après l'étape de dépôt des électrodes). Plusieurs géométries de membranes ont été réalisées : en début de thèse, des membranes de 4mm par 3mm puis des membranes carrées de 4mm de côté. En vue de la séparation des dispositifs, des traits de découpe de 200 μm de largeur ont été ajoutés sur le premier masque. En effet, le clivage de wafer de $\sim 600\mu\text{m}$ n'est pas possible et la découpe du GaAs ne peut pas être réalisée au sein de notre laboratoire.

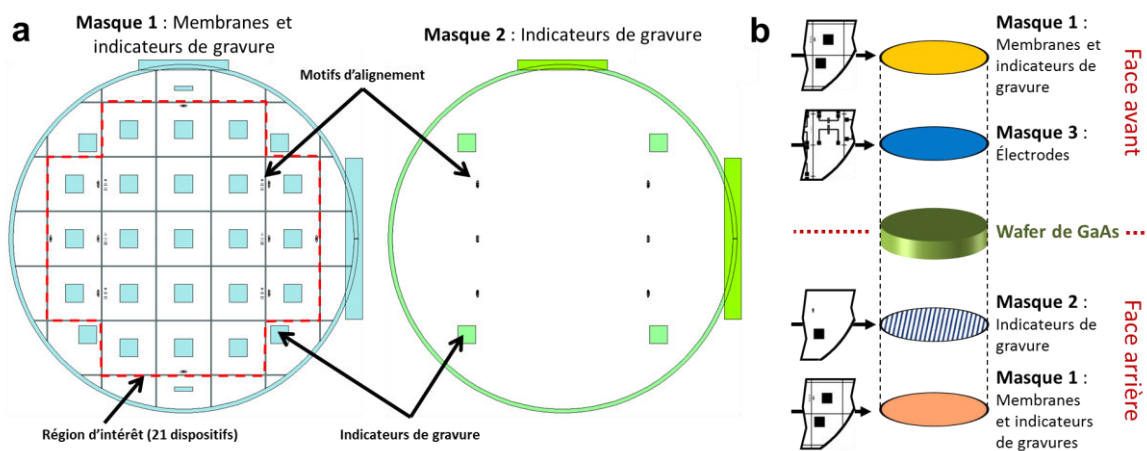


Figure 2.16: (a) Masques de gravure des membranes et des indicateurs de gravure et (b) représentation de l'ordre des masques par rapport au wafer de GaAs.

Les profondeurs de gravure escomptées sont relativement importantes et nécessitent donc des temps de gravure très longs (5-7 heures). Or l'efficacité de la réaction diminue significativement au bout de quelques heures de gravure due à l'appauvrissement de la solution en réactifs et à l'augmentation des produits de réaction. Pour la durée de l'opération, le taux de gravure de la solution varie, en général, de 4 à 0.5 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. Pour une durée de 4h, nous obtenons un taux de gravure moyen d'environ 1 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. De façon à pouvoir contrôler approximativement la profondeur de gravure et donc l'épaisseur des membranes, nous réalisons 4 indicateurs de gravure situés au bord du wafer à graver, et de même dimension que les membranes. Ces témoins visuels consistent à usiner des motifs de même dimension et dont la profondeur sera équivalente à l'épaisseur de la membrane escomptée. Il convient de préciser qu'il est difficile de contrôler avec précision l'épaisseur de la membrane. En revanche dès l'instant où les indicateurs de gravure seront débouchants, nous pourrons effectuer un contrôle plus précis des profondeurs par plusieurs mesures profilométriques successives. L'hétérogénéité de la gravure fait que cette technique reste délicate à maîtriser mais est la seule possible sans l'utilisation de couches d'arrêt (« etch stop »).

Pour la première gravure humide, nous utilisons initialement un masque de résine standard S1813 (*MicroChem*) déposée par *spincoating* à 4000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ et donnant une épaisseur de 1.4 μm . Mais les longues gravures la consumaient sur toute l'épaisseur. Nous avons donc utilisé par la suite, la résine S1828 (plus visqueuse) déposée à 2500 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ donnant une épaisseur de 3.8 μm environ, ce qui a résolu le problème.

Pour la seconde gravure, après le dépôt des électrodes, étant donné que le wafer a déjà été structuré, il est impossible de déposer la résine par *spincoating*. En effet, s'il l'on souhaite recouvrir de résine un wafer qui contient déjà des motifs usinés, il faut employer la technique de pulvérisation (*spraycoating*). Nous utilisons pour cela un *spraycoater* (Delta *Alta Spray* de *SüssMicrotec*) pour déposer la résine AZ9260 à une épaisseur de 6 ± 1 μm . La couche de résine déposée par *spray* est moins homogène en épaisseur qu'une couche déposée par *spincoating* mais suffit à protéger correctement la surface lors de la gravure humide.

Le procédé complet, indiquant pour chaque étape les paramètres utilisés, est détaillé dans l'annexe D.

L'orientation de ces plans de gravure induira de la sous-gravure sur les bords des membranes. Afin de pouvoir estimer ce phénomène, une équation géométrique exprime la sous-gravure latérale : gravure sous masque sur profondeur atteinte ($R_{uc/d}$, pour « undercut/depth »).

On a donc pour le cas des profils sortants (OF ou « outward facet »), l'expression suivante :

$$R_{uc/d} = \frac{b_{OF}}{d_{OF}} = \frac{1}{R_a \sin(\alpha)} \quad (2.47)$$

où d_{OF} , b_{OF} , R_a et α sont respectivement la profondeur de gravure, la valeur de sous-gravure, le rapport d'anisotropie entre le plan (111)A et (100) et l'angle entre ces deux plans. Nous avons réalisé une image au microscope électronique à balayage (MEB, *Supra 55 VP, Zeiss*) (Figure 2.18a) d'une coupe de membrane sur la face (011). Cette membrane d'épaisseur finale égale à $64\mu\text{m}$ a été gravée sur une profondeur cumulée de $574\mu\text{m}$ sur les deux faces du wafer. Les deux types de profils sont donc représentés. L'angle α a donc été évalué visuellement à $\alpha = 54.77^\circ$. Le profil rentrant présente quant à lui un angle β avec le plan (100) de 69.54° . Dans ce deuxième cas, le plan de gravure ne correspond pas tout à fait au plan (111)A. Ceci s'explique par un taux de gravure réduit lié à un faible renouvellement des réactifs de gravure dans les structures concaves.

Pour évaluer le rapport d'anisotropie expérimentalement, nous avons réalisé un certain nombre de mesures sur des images au microscope optique de motifs variés avec des profondeurs de gravure différentes. Sur 15 mesures (et 3 profondeurs différentes), nous avons obtenu un rapport $R_{uc/d} = 0.501 \pm 0.066$. Comme nous l'avons prédit, le rapport est constant et ce, quelle que soit la profondeur de gravure. Le rapport d'anisotropie R_a est donc estimé à 2.44 pour ces conditions d'usinage. Ce dernier est toutefois supérieur à celui rapporté précédemment ($R_a = 1.6$)¹⁹⁷.

La valeur de sous-gravure au niveau de la membrane est quant à elle donnée par l'expression suivante :

$$R'_{uc/d(OF)} = \frac{a_{OF}}{d_{OF}} = \frac{\tan(\alpha) R_{uc/d} - 1}{\tan(\alpha)} \quad (2.48)$$

La valeur obtenue est égale à $R'_{uc/d} = 0.290$, ce qui implique que les motifs, selon cette orientation, seront élargis de 29% de la profondeur de gravure ce qui n'est pas négligeable devant les dimensions des motifs pour des gravures profondes. Ceux-ci vont de $200\mu\text{m}$ pour la largeur des traits de découpe à 4mm pour la largeur des membranes.

Pour les profils rentrants, nous ne pouvons malheureusement pas évaluer par microscopie optique le rapport sous-gravure-profondeur. Nous considérons donc le rapport d'anisotropie ($R_a = d_{IF}/c_{IF}$) comme équivalent à celui obtenu précédemment pour ces deux même plans. On en déduit le rapport de sous-gravure au niveau du masque $R_{uc/d}$ équivalent à celui du profil sortant.

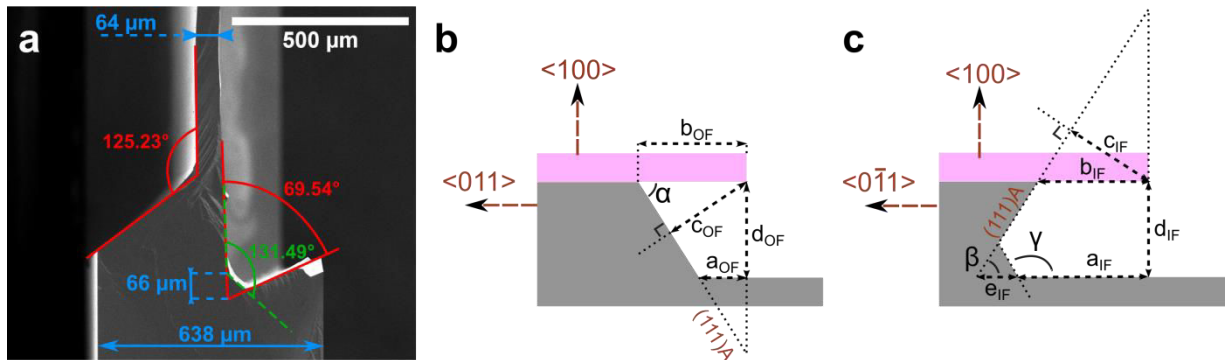


Figure 2.18: (a) Image MEB d'une coupe de membrane de GaAs usinée par gravure humide et représentations schématiques (b) du profil rentrant et (c) du profil sortant d'une gravure anisotrope du GaAs.

L'expression du rapport de sous-gravure au niveau du masque avec la profondeur correspond à :

$$R'_{uc/d(IF)} = \frac{a_{IF}}{d_{IF}} = R_{uc/d} (R_a \cos(\beta) + 1) - \frac{e_{IF}}{d_{IF}} \quad (2.49)$$

On considère le rapport e_{IF}/d_{IF} constant et égal à 0.245, la valeur du rapport de sous-gravure est alors de $R'_{uc/d(IF)} = 0.683$. Les coefficients obtenus pour les angles rentrants sont approximatifs mais cela est suffisant pour l'estimation des sous-gravures. Nous remarquons également que les plans (001) et (010) apparaissent dans les angles droits aux intersections des plans $(0\bar{1}1)$ et (011) (Figure 2.19b).

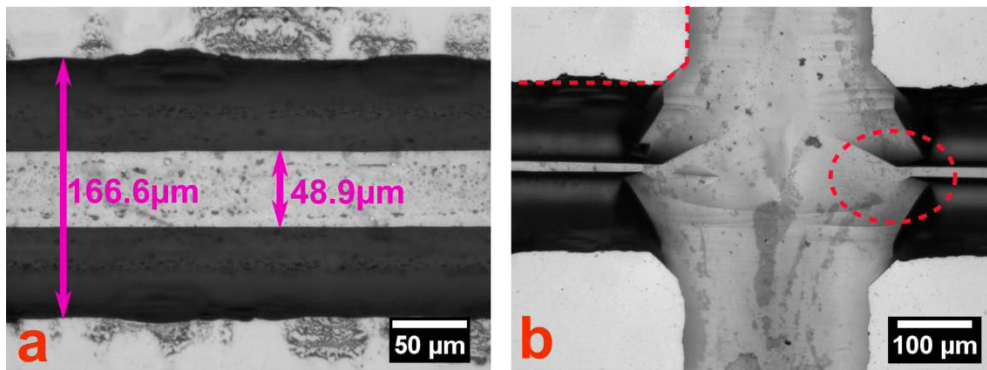


Figure 2.19: Image au microscope (a) d'un trait de découpe usiné chimiquement selon la direction $\langle 0 \ 11 \rangle$ et (b) d'un croisement de deux lignes de découpe.

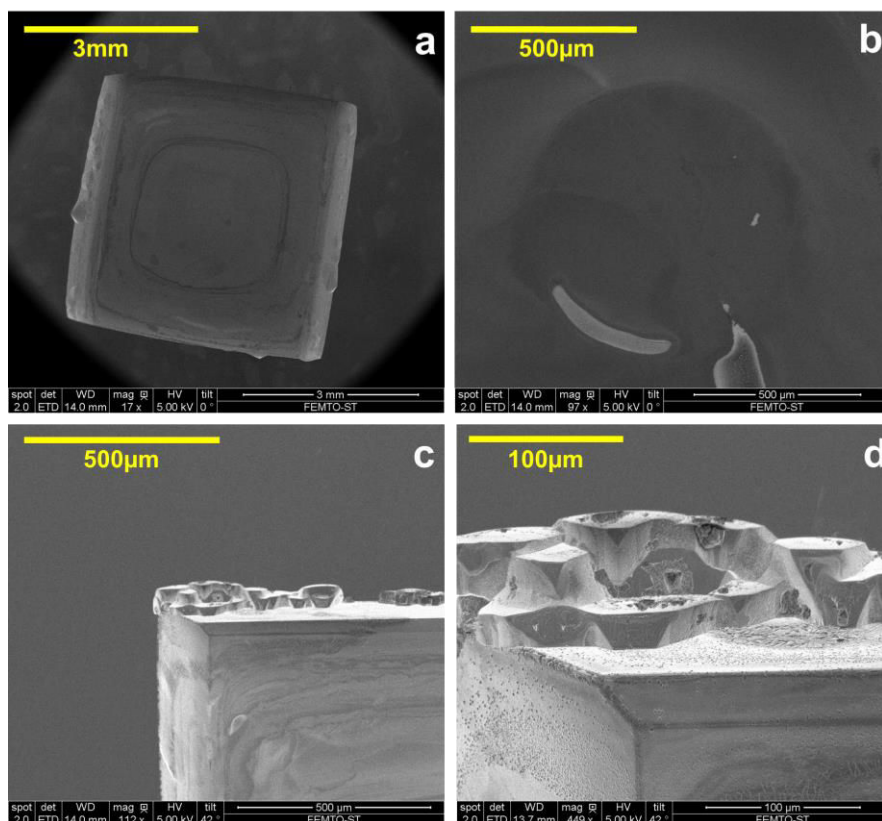


Figure 2.20: Images MEB (a) d'une membrane, (b) d'un défaut formé (bulle d'air) lors d'une gravure, (c) d'un angle de membrane et (d) du zoom sur cet angle.

Nous observons sur les images MEB (Figure 2.20a, c et d) et sur la vue de coupe (Figure 2.18a) que des défauts sont présents au niveau de l'angle entre les plans (100) et (111)_A pour les profils rentrants. Ceci peut être expliqué par la nature convexe de la structure, ce coin est donc plus affecté par les attaques chimiques de la solution. Néanmoins, ces défauts n'altéreront en rien les propriétés du résonateur. En revanche, les longs temps de gravure impliqués dans ce processus peuvent entraîner une hétérogénéité dans la gravure ou une

certaine isotropie de la gravure de fond de membrane liée notamment aux effets de bords. Plus grave, la probabilité de formation de bulles d'air peut affecter de façon irréversible la gravure de la membrane comme nous le montre la Figure 2.20b.

Pour conclure, la gravure humide est une stratégie intéressante économiquement puisqu'elle ne nécessite pas l'utilisation d'appareils coûteux et sophistiqués mais elle semble atteindre ses limites pour les usinages profonds ou sur de grandes surfaces. Comme nous l'avons vu, de longs temps d'usinage peuvent induire à la fois, une perte d'anisotropie de la gravure et l'apparition de défauts (bulles d'air, micro-masquages, ombrage dû aux flancs de gravure...) qui peuvent fortement réduire les performances du résonateur. De plus, la reproductibilité de la profondeur atteinte d'une membrane à une autre sur un wafer 3 pouces n'est pas toujours bonne. Par exemple, sur l'ensemble des membranes d'un wafer d'une profondeur moyenne de $272.75\mu\text{m}$, l'écart type sur 12 mesures est d'environ 1.8%. Sur un même échantillon et pour des profondeurs de gravure supérieures à $200\mu\text{m}$, les variations de profondeur peuvent parfois atteindre plusieurs microns. Cette dernière observation nous montre les limites de cette technique dans la réalisation de structures membranaires planes et reproductibles à l'échelle d'un wafer entier. La conséquence sur le résonateur est une perte évidente de ses performances.

2.4.4 Usinage par gravure plasma

Nous avons vu précédemment les limites de la gravure humide notamment la reproductibilité et la difficulté pour obtenir des gravures nettes avec un état de surface lisse, plan et sans défaut après plusieurs heures de gravure. Cette constatation nous conduit à étudier d'autres techniques de gravure. De plus le taux de gravure dans les conditions d'une gravure longue est relativement difficile à maîtriser. Une alternative intéressante à la gravure humide pour la fabrication de membranes de GaAs est l'utilisation des techniques de gravure plasma. Ce procédé permet de réaliser une gravure hautement anisotrope avec un excellent profil de gravure. De cette façon, il est possible d'obtenir des surfaces lisses et planes et de contrôler avec une plus grande précision les profondeurs de gravure. Nous avons réalisé une étude préliminaire de la technique de gravure qui offre des perspectives intéressantes pour de futurs travaux. Par manque de temps, ce procédé n'a pas été employé pour la fabrication complète des dispositifs.

Nous utiliserons dans le cas présent un système ICP III-V (*Multiplex Inductively Coupled Plasma SR III-V system*) de la compagnie *Surface Technology Systems* couramment employé pour la gravure de composés III-V et de métaux par plasma à haute densité, basse pression et basse énergie. La source ICP (« Inductively Coupled Plasma ») permet de créer un plasma haute densité à l'aide d'une antenne en forme de spirale, émettant des fréquences de l'ordre du MHz (13.56MHz) selon un couplage inductif (Figure 2.21). Il en résulte que les électrons sont alors déviés par le champ électromagnétique et tournent hélicoïdalement pendant suffisamment de temps pour acquérir assez d'énergie pour ioniser le gaz. Les ions sont plus lourds que les électrons et se déplacent beaucoup plus lentement sous l'action du champ électromagnétique. Le plasma est formé par la création de paires ions/électrons liées aux collisions inélastiques entre les électrons chauds et les atomes neutres.

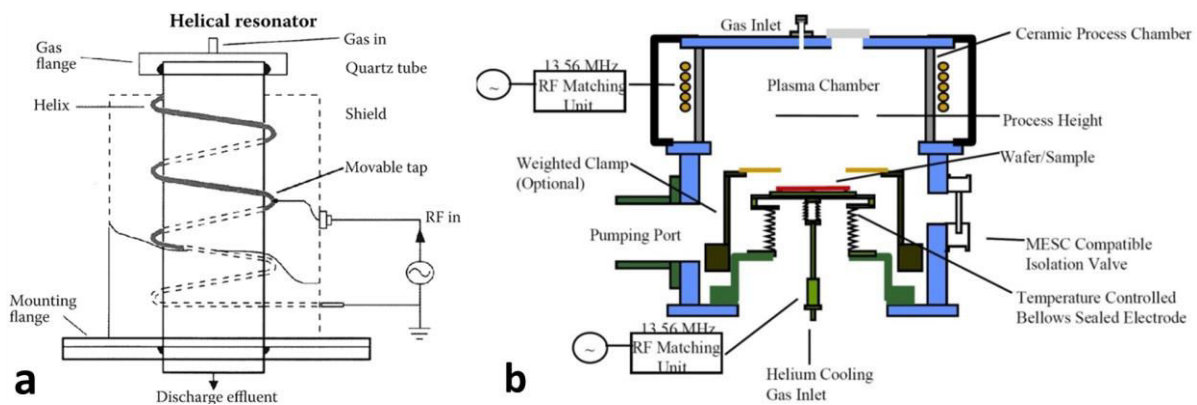


Figure 2.21: Schéma (a) d'un réacteur de plasma couplé à l'induction²⁰⁵ et (b) de l'intérieur d'une chambre de gravure plasma ICP²⁰⁶.

La gravure plasma du GaAs est de plus en plus fréquemment réalisée par des chimies chlorées à température ambiante, qui fournissent un haut taux de gravure et donnent un état de surface relativement lisse²⁰⁷. Les gaz les plus utilisés sont le dichlore (Cl_2), le trichlorure de bore (BCl_3), le tétrachlorométhane (CCl_4), le tétrachlorure de silicium (SiCl_4) ou une combinaison de plusieurs d'entre eux. Les gaz à base de fluor peuvent également être utilisés pour produire une gravure plus sélective mais leurs produits de réaction sont en revanche non-volatils²⁰⁷. C'est-à-dire qu'ils produiront des surfaces présentant des micromasques liés à une mauvaise évacuation de ces espèces, à l'inverse des produits de réaction volatils tels que les plasmas de chlorure. L'association des gaz BCl_3 et Cl_2 augmente la concentration d'atomes de chlore neutres et permet la création d'ions plus lourds donnant une meilleure anisotropie²⁰⁸ et un taux de gravure plus élevé²⁰⁹. Il est admis

que la gravure plasma est le résultat de la combinaison d'une gravure chimique isotrope et d'une gravure physique anisotrope (ou gravure ionique). La gravure physique est opérée par les ions qui frappent la surface avec une certaine énergie cinétique. Pour augmenter l'anisotropie du procédé, des atomes neutres et lourds tels que l'argon sont injectés dans le mélange de gaz réactifs. A l'inverse la gravure chimique est réalisée par les radicaux, et non par les ions. Les espèces réactives sont produites dans le gaz du plasma, et diffusent vers la surface pour y être adsorbées avant de réagir avec cette dernière. Les produits de réaction sont ensuite éliminés par désorption puis par diffusion. L'inconvénient d'une gravure plus physique est que le bombardement ionique affecte autant le masque que le substrat, la sélectivité est donc réduite. En général, plus le taux de gravure est lent, plus la profondeur de gravure maximale atteinte sera élevée, grâce au temps mis pour la diffusion des produits de réaction et des espèces réactives à travers le plasma²¹⁰. La recette utilisée dans ces travaux est composée du mélange des gaz BCl_3 , Cl_2 , Ar ^{208,211}.

Masque de gravure

La principale difficulté de l'usinage plasma est de trouver un masque suffisamment sélectif pour réaliser une gravure profonde mais qui ne risque pas d'endommager ou de polluer la surface du GaAs. On peut trouver dans la littérature plusieurs types de masques compatibles avec les plasmas chlorés à haute densité formés par des sources ICP : SiO_2 ²¹², $\text{SiO}_2 + \text{Cr}$ ²⁰⁸, $\text{SiO}_2 + \text{Ni}$ ²¹², Ni ^{210,212}, Photo-résines épaisses^{207,211,213} ou SiNx ^{207,212,214}.

Pour des gravures profondes à haut facteur de forme (par exemple des vias de 200 μm), Rawal et al. préfèrent utiliser des masques en résine aux masques métalliques²¹⁰ tandis que d'autres auteurs optent pour des masques métalliques (ou « hard mask ») ou comme Volatier et al. une superposition de SiO_2 et de Cr ²⁰⁸. Ces derniers masques présentent deux avantages : (i) une relativement bonne sélectivité due à leur résistance aux chimies chlorées (ii) aucun re-dépôt qui pourrait engendrer des défauts de gravure. Cependant, les effets des masques de résine sont pertinents pour ce procédé. En effet, ils donnent un meilleur état de surface mais leur taux de gravure est réduit à cause de la re-déposition après bombardement des fragments BClx ou des produits de réaction et résidus de résines à la fois sur les zones à graver et sur les parois de gravure (comme une passivation)^{210,212,214,215}. Plusieurs rapports montrent l'intérêt d'un masque de résine pour la formation de motifs avec des parois inclinées et plus lisses dues à la redéposition de la résine sur celles-ci²¹². Enfin, ils nécessitent moins d'étapes pour être conçus et sont peu coûteux.

Nous avons opté pour des masques avec une couche initiale de SiO₂ avec ou sans surcouche métallique. Le SiO₂ permet d'éviter la diffusion d'éléments métalliques provenant des éventuelles surcouches. Par méthode essai-erreur, nous avons testé les masques suivants : (1) SiO₂, (2) SiO₂ + Ni, (3) SiO₂ + Al et (4) SiO₂ + résine épaisse. Pour l'ensemble des masques testés, un dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (ou PECVD, « Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition ») de SiO₂ est réalisé sur une épaisseur d'environ 2µm.

Pour les masques avec la surcouche métallique (2 et 3), le dépôt est réalisé par évaporation (Système *Auto 306* de la compagnie *BOC Edwards*) puis structuré par procédé « lift-off ». Le nickel a été déposé sur une épaisseur de 400nm tandis que l'aluminium l'a été sur une épaisseur de 6µm. Lors des tests, l'aluminium n'a pas tenu sur le SiO₂ (même à épaisseur réduite) et s'est décollé lors de l'étape de soulèvement (« lift-off »). La stratégie de masque SiO₂ + Al n'est donc pas envisageable pour la gravure plasma.

Le dernier masque testé (4) est constitué d'une couche de SiO₂ et d'une surcouche de résine positive épaisse AZ9245 (*MicroChemicals*) de 5 µm. Après le dépôt et la structuration de la surcouche, le SiO₂ est gravé par plasma fluoré dans le système *Multiplex Advanced Oxide Etch (AOE) ICP* (de *Surface Technology Systems*).

Gravure plasma

Dans ces travaux, le plasma est obtenu à partir des gaz BCl₃, Cl₂ et Ar. Les débits des gaz Cl₂/BCl₃/Ar sont respectivement de 10/10/10sccm. Le plateau sur lequel est posé l'échantillon à graver mesure 200mm de diamètre. La puissance du réacteur ICP est de 500W (puissance RF) tandis que la puissance de polarisation du plateau est de 50W. La température du plateau est réglée à 20°C et la pression de la chambre est fixée à 0.67Pa (ou 5mTorr). De par les longs temps de gravure (50min à 3h) nécessaires pour atteindre les objectifs de profondeur, il est primordial de réaliser celle-ci par étapes de 15-20min afin d'éviter l'échauffement local de la surface surtout pour les échantillons dotés d'un masque en résine (celle-ci risque de brûler). Les gravures sont maintenues jusqu'à ce que la totalité du masque soit consommée. Nous avons réalisé des tests de gravure sur de petits motifs et avec chaque type de masque, les résultats sont résumés dans le Tableau 2.4. Deux résultats différents apparaissent lorsque l'échantillon à graver est collé ou non sur le porte-substrat du système ICP III/V. En effet, les échantillons sont soit collés avec de la cire thermique (*Crystal Bond 555-HMP* de *SPI supplies*) pendant la durée de cette étape, soit simplement

posés sur le porte-substrat. Nous pensons que la conductivité thermique diffère d'un cas à l'autre. Il en résulte des profondeurs de gravure et un état de surface différent. Sur les Figure 2.22 A à C et D à F sont représentées les images MEB des gravures avec masque de SiO_2 (Échantillons de type 1), respectivement, lorsque le substrat est collé au support et lorsqu'il ne l'est pas. Pour la même épaisseur de masque ($2.1\mu\text{m}$ de SiO_2) et pour une même durée de gravure, nous observons des gravures moins profondes pour les échantillons collés sur le porte-substrat mais dotés d'un état de surface de meilleure qualité par rapport aux échantillons non-collés. La profondeur obtenue dans la configuration « collée » est de $26\text{-}27\mu\text{m}$ donnant un taux de gravure $530\text{nm}/\text{min}$ pour le GaAs contre $37\text{nm}/\text{min}$ pour le SiO_2 . Lorsque le substrat n'est pas collé, nous obtenons une profondeur de $62\mu\text{m}$ donnant un taux de gravure de $1230\text{nm}/\text{min}$ pour le GaAs et toujours $37\text{nm}/\text{min}$ pour le SiO_2 . On observe sur les Figure 2.22a et b, des résidus sur les parois qui se détachent ou qui délaminent sur l'échantillon collé. La paroi conserve, tout de même, une très bonne verticalité des flancs à l'inverse de l'autre configuration qui a un profil plus isotrope. Enfin la rugosité de surface observée sur les images MEB semble plus importante sur l'échantillon non-collé.

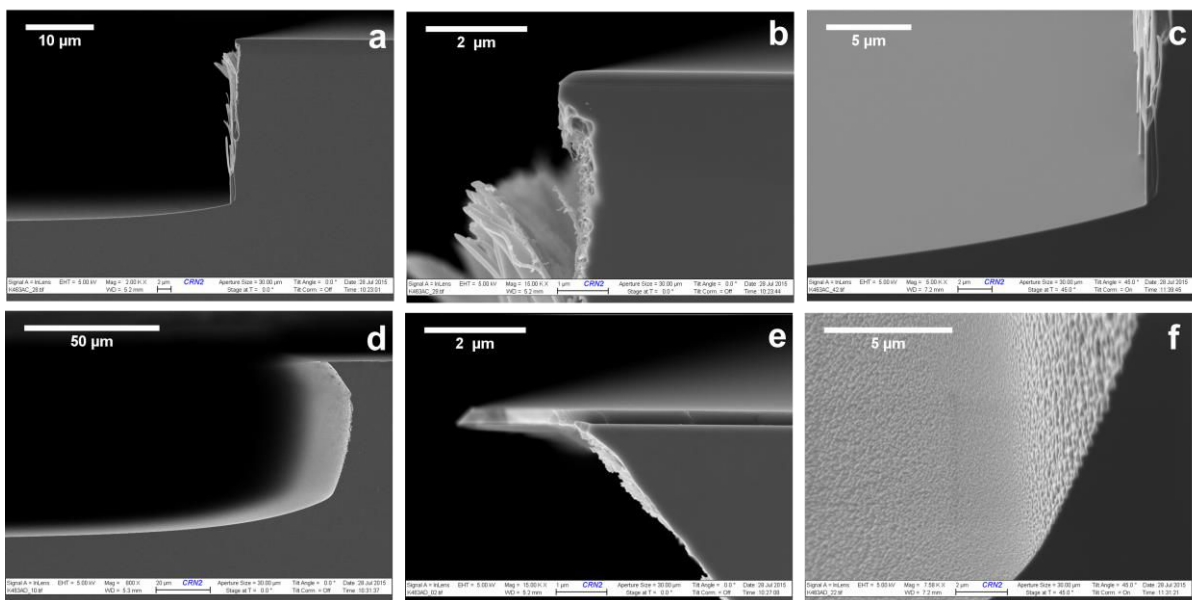


Figure 2.22: Images MEB de gravures plasma du GaAs avec un masque de SiO_2 et avec le substrat (a-c) collé ou (d-f) non-collé au porte-échantillon.

Nous avons ensuite testé des masques de SiO_2 combinés avec une résine (AZ4903) ou une couche métallique (Ni ou Al). Les gravures ont été réalisées, cette fois-ci, sur des échantillons collés sur le porte-substrat, uniquement. Le masque $\text{SiO}_2 + \text{Ni}$ a permis de

tripler la profondeur de gravure (Figure 2.23) alors que le masque SiO_2 + résine a donné une profondeur de près de $200\mu\text{m}$ (Figure 2.25a).

#	Masques	Particularités de la gravure	Résultats	Inconvénients
1	SiO_2 ($2.1\mu\text{m}$ par PECVD)	Collé au porte-substrat	<ul style="list-style-type: none"> • Prof. max : $26-27\mu\text{m}$ • Gravure anisotrope • Très faible rugosité • Résidus sur les parois qui délaminent 	La gravure est longue et nécessite d'être réalisée en plusieurs étapes.
		Non-collé	<ul style="list-style-type: none"> • Prof. max : $62\mu\text{m}$ • Gravure légèrement isotrope ($\sim 9.5\mu\text{m}$ en gravure latérale) • Surface rugueuse 	L'objectif en profondeur n'est pas atteint
2	SiO_2 ($2\mu\text{m}$ par PECVD) + Ni (500nm par évaporateur)	Collé au porte-substrat	<ul style="list-style-type: none"> • Prof. max : $75.6\mu\text{m}$ • Mauvaise verticalité des profils • Problème d'adhérence du Ni • Résidus sur les parois qui délaminent 	La gravure est longue et nécessite d'être réalisée en plusieurs étapes.
3	SiO_2 ($2\mu\text{m}$ par PECVD) + Al ($6\mu\text{m}$)	<i>La surcouche d'aluminium n'a pas tenu sur le SiO_2</i>		
4	SiO_2 + Résine épaisse (AZ4903)	Collé au porte substrat	<ul style="list-style-type: none"> • Prof. max : $200\mu\text{m}$ • Gravure anisotrope • Flanc verticaux • Résidus sur les parois qui délaminent 	La gravure est longue et nécessite d'être réalisée en plusieurs étapes pour ne pas brûler la résine. Apparition de piqûres et de défauts de gravure par micro-masquage.

Tableau 2.4: Résultats de gravure plasma du GaAs selon les masques utilisés

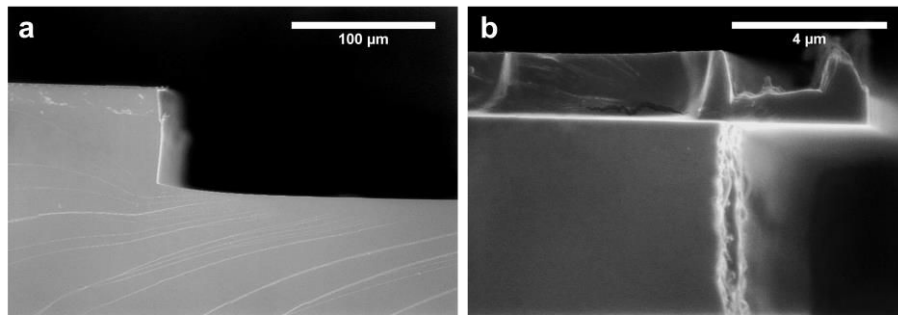


Figure 2.23: Images MEB de gravures plasma du GaAs avec un masque de SiO₂ + Ni et avec le substrat collé au porte-échantillon; (a) vue en coupe et (b) zoom sur le flanc de la membrane.

Le masque SiO₂ + résine semble être la meilleure protection pour réaliser une gravure profonde du GaAs. Cependant, nous avons observé la présence d'un certain nombre de résidus de réaction lorsque l'échantillon est collé au porte-substrat ce qui engendre des défauts de gravure par micro-masquage au fond des membranes (Figure 2.24). Toutefois en dehors de ces défauts, la rugosité de surface et les flancs de gravure pour la profondeur atteinte sont de bonne qualité (Figure 2.25b et c).

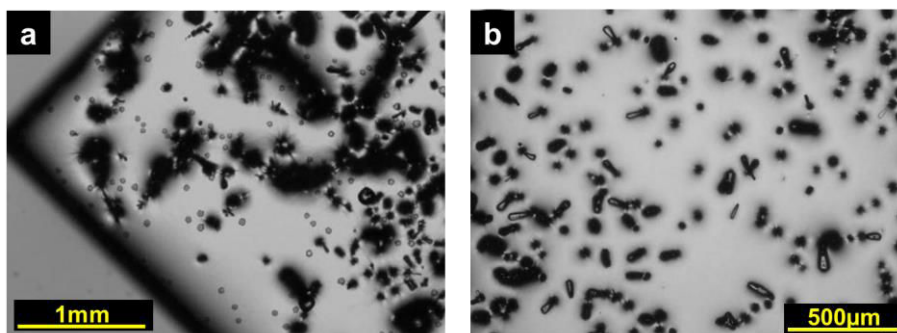


Figure 2.24: Images au microscope optique des défauts de gravure induits par la re-déposition de produit de réaction ou de débris de résine lors du processus de gravure plasma.

Voici plusieurs hypothèses relatives à l'apparition de ces résidus :

- la couche de SiO₂
- la couche de résine
- le gaz BCl₃, il est connu que le BCl₃ dépose des sous-produits de bore sur les parois
- des contaminants dans la chambre de gravure
- une combinaison de plusieurs d'entre-elles.

D'autres tests de gravure avec un plasma Cl₂/Ar réalisés sur des substrats de GaN avec soit un masque de SiO₂ soit un masque de résine, montrent la présence de résidus uniquement

avec la résine. Mais l'hypothèse la plus convaincante est la présence de contaminants dans la chambre de gravure. En effet, le système ICP III-V est utilisé pour la gravure de nombreux matériaux, y compris des substrats métalliques. Même si la chambre est nettoyée régulièrement, il est possible pour de longues gravures que des résidus non-volatils se redéposent sur les échantillons.

Les solutions proposées pour résoudre ces problèmes sont les suivantes :

- réaliser un nettoyage approfondi de la chambre

ou lors de l'utilisation de résine :

- augmenter les temps de pause pour laisser refroidir le masque
- tester d'autres résines que l'AZ4903

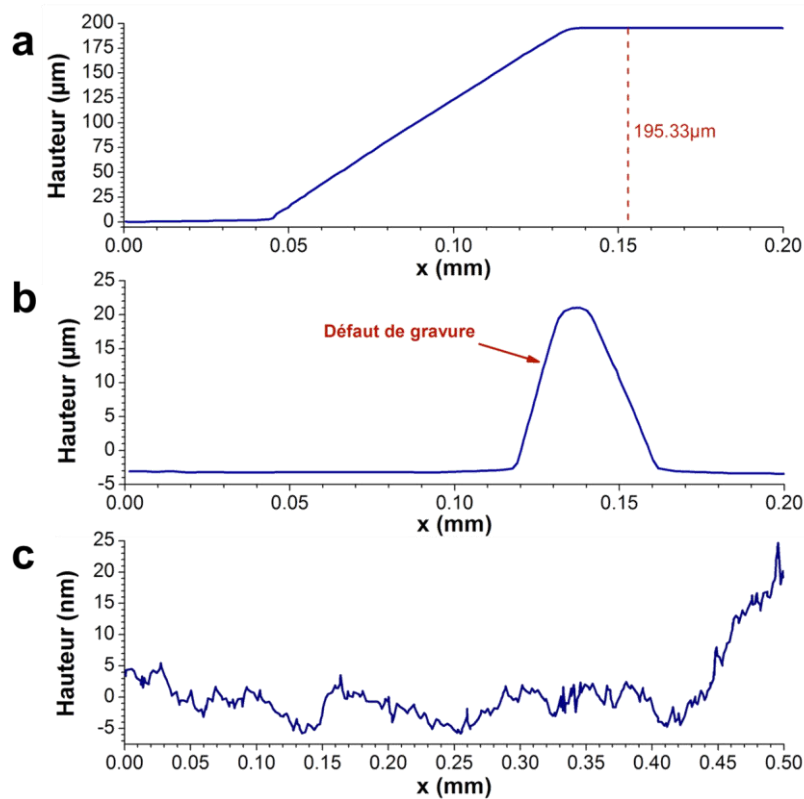


Figure 2.25: Mesures profilométriques (a) d'une marche et d'un fond de membrane gravé par plasma, (b) avec ou (c) sans défaut.

Pour conclure, la gravure plasma est une technique qui se révèle prometteuse. En dépit des problèmes de micro-masquage obtenus dans certains tests et qui devraient pouvoir être résolus sans trop de difficultés, l'état de surface des membranes, des flancs et leur planéité sont de très bonne qualité. Nous avons réussi à atteindre près de 200 μm de profondeur de gravure ce qui est suffisant pour réaliser des membranes fines avec nos wafers. De plus, le

procédé est relativement reproductible et permet facilement d'avoir une homogénéité de profondeur sur l'ensemble des structures d'un wafer.

2.4.5 Dépôt des électrodes

Dépôt par pulvérisation cathodique et problèmes de diffusion

Les électrodes, constituées d'une couche d'or et d'une couche d'accroche en chrome, sont déposées par pulvérisation cathodique sur le GaAs. La pulvérisation cathodique est une technique de microfabrication très courante pour le dépôt de tout type de matériaux. Elle utilise un plasma froid qui permet d'arracher les atomes sous forme de particules neutres d'une cible constituée du matériau désiré, ces atomes sont ensuite condensés sur le substrat. Nous avons testé initialement le procédé direct. Le dépôt est effectué sur la totalité de la surface du substrat, puis les étapes de photolithographie permettent de réaliser un masque en résine pour structurer les électrodes sur ce dépôt. Enfin l'or et le chrome sont gravés chimiquement par des solutions respectivement à base d'iodure et de nitrate d'ammonium sérique. Nous nous sommes aperçus qu'il y a un phénomène de diffusion dans le semiconducteur lors du procédé de dépôt ce qui rend le GaAs conducteur. Même en prolongeant les temps de gravure des métaux le GaAs restait conducteur. Il n'a pas été possible de récupérer les propriétés d'origine du GaAs sans détériorer profondément sa surface. Dans la littérature, on peut voir qu'à partir d'une certaine température, l'or déposé inter-diffuse avec le GaAs²¹⁶. Le phénomène débute par une dissolution partielle des oxydes et du GaAs en surface puis les atomes d'or et de gallium pénètrent respectivement par diffusion dans le semiconducteur et dans la couche métallique²¹⁶. Le phénomène d'inter-diffusion apparaîtrait à environ 260°C²¹⁷ cependant le dépôt par pulvérisation cathodique ne dépasse pas les 100°C. Nous pensons que la pénétration des atomes métalliques dans le semiconducteur est liée aussi à une énergie de bombardement trop importante. Afin de remédier à ce problème, nous effectuerons le dépôt par procédé « lift-off ». Cela consiste à déposer les couches métalliques sur la résine déjà photolithographiée puis à les retirer des zones à protéger par « soulèvement » (dissolution de la résine). Après retrait de la résine, seuls les motifs d'électrodes subsistent sur le semiconducteur. Aucun problème d'inter-diffusion ou de pénétration n'a donc été observé dans cette situation.

Masque et motifs

Le masque des électrodes permet de les réaliser pour 21 échantillons (au sein de la région d'intérêt). Chaque échantillon comporte 2 paires d'électrodes, une paire principale utilisée dans la totalité des mesures et une secondaire permettant accessoirement d'utiliser le dispositif en quadripôle (« émetteur-récepteur »). La Figure 2.26 montre le masque en entier ainsi que la géométrie d'une paire d'électrode « classique ». Le gap entre les deux électrodes, pour la majorité des motifs, est de $200\mu\text{m}$. Enfin plusieurs motifs d'électrodes différents sont réalisés afin de comparer l'impact de leurs paramètres géométriques sur le signal de résonance mesuré (voir partie 5.3.3 du chapitre 5).

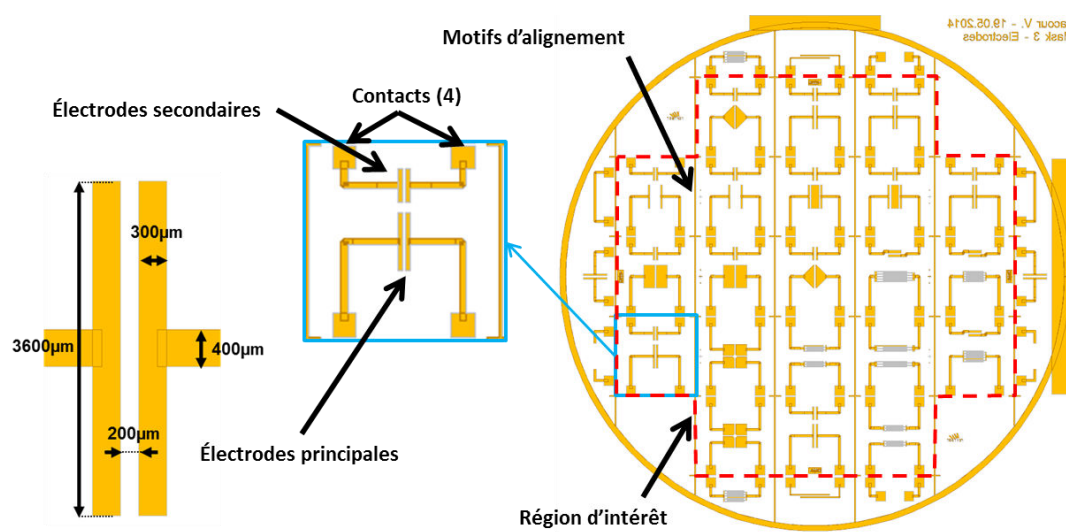


Figure 2.26: Motifs et masque des contacts électriques et des électrodes.

Dépôt sur une surface structurée

A la différence de l'évaporation, le dépôt par pulvérisation cathodique est beaucoup plus conforme (le dépôt épouse les profils). Or, comme nous l'avons précisé plus haut, nous souhaitons déposer les électrodes et leurs pistes sur une surface déjà usinée du substrat. D'après les mesures effectuées dans la partie 2.4.3, la paroi des profils sortants fait un angle de 54.77° avec la surface. La largeur des pistes traversant ce profil est de $400\mu\text{m}$ (sur le masque). Sur les surfaces structurées, il n'est pas possible de réaliser le dépôt de résine par « spincoating » car les différences de niveaux liées à l'usinage des membranes provoqueraient de fortes inhomogénéités de dépôt. Nous sommes contraints de déposer la résine par spray à l'aide du *spraycoater*. Le détail et les paramètres des étapes de photolithographie, dépôt et « lift-off » sont indiqués dans le tableau en annexe D.

Nous avons observé au microscope électronique à balayage (*Quanta Scanning Electron Microscope 450W, FEI*) la qualité du dépôt dans cette zone (Figure 2.27), et n'avons observé aucun défaut structurel. Enfin nous avons vérifié électriquement que la continuité des contacts avec les électrodes était bien assurée.

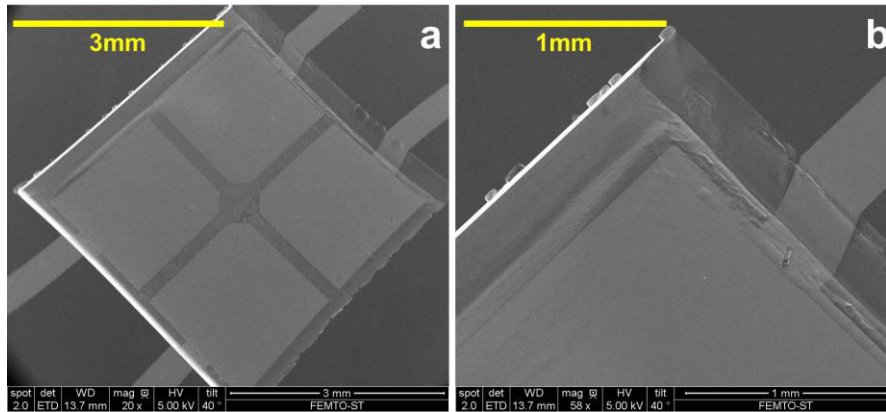


Figure 2.27: Images MEB (a) des électrodes déposées sur une surface usinée (membrane) et (b) agrandissement sur le dépôt de la piste électrique sur le flanc de gravure.

L'effet de la diffusion optique due à la distance plus éloignée entre le masque et la résine engendre une légère modification de la taille des motifs. Ainsi les zones protégées seront réduites par rapport à la taille du masque alors que les zones de dépôt seront plus larges. Selon le type de résine utilisé (et donc la durée d'exposition) et la profondeur des structures, le paramètre d'agrandissement δL sera plus ou moins élevé (Figure 2.28a).

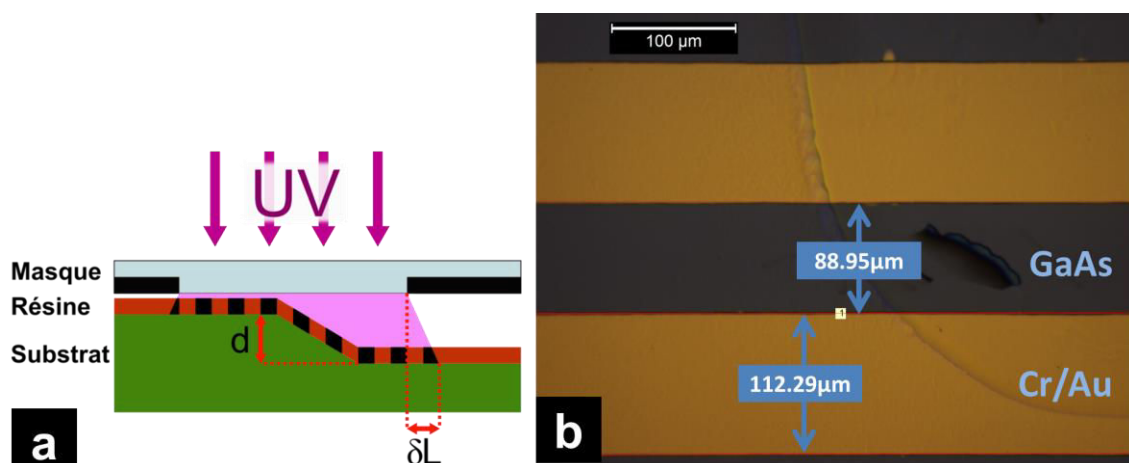


Figure 2.28: (a) Schéma d'exposition de résine sur une zone usinée et (b) image au microscope d'un dépôt de Cr/Au en fond de membrane.

La Figure 2.28b nous montre le dépôt d'électrodes au fond d'une membrane de $178\mu\text{m}$ de profondeur. Le rapport entre la différence de taille et la profondeur de gravure a été évalué à $\frac{\delta L}{d} = 0.069$ pour les paramètres d'exposition choisis.

2.5 Réalisation d'une interface fluidique

2.5.1 Stratégie de réalisation d'une interface fluidique

Nous projetons d'utiliser le capteur en milieu liquide. L'acheminement des liquides jusqu'à la zone sensible du capteur est réalisé grâce à un circuit fluidique. Plusieurs stratégies de cellules fluidiques seront envisagées. La première consiste à la réaliser directement sur le substrat en face arrière avec soit des ouvertures traversantes (Figure 2.29a) soit des trous débouchants sur la surface opposée (Figure 2.29b). Des aiguilles à injection seront employées pour les dispositifs à ouvertures traversantes permettant d'amener les liquides vers la surface fonctionnalisée. Pour les trous débouchants, une connectique couplée électrique/fluidique est envisagée. La dernière stratégie consiste à fabriquer l'interface fluidique sur un autre élément/wafer et à la reporter par collage sur la face arrière du dispositif (Figure 2.29c). Nous avons pensé à plusieurs matériaux pour fabriquer la cellule :

- Le silicium : structuré par gravure KOH selon les plans d'arrêt du matériau (111)
- Le FOTURAN® : verre photosensible et structurable par gravure HF
- Le polydiméthylsiloxane (PDMS) : polymère flexible qui peut être structuré par moulage et qui est beaucoup utilisé pour la fabrication de « lab-on-chip ».
- Le film sec (Ordyl ou SU8) : résine photosensible existant sous forme de film et qui après un long recuit (2h) polymérise pour créer des structures permanentes.

Le film sec a finalement été sélectionné car il peut être structuré facilement (technique standard de photolithographie), il se colle directement sur l'échantillon (et sur n'importe quelle surface) et a l'avantage de sceller la cellule avec un autre substrat (par exemple du verre). Les deux stratégies sélectionnées pour la structuration de la cellule fluidique sont présentées dans les prochaines parties et sont : une cellule fluidique intégrée sur le GaAs et une cellule fluidique fabriquée par report de film sec.

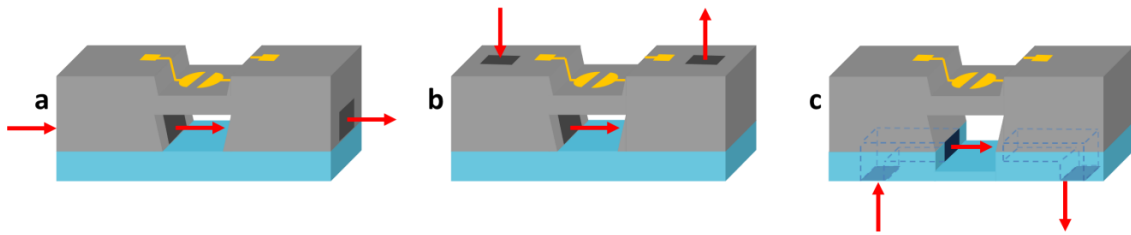


Figure 2.29: Les 3 différentes stratégies de conception de la cellule fluidique : cellules fluidiques intégrées dans le GaAs (a) avec les ouvertures traversantes ou (b) les ouvertures débouchantes sur la face opposée et (c) cellule fluidique rapportée sur le GaAs.

2.5.2 Interface intégrée sur le GaAs

Cette stratégie permet de réaliser simultanément la gravure de la cellule fluidique et de la membrane en face arrière. Elle présente l'avantage de réduire le nombre d'étapes de microfabrication généralement onéreuses. En revanche, la profondeur des canaux sera dépendante de celle de la membrane sur cette même face.

Le masque doit inclure les motifs de membrane et les motifs de canaux permettant d'acheminer les liquides vers celle-ci (Figure 2.30). Plusieurs géométries de cellule ont été conçues comprenant des arborescences facilitant la répartition de l'écoulement sur toute la surface de la cellule et limitant les volumes morts au sein de celle-ci. Des travaux antérieurs au sein du groupe ont mis en évidence les propriétés intéressantes de telle cellule dans l'amélioration des écoulements fluidiques^{218,219}. Nous avons testé cette stratégie uniquement avec la technique de gravure humide. Les paramètres de gravure anisotrope indiqués dans la partie 2.4.3 sont conservés pour ce procédé.

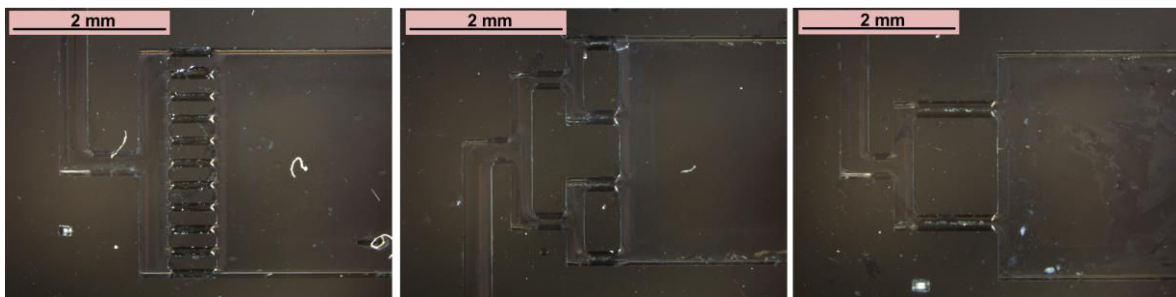


Figure 2.30: Images au microscope de différentes cellules microfluidiques usinées par gravure humide sur la face arrière du transducteur en GaAs.

La profondeur que doit atteindre la gravure est liée au diamètre des aiguilles, ici, 32G soit $260\mu\text{m}$ de diamètre. La largeur du motif du canal sur le masque nécessaire pour obtenir un sillon adapté à une aiguille 32G est calculée par rapport aux géométries de gravure détaillées dans la partie 2.4.3 et en tenant compte de la sous-gravure. La profondeur de

gravure est fixée à $\sim 260\mu\text{m}$, ce qui nous donne une sous-gravure de $130\mu\text{m}$ de chaque côté du sillon. La largeur du motif sur le masque doit être d'environ $40\mu\text{m}$.

Selon la configuration des ports d'entrée/sortie choisie dans cette approche, nous avons imaginé soit l'insertion d'une aiguille dans la longueur du canal soit l'utilisation d'une connectique fluide commerciale ou fabriquée en PDMS. Malheureusement aucune des deux solutions n'a pu être mise en œuvre de par la fragilité des dispositifs. En effet, les motifs d'usinage ont été alignés selon les orientations $\langle 011 \rangle$ et $\langle 0\bar{1}1 \rangle$ pour conserver une symétrie des canaux et de la cellule par gravure anisotrope. Cependant ces deux orientations correspondent également aux directions de clivage, directions selon lesquelles les liaisons cristallines sont plus faibles. Cela conduit à une plus grande fragilité des dispositifs, rendant impossible leur utilisation dans les conditions expérimentales en milieu liquide. De plus, la gravure anisotrope favorise l'usinage de profils plus anguleux qui entraînera la formation de volumes morts ou de bulles d'air. Enfin, un dernier inconvénient de taille que nous verrons par la suite, est que l'usinage de canaux ou de structures sur la face arrière du résonateur provoque l'apparition de résonances parasites perturbant le signal. Pour toutes ces raisons, nous avons écarté cette approche.

2.5.3 Structures fluidiques rapportées par film sec

Principes

L'utilisation d'un film sec pour, à la fois structurer une cellule fluide et sceller celle-ci avec un autre substrat (par exemple en verre) se présente comme une alternative attrayante. Nous emploierons, ici, des films d'Ordyl de la gamme SY300 produits par la compagnie Elga Europe. Pour l'utilisation de ces films, nous nous sommes inspirés des travaux de Vulto et al. qui disposent d'une forte expérience avec cette technologie notamment pour la réalisation de « Lab-on-chip »^{220,221}.

Les résines en films sec offrent d'excellents avantages par rapport aux résines liquides : elles adhèrent à de nombreux matériaux, peuvent être utilisées sur des substrats déjà structurés, ont une relativement bonne planéité, sont bon marché et ne nécessitent pas la manipulation de liquides. De plus, le film d'Ordyl SY300 propose des propriétés très intéressantes pour notre application puisqu'il dispose d'une excellente résistance chimique, qu'il est très stable, biocompatible et que la résolution atteinte en lithographie est relativement élevée pour ce type de film. La possibilité ensuite de rendre permanente les

structures par un recuit long fait de cette résine un excellent choix pour concevoir la cellule fluïdique.

Un des problèmes majeurs dans les systèmes microfluidiques est l'apparition de volume mort ou de bulles d'air lors du remplissage d'une cellule par un liquide. Bien qu'il soit possible de dégazer le liquide au préalable pour minimiser l'apparition de ces effets, ces phénomènes entraînent toutefois une perturbation non négligeable du signal électrique du résonateur. Nous avons donc choisi de réaliser des guides de phase qui, par capillarité, vont diriger le liquide, de l'entrée à la sortie de la cellule, tout en forçant le remplissage complet de celle-ci. Nous pouvons voir un exemple rapporté par Vulto et al. sur la Figure 2.31A, où l'on distingue clairement la différence d'écoulement entre une structure sans guide (a – b) et une structure avec guide (c – f)²²². Les guides de phase agissent comme une barrière de pression capillaire perpendiculaire à l'avancement du liquide²²². Ils forcent le liquide à stopper brièvement sa progression au niveau du guide grâce à l'apparition d'un ménisque à l'interface air-liquide. La longueur du ménisque dépend des tensions de surface des matériaux en contact (Figure 2.31B). Une fois le compartiment totalement rempli, le liquide peut continuer sa progression en surmontant la pression imposée par le guide.

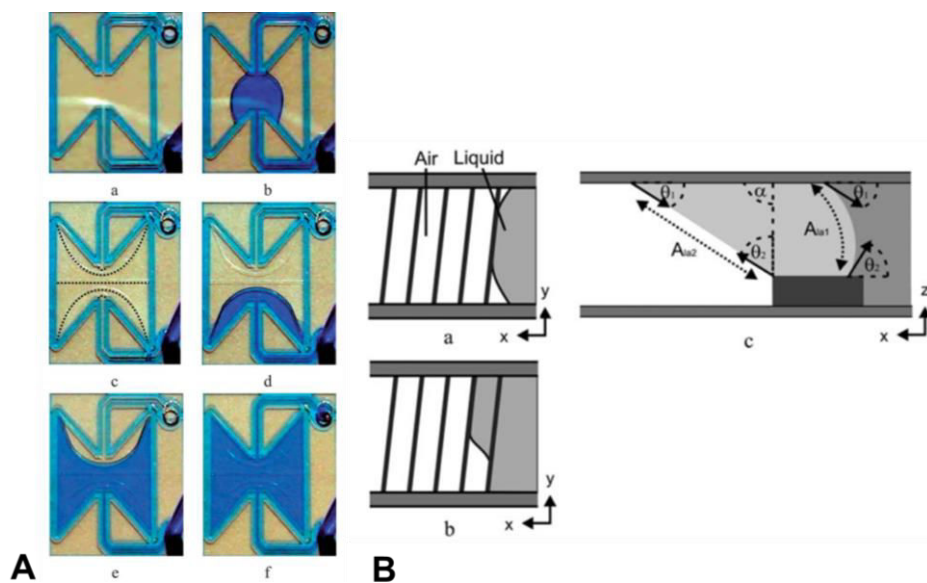


Figure 2.31: (A) Images du remplissage d'une cellule fluïdique, réalisée sur verre, sans (a-b) ou avec guides de phase (c-f)²²². (B) Schémas représentant le mécanisme de remplissage d'une cellule comprenant des guides de phase²²².

Nous pouvons décomposer la réalisation de la cellule en quatre grandes parties : (1) l'usinage d'ouvertures sur un substrat de verre, (2) le dépôt du film sec pour la cellule et les guides de phase, (3) le dépôt d'une surcouche de film sec pour la cellule uniquement et (4) le scellement de la cellule avec le transducteur (Figure 2.32).

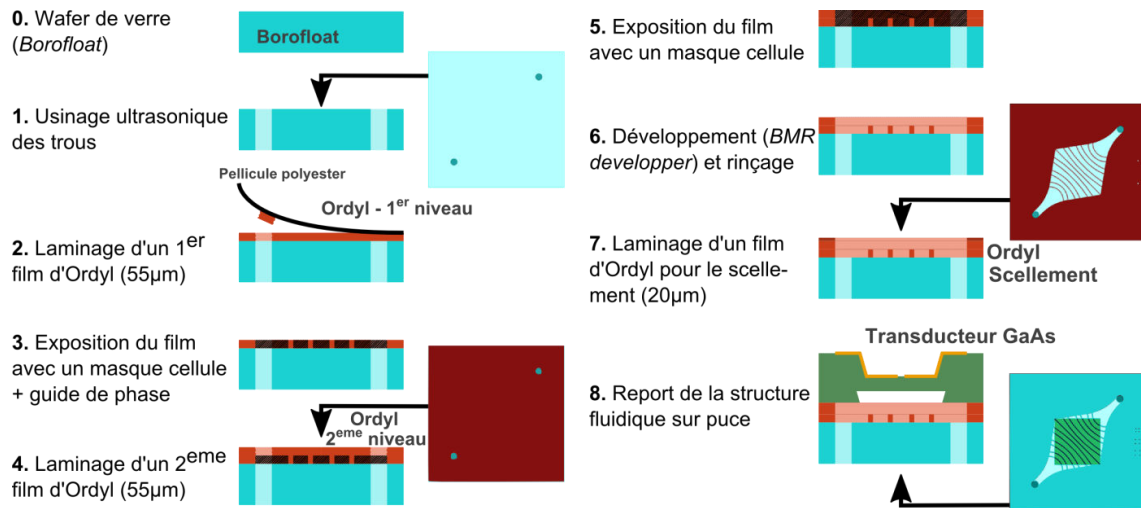


Figure 2.32: Diagramme du processus de fabrication de la cellule fluide par laminage de film sec (Ordyl SY300).

Usinage des ouvertures sur verre par ultrasons :

Les deux ouvertures sur le verre sont réalisées par usinage ultrasonore ($f = 20 \text{ kHz}$). Cette technique consiste à projeter des microparticules abrasives sur la zone d'un substrat à usiner grâce à une sonotrode vibrant à des fréquences ultrasonores. Les microparticules sont transportées sur la zone de travail à l'aide d'un fluide porteur et ce dernier permet également d'évacuer les résidus d'usinage en dehors de la cavité usinée (Figure 2.33a).

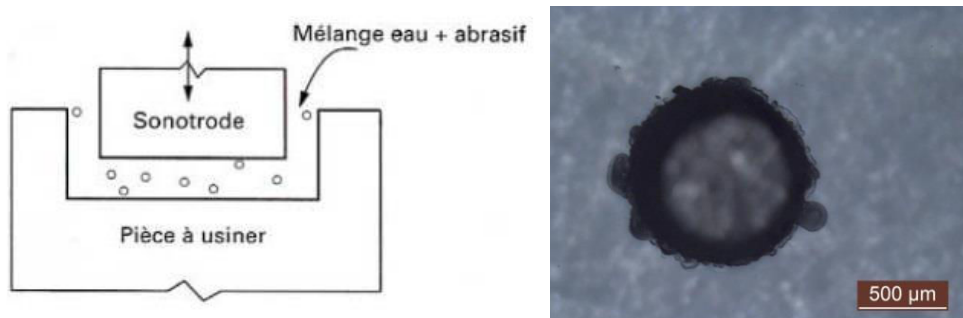


Figure 2.33: (a) Schéma de principe de l'usinage ultrasonore et (b) image au microscope d'un trou débouchant réalisé par usinage ultrasonore sur un substrat de verre Borofloat (500µm d'épaisseur) pour réaliser une ouverture fluide.

L'emploi de cette méthode sur des matériaux durs, cassants ou fragiles est particulièrement intéressant par rapport à d'autres techniques d'usinage. Nous avons réalisé dans un wafer de verre 3'' par usinage successif une série de 42 ouvertures (2 ouvertures par cellule) positionnées selon celles du masque fluide. Le diamètre externe de ces ouvertures est d'environ 1037.5µm (Figure 2.33b).

Laminage du film sec d'Ordyl et photolithographie :

L'Ordyl est une résine acrylique qui contient des esters avec des groupes epoxy. Ce sont les groupes epoxy qui se lient avec le verre ou le silicium donnant une excellente stabilité mécanique au film²²⁰. Nous disposons de deux épaisseurs de films : 20 et 55 μm . Nous utilisons le film épais de 55 μm pour la réalisation de la cellule fluide et celui de 20 μm pour le scellement de la cellule avec le dispositif. Chaque film est protégé d'un côté par une pellicule de polyester et de l'autre par une pellicule de polyéthylène. Cette dernière est d'abord retirée avant que le film soit déposé. Le film est appliqué sur un substrat de verre (*Borofloat*) puis est déposé par laminage dans le système *Rohm-Haas* qui permet de laminier le film à pression, vitesse et température déterminées. Après quelques tests sur les paramètres de laminage, nous avons sélectionné les données suivantes : pression de 1bar, vitesse de 0.5m/min et une température de 100°C. Le film est laminé immédiatement après son dépôt sur le substrat pour éviter la formation de bulles. Un temps d'attente de 20min est nécessaire avant l'étape d'exposition. La pellicule est retirée sèchement du film afin de ne pas laisser de stries sur la surface du film. L'avantage de ce type de film, est que la résine surplombant les cavités du substrat se détache du film déposé en même temps que la pellicule de polyester (Figure 2.32 étape 2). La couche de résine est ensuite exposée dans une aligneuse avec le masque des cellules et avec une énergie de 285mJ/cm² suivie d'un recuit post-exposition (ou PEB, pour « post-exposition bake ») à 85°C pour une durée de 5min. La résine est par la suite développée avec une solution de *BMR developer* (également vendue par *Elga Europe* et contenant un mélange de xylène, d'acétate de butoxyéthyle, et d'éthylbenzène²²³) pendant environ 30min à 1h sous agitation. Enfin les substrats sont rincés avec une solution de *BMR rinser* (*Elga Europe*) qui est en réalité une solution plus diluée du développeur et permet de retirer les résidus de résine restants. Avant de réunir les deux parties, le wafer de verre est découpé à la scie (de la même façon que le GaAs) pour séparer chaque échantillon. Lors du scellement, nous répétons l'étape de laminage mais cette fois-ci avec un film sec de 20 μm et sur un seul échantillon. Après laminage, la cellule fluide est placée sur une plaque chauffante à 80°C pendant quelques minutes. Lorsque la cellule est à température, il suffit de déposer le dispositif en GaAs sur celle-ci pour joindre les deux parties.

Nous avons rencontré des problèmes lorsque le film est déposé sur un substrat transparent comme le verre. Nous observons une couche résiduelle non-développée de résine en fond de motif (Figure 2.34b) expliquée par une exposition de cette zone provoquée par les réflexions optiques dans le verre. En effet, nous ne rencontrons aucune difficulté lorsque le

procédé est réalisé sur un substrat de silicium (Figure 2.34a). Plusieurs stratégies ont été mises en place pour éviter ces problèmes sur verre et les résultats sont présentés dans le Tableau 2.5.

Stratégies	Procédés	Observations
Développement à l'acétone	<ul style="list-style-type: none"> • Laminage et exposition du film sec • Développement à l'acétone pendant 4min avec sonication • Rinçage à l'eau DI 	On observe beaucoup de résidus de résine dans les zones développées. Les contours des motifs ne sont pas nets (Figure 2.34c).
Dépôt d'une couche d'aluminium sur la face arrière	<ul style="list-style-type: none"> • Dépôt d'une couche d'Al sur la face arrière du verre • Laminage du film sec et exposition • Développement avec la solution de <i>BMR developer</i> • Rinçage avec la solution de <i>BMR rinse</i> 	On observe de la résine dans les zones développées (Figure 2.34d). La profondeur entre la partie exposée et non-exposée est de 52 μ m pour une épaisseur de film de 58 μ m.
Dépôt d'une couche patternée d'aluminium sur la face avant	<ul style="list-style-type: none"> • Dépôt d'une couche d'Al • Photolithographie avec le masque des cellules fluidiques • Gravure de l'aluminium (l'Al reste sur les zones où la résine du film sera retirée) • Décapage de la résine • Laminage du film sec • Alignement du masque avec les précédents motifs et exposition • Développement avec la solution de <i>BMR developer</i> • Rinçage avec la solution de <i>BMR rinse</i> 	La résine semble s'être aussi bien développée que sur silicium. En revanche on peut observer de légères traces d'aluminium sur les bords des motifs (Figure 2.34e-f).

Tableau 2.5: Résultats de fabrication de cellules fluidiques selon la stratégie utilisée : (1) développement à l'acétone, (2) dépôt d'une couche d'Al en face arrière ou (3) en face avant.

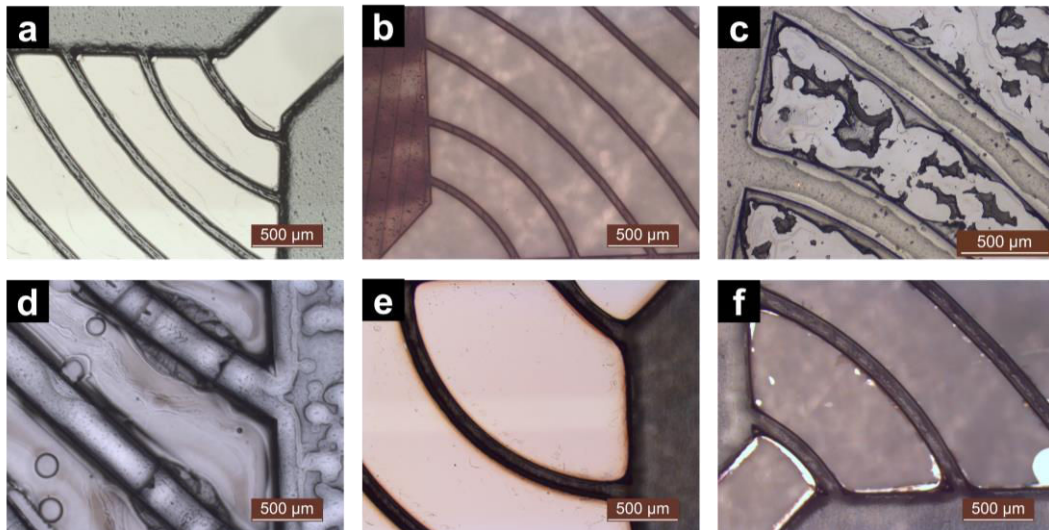


Figure 2.34: Images au microscope de films secs (a) sur silicium ou (b-c) sur verre seul ou sur verre avec une couche de d'aluminium (d) sur la face supérieure ou (e-f) sur la face inférieure respectivement avant et après gravure de l'aluminium. L'échantillon (c) a été développé à l'acétone tandis que les autres l'ont été avec la solution BMR.

La meilleure stratégie est d'utiliser une couche métallique sur le wafer de verre avant le laminage du film. Cela permet d'éviter les réflexions à l'intérieur du substrat de verre lors de l'exposition. Cette couche doit être préalablement structurée en utilisant le même masque (c'est-à-dire le masque des cellules fluidiques) laissant la couche métallique uniquement sous les zones où le film va être par la suite développé (Figure 2.34e). Par ce fait, nous pouvons retirer entièrement la couche métallique et obtenir un film bien développé sur substrat de verre (Figure 2.34f). Les nouvelles étapes de fabrication sont ajoutées dans le procédé représenté sur la Figure 2.35. Le détail des étapes de microfabrication de la cellule fluidique par l'utilisation de films secs est indiqué dans l'annexe E.

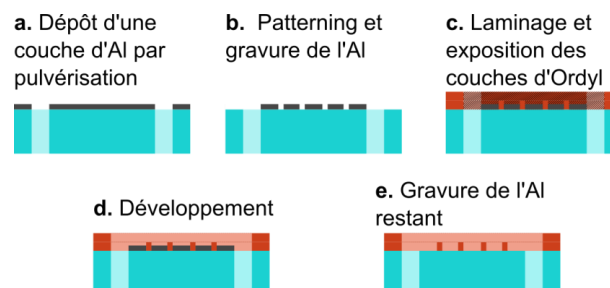


Figure 2.35: Modification apportée sur le schéma du procédé de fabrication de la cellule fluidique sur verre.

2.6 Conclusion

A travers ce chapitre, nous avons tout d'abord énoncé les bases de la physique des ondes élastiques de volume dans un solide piézoélectrique. Nous avons détaillé plus particulièrement les principes théoriques des transducteurs à ondes de cisaillement d'épaisseur. Après un préambule sur les modèles analytiques, un modèle numérique a été construit pour simuler le résonateur en fonctionnement normal. Les résultats obtenus via ces modélisations, nous permettent d'anticiper les impacts thermiques, électriques et mécaniques du milieu environnant sur l'efficacité du capteur.

Dans une seconde partie, nous avons proposé une solution permettant de confiner l'énergie acoustique au sein d'une membrane résonante. Puis nous avons élaboré plusieurs stratégies de microfabrication du transducteur et de la cellule fluidique. Deux approches différentes ont été étudiées pour la réalisation des membranes. La première porte sur l'usinage par gravure humide et la seconde sur l'usinage par gravure plasma. Les techniques d'usinage chimique ont été développées dans de précédents travaux sur de petits échantillons¹⁹⁷, nous avons apporté quelques améliorations dans le protocole pour l'adapter à la gravure de wafer entier. La gravure humide présente l'avantage d'être une technique peu coûteuse et permet d'obtenir une planéité et des propriétés de surface des membranes acceptables. Elle requiert, en revanche, un contrôle précis de l'alignement et de la géométrie des motifs dû à l'anisotropie de la gravure. Cependant, pour de longues gravures, nous observons des hétérogénéités dans l'épaisseur des membranes. Ce dernier point représente un frein dans l'utilisation de cette technique pour concevoir des membranes fines. La technique d'usinage plasma a été étudiée en tant qu'alternative à la technique de gravure humide. Nous avons rapporté pour différents masques l'efficacité et la sélectivité de la gravure afin d'atteindre des profondeurs élevées ($>200\mu\text{m}$). Nous avons également montré l'impact de différents paramètres de gravure sur la qualité et la sélectivité de cette dernière. Enfin, une cellule fluidique a été élaborée selon deux approches différentes. Nous avons tout d'abord choisi d'intégrer la cellule au sein du dispositif en gravant simultanément à la membrane inférieure, les canaux fluidiques. De par la fragilité des dispositifs et l'apparition de modes parasites lors des tests de ceux-ci, nous avons renoncé à poursuivre cette stratégie. Nous avons proposé en fin de chapitre de réaliser des structures fluidiques *ex situ* puis de les reporter sur le dispositif. L'utilisation pour cette étape de films secs s'est révélée intéressante par sa plus grande facilité de fabrication et son coût relativement faible. De plus, cette technique permet de sceller directement la cellule microfluidique. Ces

structures, une fois durcies par un recuit de longue durée, deviennent permanentes et sont dotées de propriétés intéressantes telles que leur biocompatibilité et leur résistance chimique et mécanique.

Les caractérisations électriques et les tests du transducteur seront présentés dans le chapitre 5.

CHAPITRE 3 Fonctionnalisation chimique et biochimique de l'interface de GaAs : caractérisations et optimisations

3.1 Introduction

La détection d'entités biologiques, autrement appelées analytes, passe par l'immobilisation de leur(s) ligand(s) spécifique(s) sur la surface d'Arséniure de Gallium. Comme indiqué dans le chapitre 1, la stratégie employée pour la capture des entités biologiques repose sur une reconnaissance immunologique. Cette reconnaissance nécessite une immobilisation par adsorption ou greffage covalent d'anticorps sur la surface du matériau. Rappelons-le, la méthode d'immobilisation combinée avec le type de biorécepteur forme ce que l'on appelle la biointerface du capteur. Elle va conditionner directement les performances des capteurs, notamment sur les trois paramètres essentiels et caractéristiques du capteur : la sensibilité, la spécificité et la stabilité (les « 3S »). En effet, la sensibilité peut être améliorée en choisissant une architecture permettant d'augmenter la densité d'analytes détectables par le capteur. La spécificité du capteur, quant à elle, est uniquement liée aux caractéristiques de la biointerface. Par la présence d'un nombre important d'éléments autres que l'antigène cible (biologiques ou non-biologiques) dans la plupart des solutions à doser, il est essentiel que l'interface reste sélective face aux éventuelles interactions parasites. Pour cela, il est nécessaire de limiter toutes les interactions non-spécifiques avec la surface du matériau et d'avoir une forte affinité entre les récepteurs immunologiques et les antigènes. La stabilité est en partie garantie par le choix d'une architecture de biointerface robuste visant à éviter toute désorption ou dé-greffage des ligands immobilisés.

Parmi les stratégies d'immobilisation possibles pour les anticorps, l'approche par liaison covalente a été sélectionnée pour garantir une immobilisation stable des récepteurs. De plus, de nombreuses chimies de fonctionnalisation particulièrement étudiées dans la littérature sur substrats métalliques sont utilisables sur GaAs, consolidant ce choix. La détermination d'une architecture d'immobilisation est critique pour l'optimisation des

interactions spécifiques avec le milieu à analyser. Elle peut jouer sur l'orientation⁸⁸, la densité et l'accessibilité des récepteurs immunologiques.

Les techniques de caractérisation de l'interface chimique et biochimique sur Arséniure de Gallium ne sont pas forcément les mêmes que celles utilisées sur substrats métalliques. Par exemple, les caractérisations en microscopie à effet tunnel ne seront pas possibles pour les semi-conducteurs dû à leur faible conductivité¹⁰⁴. Dans ce chapitre, nous étudierons les interfaces chimiques et biochimiques réalisées sur GaAs à travers essentiellement leur caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). En plus de l'identification chimique de composés, des informations sur la conformation moléculaire et sur l'environnement physique du matériau peuvent également être obtenues par cette approche.

Une importante partie des résultats présentés dans ce chapitre et portant sur les monocouches mixtes et la densification des SAMs, font l'objet d'une publication soumise à la revue Langmuir.

3.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

3.2.1 Principe de fonctionnement

Le FTIR est un appareil permettant la mesure des spectres d'absorption ou de réflexion sur un échantillon solide, liquide ou gazeux. La théorie vibrationnelle permettant la compréhension de son fonctionnement est détaillée dans l'annexe F. La principale pièce d'un spectromètre FTIR est l'interféromètre dont le montage le plus basique est celui de Michelson (Figure 3.1). Un faisceau infrarouge, émis par une source infrarouge large bande (Global, filament de Tungstène...), est collimaté avant d'être dirigé vers une lame séparatrice (BSIR). Le faisceau transmis voyage jusqu'à un miroir fixe (M_4) à travers une distance L pour être réfléchi à nouveau sur la lame séparatrice après un chemin optique de $2*L$. Le faisceau réfléchi voyage jusqu'à un miroir M_3 mobile qui peut se déplacer sur une distance x . Le chemin optique est, cette fois-ci, équivalent à $2*(L+x)$. Ces deux faisceaux se recombinaient sur la lame séparatrice avec une différence de chemin optique de $2x$. Les faisceaux partiels étant cohérents, ils vont ainsi interférer lors de leur recombinaison. Après l'interféromètre de Michelson, le faisceau est dirigé à travers le compartiment de mesure dans lequel l'échantillon sera analysé par transmission ou par réflexion.

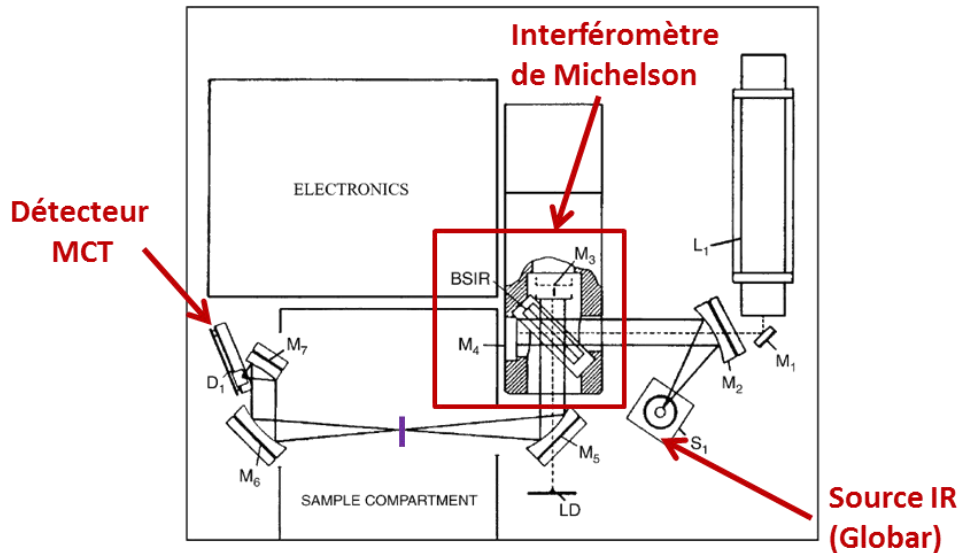


Figure 3.1: Montage simplifié d'un FTIR²²⁴

Le faisceau infrarouge est ensuite mesuré après focalisation sur un détecteur. Il existe deux principaux types de détecteur : les détecteurs thermiques (Sulfate de triglycine,...) qui mesurent la puissance optique indépendamment de la longueur d'onde des photons ; et les détecteurs quantiques, ou photoniques (Tellure de mercure-cadmium, Arséniure d'indium...), qui convertissent les photons en porteurs de charges et mesurent un signal fortement dépendant de la longueur d'onde. Ces derniers seront plus sensibles, ils auront un temps de réponse plus élevé mais une gamme de mesures dans l'infrarouge plus limitée. De plus, ils doivent en général être refroidis à très basse température (par exemple à l'azote liquide ou à l'hélium liquide) à cause du bruit thermique. Malgré ces inconvénients, les détecteurs quantiques seront privilégiés dans ces travaux pour leur sensibilité de mesure.

La mesure de l'intensité lumineuse en fonction du déplacement du miroir, $I(x)$, donne l'interférogramme défini par l'équation suivante²²⁶ :

$$I(x) = I_m(\nu) * \cos(2\pi * \nu * x) \quad (3.1)$$

Où ν est le nombre d'ondes en cm^{-1} et $I_m(\nu)$ est l'intensité monochromatique de la raie située au nombre d'onde ν . La plupart des FTIR intègrent un laser HeNe en parallèle de la source afin de mesurer efficacement la différence de chemin optique x à l'aide de l'équation précédente. La résolution des spectres en nombre est inversement proportionnelle au déplacement du miroir x . Par la suite, les données mesurées par le

détecteur puis converties numériquement sont traitées afin d'obtenir les spectres d'absorbance ou de transmittance de l'échantillon mesuré. L'interférogramme est converti en spectre par transformée de fourier²²⁶ :

$$S(k \cdot \Delta\nu) = \sum_{n=0}^{N-1} I(n \Delta x) \cdot e^{\frac{i2\pi nk}{N}} \quad (3.2)$$

N étant le nombre de points discrets dont est constitué l'interférogramme, et où les variables continues x et ν ont été remplacées par leur valeur discrète, respectivement : $n \cdot \Delta x$ et $k \cdot \Delta \nu$.

Avant toutes mesures par FTIR, il est nécessaire de saisir l'importance des paramètres utilisés pour la configuration de l'appareil. On peut les classer en trois catégories : les paramètres d'acquisition, les paramètres mathématiques liés à la transformée de Fourier, et les paramètres de l'instrument (ou configuration des éléments optiques). Dans l'annexe G, est indiquée, une liste non-exhaustive des paramètres, de leur description et des valeurs utilisées pour la mesure des spectres infrarouges de ce chapitre.

3.2.2 Techniques de mesures

La technique de mesure par transmission est la plus couramment utilisée. Il s'agit seulement de mesurer les absorptions énergétiques de la radiation après qu'elle ait traversé le milieu à analyser. L'absorbance mesurée est équivalente à

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (3.3)$$

où I_0 et I sont respectivement l'intensité mesurée sur l'échantillon de référence et l'intensité mesurée sur l'échantillon de travail. Elle peut s'appliquer à différentes formes d'échantillon (gaz, solide, liquide), cependant il est souvent nécessaire d'employer des porte-échantillons ou des cellules adaptés pour les analyses de liquides et d'échantillons solides. Ces supports sont souvent constitués de fenêtres transparentes ou partiellement transparentes à l'infrarouge (KBr, SnSe, CaF₂, BaF₂, Ge ou même GaAs). La transmission est une méthode tout à fait appropriée pour l'analyse quantitative mais qui peut aussi

fournir des informations qualitatives selon le type d'échantillon ou selon la méthodologie de mesure.

La réflexion spéculaire (ou IRRAS), est une technique où le signal est mesuré après réflexion sur l'élément ou l'échantillon à analyser (élément poli). L'appareil peut ensuite évaluer la réflectance par le rapport entre le signal de l'échantillon à analyser I et celui de référence I_0 . Le traitement du signal mesuré fait appel aux lois de Kramers-Kronig permettant de retrouver un spectre équivalent à celui qu'on obtiendrait par absorbance. Il est nécessaire pour la mesure en réflexion spéculaire que l'échantillon soit le plus réfléchissant possible dans le spectre infrarouge.

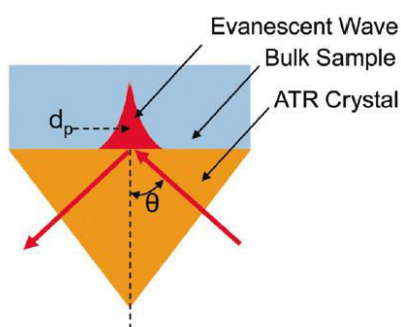


Figure 3.2: Représentation graphique d'une réflexion simple en ATR²²⁷

Le concept de la spectroscopie à réflexion totale atténuée (ou ATR) est basé sur la propagation d'une radiation à travers un milieu optiquement dense, d'indice de réflexion n_1 (par exemple, un cristal de germanium ou de diamant), et qui se réfléchit à l'interface d'un autre milieu de densité optique plus faible (avec $n_2 < n_1$). A cette interface est générée une onde dite « évanescente » qui se propage à travers le second milieu constituant l'élément à analyser (Figure 3.2). L'énergie du faisceau réfléchi est partiellement atténuée, l'intensité absorbée est donc mesurée par le détecteur optique. Cette technique est particulièrement appréciée pour l'analyse, le plus souvent qualitative, de composés chimiques quelle que soit leur forme (liquide, film, poudre, solide...) car elle nécessite peu de préparation de l'échantillon. Elle convient pour des analyses de couches minces ou couches moléculaires mais son principal inconvénient réside dans l'inter-contamination entre échantillons car le cristal doit être en contact avec la surface analysée. Dans ce cas, la technique requiert une importante rigueur dans le nettoyage du cristal avant chaque utilisation (nettoyage par traitement Piranha ou par plasma oxygène)²²⁸.

D'autres techniques telles que la spectroscopie à réflexion/absorption par modulation de polarisation (ou PM-IRRAS) peuvent être utilisées pour l'analyse de couches minces²²⁹⁻²³¹ mais ne seront pas présentées dans ces travaux. La PM-IRRAS est une technique permettant de privilégier les absorptions polarisées de surface par distinction des absorptions isotropes de l'environnement de l'échantillon²²⁹.

3.3 Caractérisation infrarouge de SAM ou biointerface sur GaAs

3.3.1 Techniques employées et post-processing

La plupart des caractérisations FTIR effectuées dans ces travaux ont été réalisées sur l'appareil Vertex 70v de *Bruker Optics* doté d'un interféromètre à alignement permanent *RockSolid*[®], d'une source large bande Globar couvrant une plage de 6000cm⁻¹ à 10cm⁻¹. Le signal infrarouge est collecté avec un détecteur MCT (Tellurure de mercure-cadmium) refroidi à l'azote liquide. Différents diamètres d'ouverture ont été utilisés dans une gamme allant de 0.5mm à 8mm, choisis selon le type d'échantillon mesuré ou le type d'analyse. L'appareil offre la possibilité d'effectuer des mesures dans le vide permettant de réduire les absorptions du CO₂ et H₂O atmosphériques. La résolution a été fixée à 4cm⁻¹ pour l'ensemble des mesures effectuées avec le FTIR, mais la précision de mesure (uniquement dépendante de l'instrument lui-même) est de 0.01cm⁻¹. A chaque nouvelle série de mesures, le spectre de référence est mesuré sur un échantillon « blanc » de GaAs, fraîchement désoxydé à l'ammoniaque concentrée (28%), pendant 2 minutes. La mesure de référence est répétée environ toutes les demi-heures lors d'une série ou à chaque modification d'un paramètre.

En ce qui concerne la question : quelle technique de mesure choisir pour la meilleure caractérisation sur substrat de GaAs, plusieurs tests ont été effectués avec les techniques disponibles (PM-IRRAS et ATR à Besançon, et IRRAS, transmission et ATR à Sherbrooke). On peut toutefois prédire que la méthode par transmission sera la meilleure pour le GaAs semi-isolant utilisé dans la plupart des expériences suivantes car il est plus transparent que réfléchissant dans l'infrarouge. Sa transmittance est d'environ 56% sur la gamme 1µm - 12µm (Figure 3.3). De plus l'alignement de petits échantillons solides est plus aisé pour les mesures par transmission qu'en réflexion.

A l'inverse pour les échantillons semi-conducteurs dopés, il est préférable d'utiliser les méthodes de mesure par réflexion dû à leur haut coefficient d'extinction optique²³². L'ATR peut également être utilisé pour les mesures de SAM ou de biointerface sur GaAs, mais comme précisé précédemment, la principale limitation est la contamination croisée avec le cristal de germanium ou de diamant.

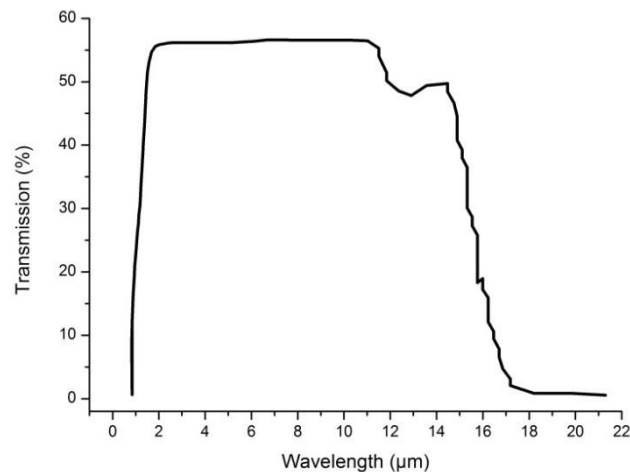


Figure 3.3: Spectre de transmission du GaAs sur la gamme 1-22µm (adapté de *II-VI Infrared*²³³)

Certaines des mesures présentées dans ces travaux ont également été effectuées par microscopie FTIR à l'aide de l'*Hyperion 2000*. Ce microscope est couplé avec le Vertex 70v, utilisant par conséquent la même source IR (Figure 3.4) et le même interféromètre *RockSolid*[®]. La microscopie FTIR offre la possibilité de réaliser des mesures à différentes positions sur l'échantillon, le diamètre du faisceau au niveau de l'échantillon étant de 166µm maximum. Il est également possible avec le microscope de réaliser une cartographie IR de l'échantillon analysé dont la seule limite à la résolution spatiale est la limite de diffraction (proche de λ). Le premier inconvénient de cet appareil est que les mesures sont réalisées dans une atmosphère purgée au N₂ qui présente plus de contamination atmosphérique que pour celles dans le vide. Le second inconvénient est la diminution du rapport signal sur bruit par la réduction de la surface à analyser et donc de l'intensité du signal.

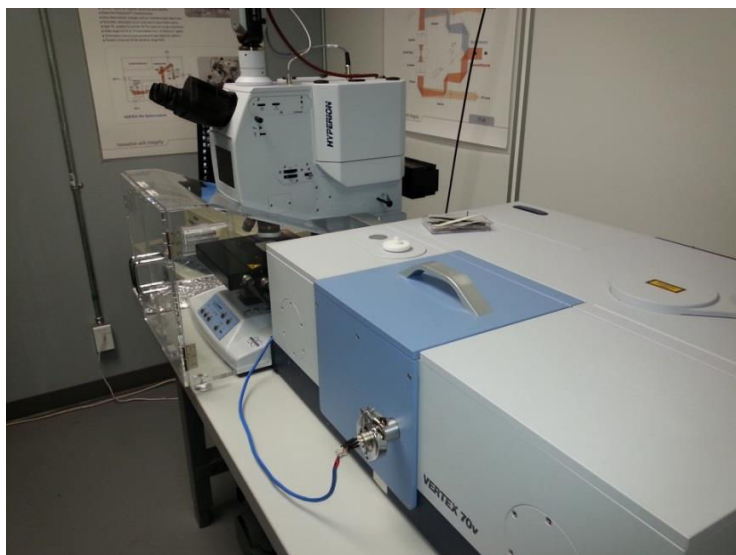


Figure 3.4: Spectromètre FTIR *Vertex 70v* et microscope FTIR *Hyperion 2000* (*Bruker Optics*)

Le délai entre le moment où le compartiment de mesure est pompé et le début de la mesure, est également une donnée importante. La stabilisation du compartiment a été évaluée par la mesure d'un même échantillon avec des intervalles de 2min (Figure 3.5). Nous pouvons observer l'apparition de pics négatifs correspondant à la diminution des éléments atmosphériques, CO_2 et H_2O , par rapport à l'échantillon de référence (GaAs fraîchement désoxydé) et en fonction du temps de pompage. La stabilisation semble être atteinte après une dizaine de minutes de pompage. Nous pouvons noter également, la modification de la ligne de base du spectre IR expliquée par la diminution du nombre de molécules présentes dans le réceptacle de mesure ce qui implique une diminution de l'absorbance du milieu traversé par le faisceau IR. À partir de ces résultats nous pouvons définir un délai de 10min après le début du pompage et avant d'effectuer la mesure (correspondant à un temps de stabilisation correct du compartiment).

Le logiciel *OPUS* de la compagnie *Bruker Optics* permettant la mesure et le contrôle de l'instrument FTIR, peut être utilisé dans le traitement et l'évaluation des spectres obtenus. En prenant soin de sélectionner des points en dehors des bandes d'absorption, la ligne de base des spectres est calculée avec des fonctions polynomiales et corrigée sur le spectre mesuré. Une fonction Gaussienne/Lorentzienne (60/40) ajustée sur chacun des pics de méthylène (comme décrit par Parikh et Allara²³⁴) est évaluée pour obtenir leurs valeurs d'intensité, de position, de largeur à mi-hauteur et d'intégrale. En ce qui concerne les bandes amides, seule l'intégrale des bandes est mesurée. Les autres pics seront évalués par

des fonctions combinées : Gaussienne/Lorentzienne dont les paramètres seront calculés par un algorithme de Levenberg-Marquardt.

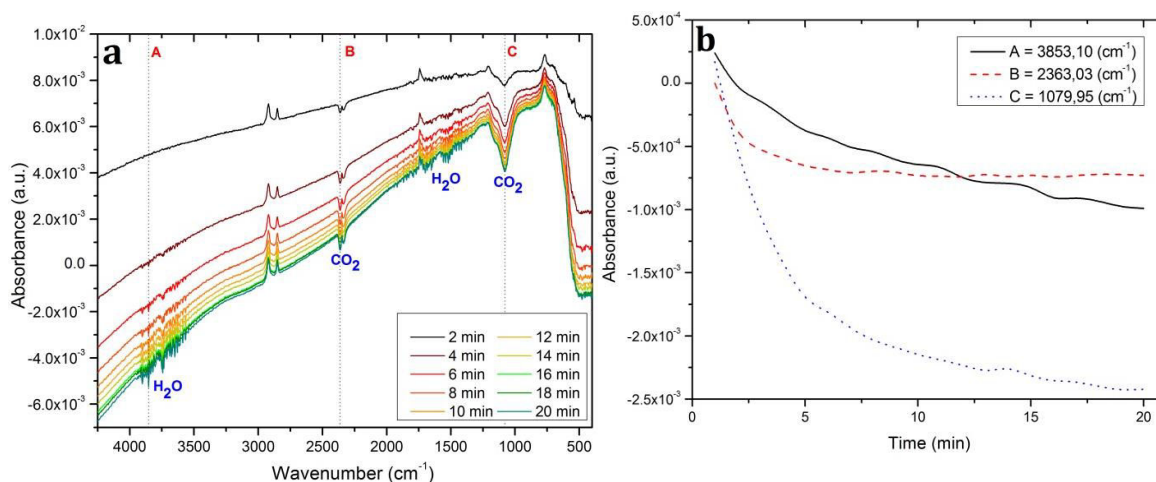


Figure 3.5: (a) Spectres infrarouges d'un même échantillon après 2 à 20 min de pompage du compartiment de mesure et (b) évolution de l'absorbance de pics correspondants aux éléments atmosphériques CO₂ et H₂O (positions A, B et C du graphe (a)) en fonction du temps de pompage

3.3.2 Montages expérimentaux et méthodologie de mesure

La technique de mesure par transmission est couramment utilisée pour l'analyse IR de composés, poudres ou liquides, mélangés à du bromure de potassium (KBr) puis pressés en pastille. Le KBr est utilisé comme fenêtre de transmission dans la gamme spectrale de mesure (près de 90% en transmission). Dans notre cas, nous utilisons déjà le GaAs comme support de transmission, il s'agira simplement d'analyser la monocouche ou la biointerface formée sur le matériau en positionnant l'échantillon à la distance focale du faisceau infrarouge. De façon à économiser l'utilisation du matériau de GaAs et à faciliter la production de nombreuses séries de mesures, les wafers seront découpés en petits échantillons de 4x4mm² (ou 2x2mm²) avec une scie DAD320 (Disco). La mesure de petits échantillons nécessite toutefois un positionnement précis de ceux-ci de façon à ce que le faisceau soit centré sur eux.

Nous avons donc réalisé un support permettant simultanément le maintien et l'alignement de l'échantillon à mesurer avec le faisceau IR (Figure 3.6). Le système inclut une table de déplacement Y-Z avec graduations ainsi qu'un positionnement selon X (en dévissant et glissant le support manuellement). Un dispositif de serrage permet l'analyse d'échantillons de dimensions variables (de quelques mm à ~3cm). Une plaque en aluminium permet

d'ajuster l'ouverture de mesure à 2mm ou 4mm en diamètre. Il est également possible d'y analyser plusieurs échantillons en simultanément (Figure 3.7a et b) de façon à cumuler l'intensité d'absorption des vibrations moléculaires de la biointerface. Cependant cette utilisation est limitée par l'apparition d'importantes franges d'interférences dues aux réflexions entre les différents échantillons.

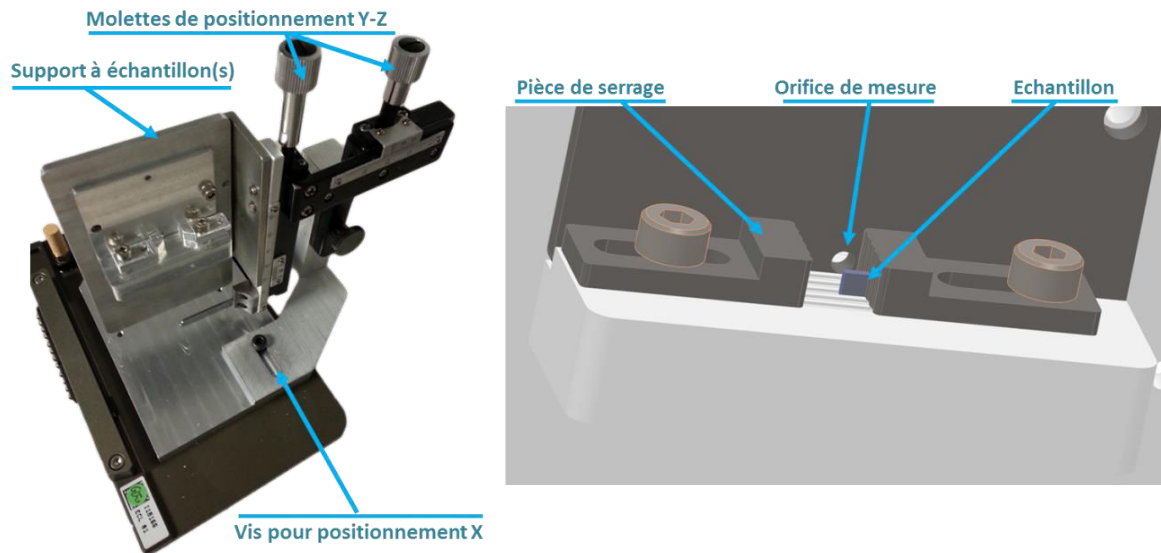


Figure 3.6: Support à échantillon(s) multi-dimension avec tables d'alignement pour analyse FTIR

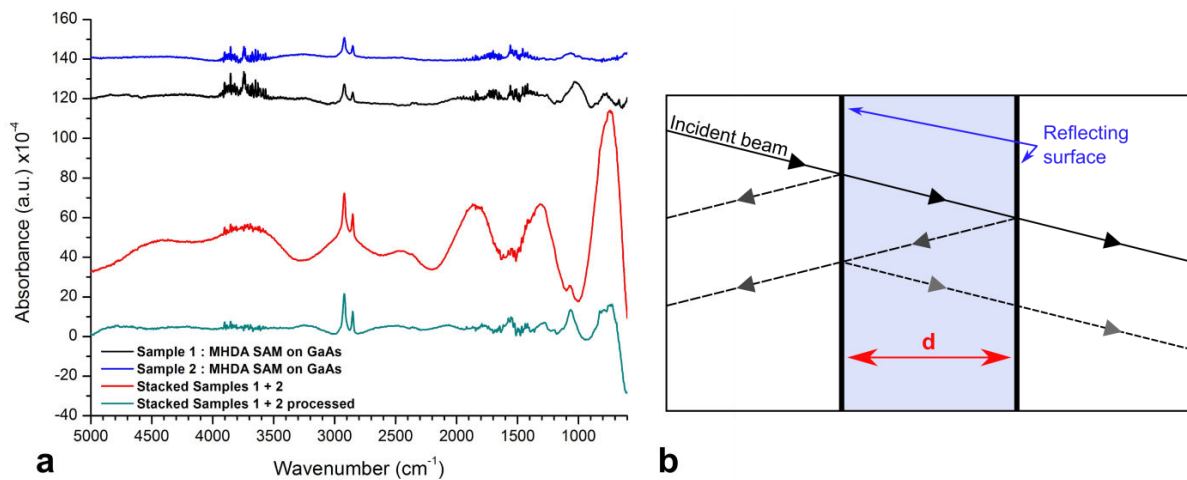


Figure 3.7: (a) Spectres infrarouges d'échantillons de GaAs avec SAM de MHDA mesurés simultanément et (b) transmission/reflexion du faisceau IR entre deux surfaces réfléchissantes

La distance entre les deux surfaces réfléchissantes entre lesquelles les interférences se produisent est équivalente à :

$$d = \frac{m}{2n * (v_1 - v_2)} \quad (3.4)$$

où n est l'indice de réfraction du matériau entre les deux surfaces qui provoquent les franges d'interférences, m est le nombre de franges comprises entre les nombres d'ondes v_1 et v_2 ²²⁴. Il est possible de supprimer les interférences du spectre en supprimant le ou les pic(s) correspondant dans l'interférogramme. Cependant en supprimant ces fréquences, on procède à une modification de l'information mesurée particulièrement dans les régions où les franges avaient la plus forte amplitude. Une autre possibilité consiste à incliner les échantillons à un angle proche de l'angle caractéristique de Brewster. Cette dernière possibilité est difficile à mettre en place manuellement sans contrôle précis de l'angle des échantillons. La caractérisation de plusieurs échantillons en parallèle est possible et permet d'amplifier la signature IR des éléments formés sur le GaAs. Cependant, cela reste une opération délicate dans le processus de traitement des franges d'interférences et cette technique ne sera pas appliquée pour les prochains travaux. Nous pouvons rajouter que, dans la mesure d'un échantillon unique, des interférences de période plus courte peuvent apparaître. De par le caractère semi-transparent du matériau, ces interférences sont produites par la réflexion du faisceau IR entre les deux faces de l'échantillon.

Avec les précédentes techniques, les échantillons de référence et de travail sont mesurés successivement après une remise à l'air puis un re-pompage du compartiment (jusqu'à une pression comprise entre 0.1mbar et 1mbar). Nous avons pu observer que de faibles variations de l'environnement pouvaient se produire après ces opérations. Un second montage a été conçu, l'ASC (« Automated Sample Changer »), cette fois-ci pour y mesurer successivement un certain nombre d'échantillons sans remise à l'air. Il s'agit d'une roue motorisée avec deux fois douze positions pour des échantillons de 4x4mm² et de 2x2mm². L'alignement, avec le premier orifice de la roue, est toujours effectué par la table de déplacement manuelle du précédent montage.

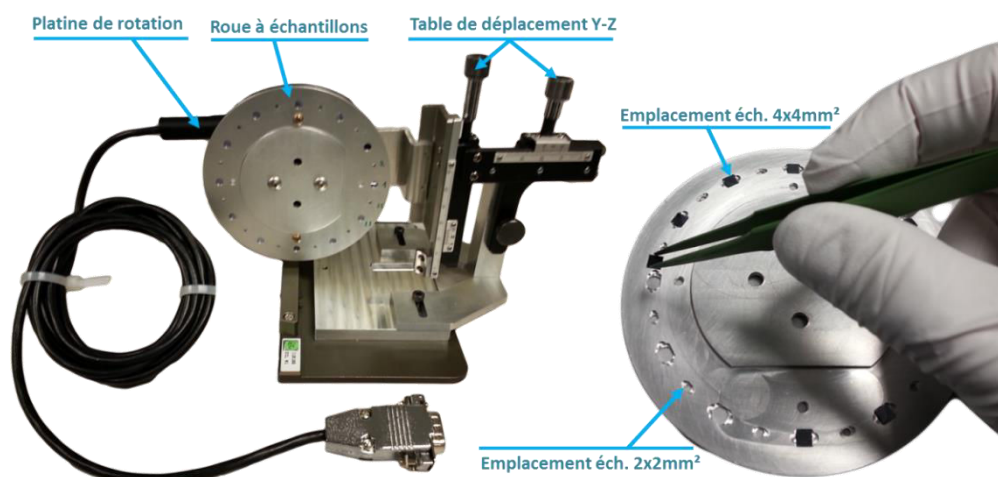


Figure 3.8: Système ASC permettant la mesure en série de plusieurs échantillons au FTIR

Le contrôle de la roue motorisée et la mesure des échantillons sont réalisés à distance par un exécutable programmé en Visual Basic créé spécifiquement pour ce système (Figure 3.9). Le programme permet non seulement un contrôle manuel de la table de rotation et de l'acquisition du FTIR (référence et échantillon) mais propose également un mode automatique. Il est possible dans ce dernier mode de réaliser une séquence de mesures en sélectionnant chaque échantillon à analyser et un échantillon considéré comme celui de référence. Trois choix sont possibles pour le calcul du spectre d'absorbance :

- Utilisation du spectre d'un échantillon de référence mesuré préalablement,
- Ou le spectre de référence est mesuré une seule fois avant la série,
- Ou le spectre de référence est mesuré avant chaque échantillon.

Enfin, la durée d'attente entre la fin du mouvement de la roue et le début de la nouvelle mesure peut être spécifiée. L'utilisation de ce montage va permettre une caractérisation beaucoup plus précise et rapide des échantillons de GaAs. En effet, pour chaque série de mesures, nous pourrions placer jusqu'à 11 échantillons de même taille (excluant la référence) sur le porte échantillon puis effectuer la mesure après avoir pompé le compartiment pendant plusieurs dizaines d'heures. Un long pompage va permettre de proscrire toutes les vibrations induites par les molécules présentes dans l'atmosphère et de pouvoir mesurer correctement la région spectrale de 2000 à 1300 cm^{-1} (incluant les vibrations : C=O en étirement, CH₂ en balancement, OH en torsion, bandes amides...).

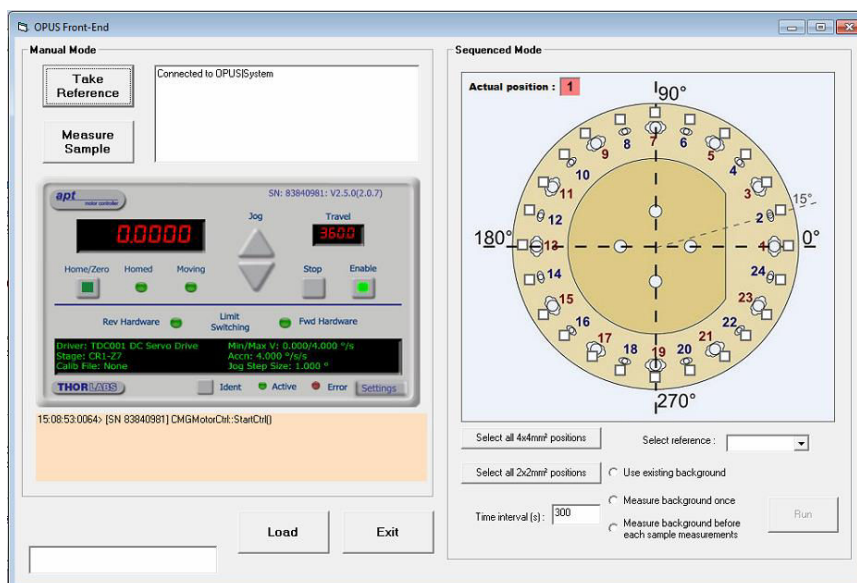


Figure 3.9: Application de contrôle de l'ASC

Si une analyse précise des bandes amides est nécessaire, l'utilisation de l'ASC est indispensable pour éviter les absorptions atmosphériques résiduelles. À titre d'exemple, la Figure 3.10 montre une SAM de MHDA formée sur GaAs sur laquelle des anticorps ont été immobilisés. L'échantillon est d'abord mesuré avec le support classique puis avec l'ASC après une journée de pompage. On peut observer une nette différence en termes de pics résiduels, le second spectre permet une quantification plus précise de la couverture d'anticorps sur l'échantillon.

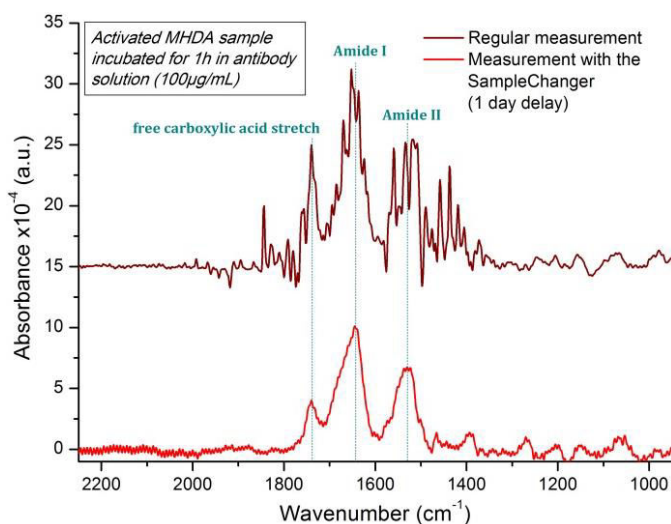


Figure 3.10: Spectres FTIR mesurés avec et sans l'ASC

3.4 Préparation de SAM sur GaAs

3.4.1 Protocole de formation de SAM

Avant tout traitement, les échantillons de GaAs sont découpés à partir de wafer d'orientation cristalline (100), coupe cristallographique utilisée dans l'ensemble de ces travaux. La découpe est opérée soit par scie pour les wafers d'épaisseur $>600\mu\text{m}$, soit par clivage selon la direction $\langle 110 \rangle$ pour les plus fins. La dimension des échantillons est d'environ $4 \times 4 \text{mm}^2$. Un support multi-échantillons en Téflon (Figure 3.11a) est utilisé jusqu'à l'étape de thiolation (formation de SAMs) permettant de traiter de la même façon chaque série d'échantillons (jusqu'à 24 en simultanés).

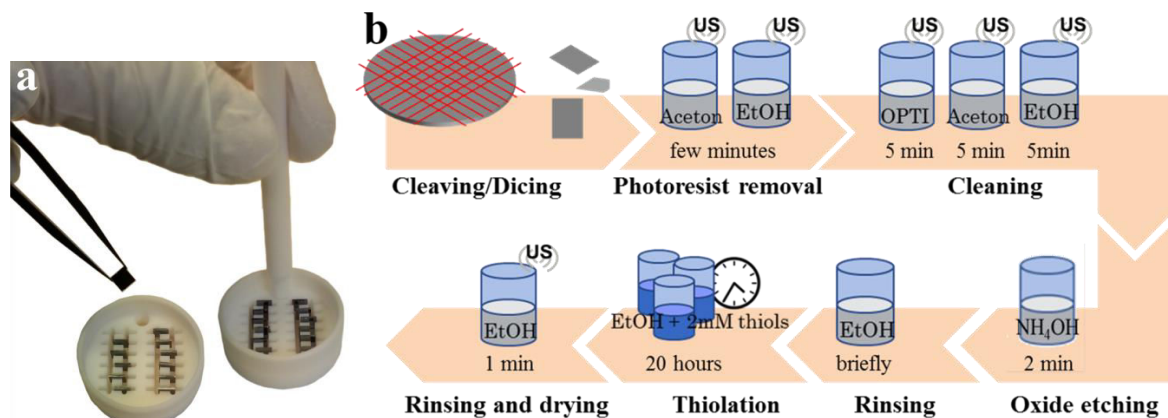


Figure 3.11: (a) Support multi-échantillons en Téflon et (b) Protocole standard de fonctionnalisation de substrats GaAs(100)

Dans un premier temps, les échantillons sont immergés successivement dans l'acétone puis dans l'éthanol pendant quelques minutes et sous ultrasons (puissance maximale) pour dissoudre ou retirer l'adhésif ou la couche de résine utilisée lors de la découpe. Un second nettoyage est réalisé cette fois-ci, en les immergeant successivement dans un détergent (Opticlear®), puis dans l'acétone et enfin dans l'éthanol pendant 5min dans chaque bain et avec ultrasons.

Le GaAs présente une forte réactivité aux atomes d'oxygène, il se forme donc naturellement une couche d'oxyde à l'air libre. Le GaAs est par conséquent désoxydé par immersion dans une solution en présence d'un acide, d'une base ou d'un réducteur avant la réalisation de la procédure d'auto-assemblage. Jun et al. comparent dans leurs travaux plusieurs solutions permettant la désoxydation du GaAs²³⁵, HCl concentré, NH_4OH concentré et un mélange des deux 1:20 $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ avec 1:10 HCl:ethanol²³⁶. A travers

leurs mesures XPS, ils montrent que l'ammoniaque va permettre une décontamination plus efficace de la surface¹¹⁵ mais une gravure d'oxyde moins performante qu'une solution de HCl concentrée. Par conséquent, on pourrait imaginer que la solution combinée donnerait le meilleur résultat en termes de désoxydation et décontamination. Toutefois, des mesures de SAM ont été effectuées par FTIR et n'ont pas montré de différences significatives entre les SAMs formées après chacune des trois désoxydations. Nous utiliserons dans nos travaux essentiellement l'ammoniaque employé historiquement dans les travaux précédents du groupe²³⁷, les échantillons y seront immergés pour une durée de 2min à température ambiante. Cette étape de désoxydation est primordiale avant la chimisorption des thiols sur le GaAs, car les groupes sulfures se lient directement aux atomes de Ga et de As^{112,113,119}.

Après la désoxydation du GaAs, les échantillons sont brièvement rincés à l'éthanol (dégazé) puis immergés dans une solution d'alkanethiols pour leur fonctionnalisation. Les alkanethiols sont solubilisés dans un solvant (éthanol anhydre, la plupart du temps) dégazé pendant 3h par flux de N₂. Ce processus permet de minimiser la présence d'oxygène dans les solutions de thiols et d'éviter la formation d'oxyde avant et durant l'étape de fonctionnalisation. Cette étape permet également de favoriser la reproductibilité du procédé. Une fois dégazé, l'éthanol est utilisé immédiatement pour la préparation des solutions d'alkanethiols. Dans la plupart des expériences, la durée d'immersion est de 20h, à température ambiante et à l'abri de la lumière pour éviter la photo-oxydation du substrat^{150,237,238}. Nous utiliserons essentiellement des concentrations de thiols de 2mM, ce qui est d'après la littérature plus que suffisant^{92,93}. Pour les architectures mixtes chaque échantillon est identifié par son ratio entre les deux molécules utilisées, leur concentration totale reste toujours 2mM. Pour les études de cinétique d'absorption, les échantillons ne sont pas immergés pendant une durée fixe (20h) mais dans une gamme de durée comprise entre 5min et 72h.

Après la thiolation, chaque échantillon est rincé soigneusement à la pipette avec de l'éthanol anhydre suivi par un second nettoyage dans un bain à ultrasons également avec de l'éthanol anhydre pour une durée d'une minute. Ceci permet d'enlever autant que possible les thiols seulement physisorbés sur la surface et d'obtenir une très bonne reproductibilité entre deux échantillons avec la même SAM.

Finalement, les échantillons sont séchés sous flux d'azote et immédiatement stockés individuellement dans des tubes *Eppendorf*[®] avant chaque caractérisation (Figure 3.11b).

3.4.2 Tension de surface des SAMs

La validation de la fonctionnalisation du GaAs peut être obtenue rapidement à travers les mesures des tensions de surface. Elles ont été effectuées en statique avec un goniomètre Rame-Hart NRL modèle 100, à température et humidité ambiantes. Une goutte de 20 μL d'eau déionisée est déposée sur la surface de l'échantillon à l'aide d'une micro-seringue, l'image est capturée environ 10s après. Deux mesures sont effectuées sur trois exemplaires d'échantillon pour chaque type de SAM. Les mesures d'angle sont réalisées à l'aide du module *DropSnake*²³⁹ sur le logiciel *ImageJ*[®]. Pour chaque mesure, l'angle de contact statique est calculé à droite et à gauche de la goutte avec une erreur typique de $\pm 3^\circ$, l'ensemble des résultats est ensuite moyenné par type de SAM. Cette technique permet d'évaluer la différence de mouillabilité de la surface étudiée. Cette différence provient du changement de groupement fonctionnel chimique en surface ($-\text{CH}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}\dots$) ou plus modestement de l'inclinaison des chaînes carbonées composant la SAM²²⁸ et des défauts d'organisation. L'angle de contact statique (θ) d'une goutte liquide déposée sur un substrat solide (Figure 3.12) est exprimé selon les tensions superficielles des interfaces solide/gaz, liquide/gaz et solide/liquide d'après la loi de Young-Dupré (solide considéré comme parfait).

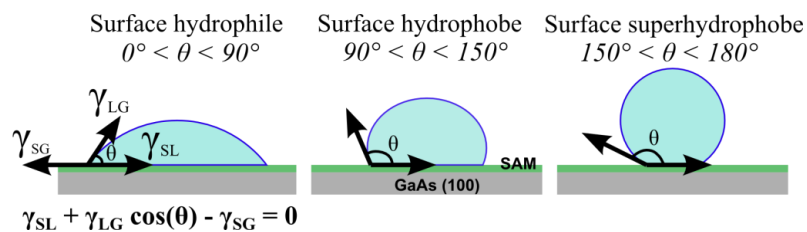


Figure 3.12: Angles de contact statique avec différentes mouillabilités: hydrophile, hydrophobe et superhydrophobe

Sur la Figure 3.13, sont indiqués les angles de contact moyens obtenus lors des mesures sur les surfaces « fraîchement » désoxydées, de MUDO, de MHDA et de DDT sur GaAs. L'angle de contact mesuré sur GaAs désoxydé est à 48.3° ce qui est proche de la valeur de 57° rapportée par Ye et al.²⁴⁰. Les différences d'angle de contact mesurées sur GaAs peuvent être dues à la ré-oxydation du substrat avant mesures ou aux différences d'état de surface entre les différents wafers de GaAs. Les valeurs mesurées pour le GaAs modifié par une SAM de MUDO, MHDA ou DDT sont respectivement d'environ 70° , 66.9° et 106.1° . Pour le MHDA, la valeur obtenue est très proche de ce qui est donné dans la

littérature : Huang et al. donnent $65^{\circ 90}$ et Cho et al. donnent $68^{\circ 102}$. Pour les deux autres SAMs, des différences d'une vingtaine de degrés sur les valeurs mesurées sont reportées dans la littérature avec 50° pour le MUDO¹⁰² et 76° pour le DDT²⁴⁰. La dernière valeur semble toutefois étonnante car les groupements CH_3 sont apolaire et à titre d'exemple, les SAMs de 1-octadecanethiol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SH}$, ou ODT) sur GaAs ont des valeurs d'angle de contact plus proches de $100^{\circ 102}$. Les mesures d'angle de contact statique restent toutefois difficilement reproductibles d'un appareil à un autre donc peu comparables avec celles réalisées par d'autres auteurs. Par contre, nous pouvons valider la fonctionnalisation des échantillons par rapport au caractère hydrophile ou hydrophobe que les surfaces devraient avoir. Pour la caractérisation de couches mixtes, il est peu probable d'obtenir des résultats interprétables lors d'un mélange entre deux composés formant des SAMs avec des tensions de surface relativement proches. Par exemple, il sera difficile d'étudier le comportement de SAMs mixtes MHDA/MUDO. En revanche, la seconde architecture mixte constituée de MHDA/DDT peut être caractérisée car les SAMs individuelles ont une différence de tension de surface de l'ordre de 40° .

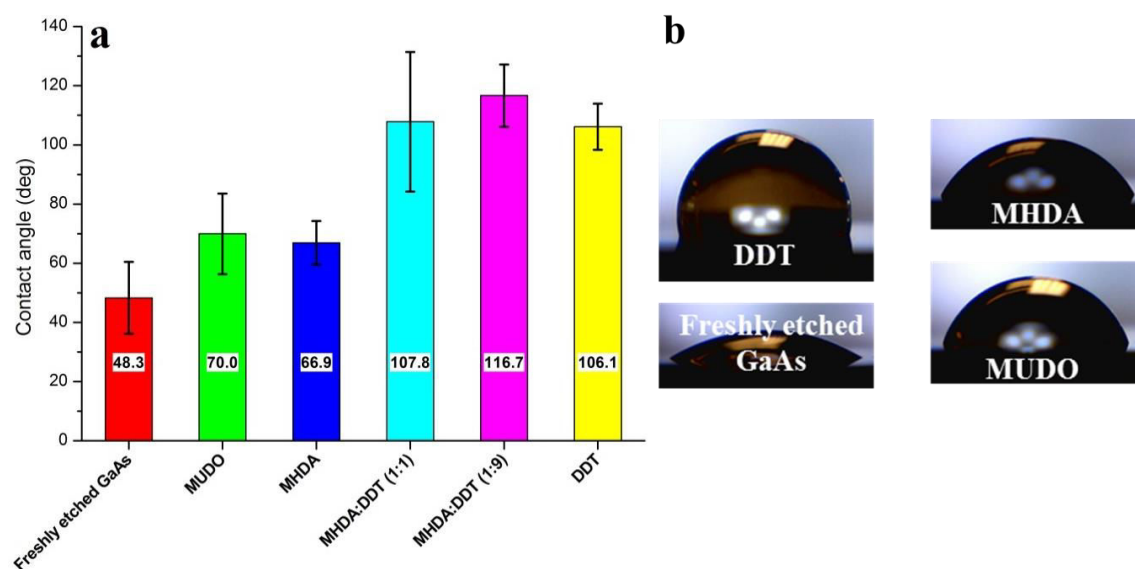


Figure 3.13: (a) Angles de contact mesurés sur GaAs désoxydé ou après fonctionnalisation par SAM de MUDO, MHDA, MHDA/DDT (1:1), MHDA/DDT (1:9) et DDT et (b) quelques exemples de goutte

Nous pouvons voir que pour les mélanges MHDA/DDT à 10 et 50% de MHDA, l'angle de contact est relativement élevé, voire même plus élevé que pour les monocouches de DDT pures (Figure 3.13). On en déduit une forte domination des molécules de DDT lors de l'auto-assemblage, pouvant être expliquée par leur cinétique d'adsorption plus rapide

compte tenu de leur taille. D'autre part, les chaînes alkyl étant très hydrophobes, les défauts d'organisation de la couche peuvent avoir un impact certain sur les tensions de surface et augmenter leurs angles de contact. Or dans les cas d'une SAM mixte composée de molécules à terminaison hydrophobe (-CH₃) et hydrophile (-COOH), la SAM peut présenter des hétérogénéités structurales voire des défauts de cristallinité¹²⁹.

3.5 Spectres IR de référence

Dans le but d'identifier les signatures spécifiques des thiols utilisés pour la fonctionnalisation, les composés sous forme de poudre ont été analysés individuellement par FTIR en mode ATR (1^{er} spectre des Figure 3.14, Figure 3.15 et Figure 3.16). Ces données vont permettre de déterminer avec précision les positions et intensités relatives des vibrations de toutes les liaisons constituant ces molécules. Les positions de ces pics seront comparées avec celles des spectres des thiols en phase cristalline (2^{ème} spectre des Figure 3.14, Figure 3.15 et Figure 3.16) et absorbés sur substrat de GaAs (sous forme de SAM). La position des pics des composés sous forme de SAMs et en poudre ainsi que leurs valeurs comparatives dans la littérature sont indiquées dans le tableau de l'annexe H.

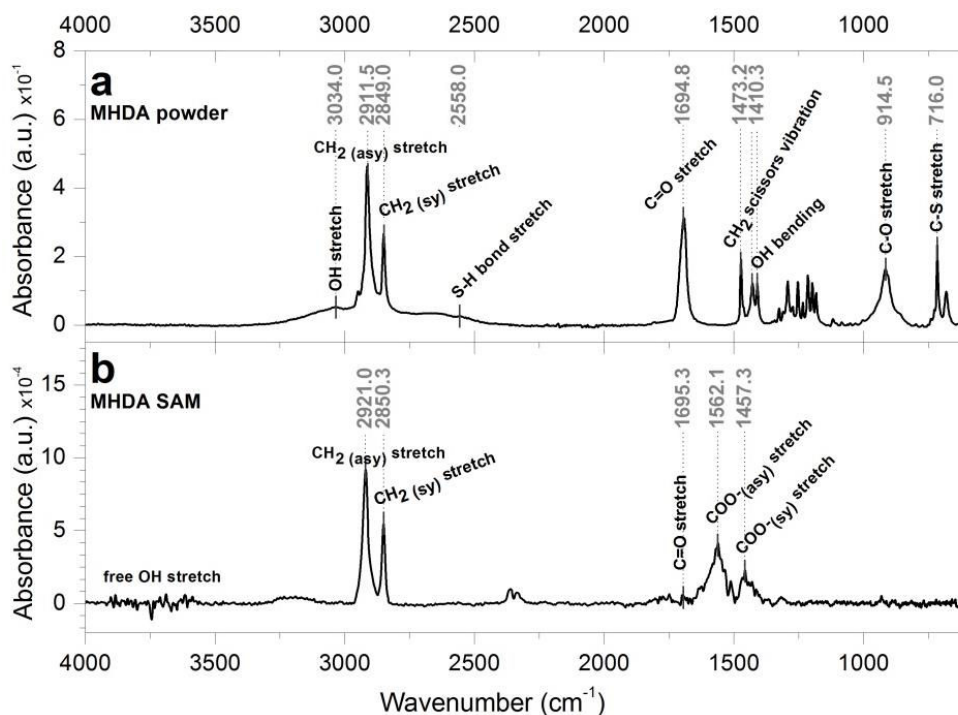


Figure 3.14: Spectre infrarouge complet du composé MHDA sous forme (a) de poudre et (b) de SAM sur GaAs

Nous pouvons assigner les pics situés à 2911.5 et 2849 cm^{-1} pour le MHDA, 2914.9 et 2849 cm^{-1} pour le MUDO et 2924 et 2854.2 cm^{-1} pour la PEG-Biotin aux vibrations respectivement asymétriques et symétriques des groupements méthylène composants la chaîne alkyle. Sous forme de SAM, ces pics sont légèrement décalés de quelques nombres d'ondes, 2921 et 2850.3 cm^{-1} pour le MHDA, 2924.4 et 2852.2 pour le MUDO et 2930.1 et 2854.3 pour la PEG-Biotin. Dans le cas des SAM, la position des bandes CH_2 peut être utilisée pour obtenir des informations sur le degré de cristallinité²⁴¹. Plus les positions des modes νCH_2 se décalent vers les faibles nombres d'ondes, plus l'énergie de vibration diminue et meilleure est la cristallinité. Nous pouvons remarquer un décalage un peu plus important des modes νCH_2 pour le MUDO indiquant une cristallinité plus pauvre. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle, les molécules de plus petite longueur de chaîne provoquent un faible arrangement moléculaire et un assemblage moins dense de la monocouche, causé par la diminution des interactions moléculaires^{106,237}. En raison de la petite longueur de chaîne entre le groupe sulfure en tête et le groupe fonctionnel ainsi que de la présence d'un plus grand nombre de défauts dans la monocouche, le substrat s'oxyde plus facilement. En effet, les alkanethiols à chaîne courte vont présenter une passivation amoindrie de la surface de GaAs et moins stable dans le temps²⁴². La formation d'oxydes est confirmée par la présence de pics de vibration $\nu\text{As-O}$ à 800.6 cm^{-1} observés dans le spectre de MUDO cristallin^{243,244}.

Le spectre de MHDA sous forme de SAM montre également le décalage des vibrations $\nu\text{C=O}$ en étirement (« stretch ») vers les fréquences plus faibles, de 1694.8 cm^{-1} (analyse des poudres) vers 1562.1 – 1457.3 cm^{-1} (phase SAM). Cette déviation révèle l'ionisation des acides carboxyliques, et les deux pics mesurés correspondent respectivement aux étirements asymétriques et symétriques des vibrations νCOO^- . L'acide carboxylique du MHDA se déprotone en environnement neutre avec un pH supérieur à la valeur de pKa reportée dans la littérature de 6.85 des SAM de MHDA sur or²⁴⁵. Toutefois un petit pic apparaît à 1695.27 cm^{-1} correspondant à une faible quantité de thiols qui ne se sont pas ionisés^{241,246}. Methivier et al. revendiquent que les molécules absorbées d'acide 11-mercaptoundecanoïque (MUDA) sur or ont leur fonction acide déprotonée lorsqu'elles sont immergées dans l'éthanol²⁴⁷. Cependant, il est possible d'immerger les échantillons de SAM de MHDA sur GaAs dans de l'eau ou plus efficacement dans une solution d'acide acétique dilué pour reprotoner les groupes d'acide carboxylique²⁴¹. Pour les spectres de SAM, les modes de torsion des groupes OH sont masqués par les vibrations des molécules de vapeur d'eau résiduelle présentes dans le compartiment de mesure (même sous vide

primaire). Les vibrations correspondantes aux groupes C-OH et C-O et C-S ne sont pas visibles dans les spectres de SAM. La présence d'une faible quantité de ces liaisons sur la surface combinée avec une faible intensité de vibration font que ces vibrations sont sous le seuil de détection ou cachées par des absorptions résiduelles de l'eau ou du dioxyde de carbone. Dans le but de caractériser la formation d'architecture mixte de MHDA et MUDO, le suivi des proportions des vibrations $\nu\text{C}=\text{O}$ des molécules à terminaison $-\text{COOH}$ est donc complexe. Nous pouvons dans un premier temps considérer seulement la différence de longueur de chaîne pour ces deux composés. L'intensité des bandes νCH_2 donne une idée des proportions des mélanges MHDA/MUDO tandis que leurs positions montrent la conformité de l'arrangement des molécules. Les monocouches peuvent donc être décrites en fonction de l'absorbance et de la position de leurs pics de méthylènes.

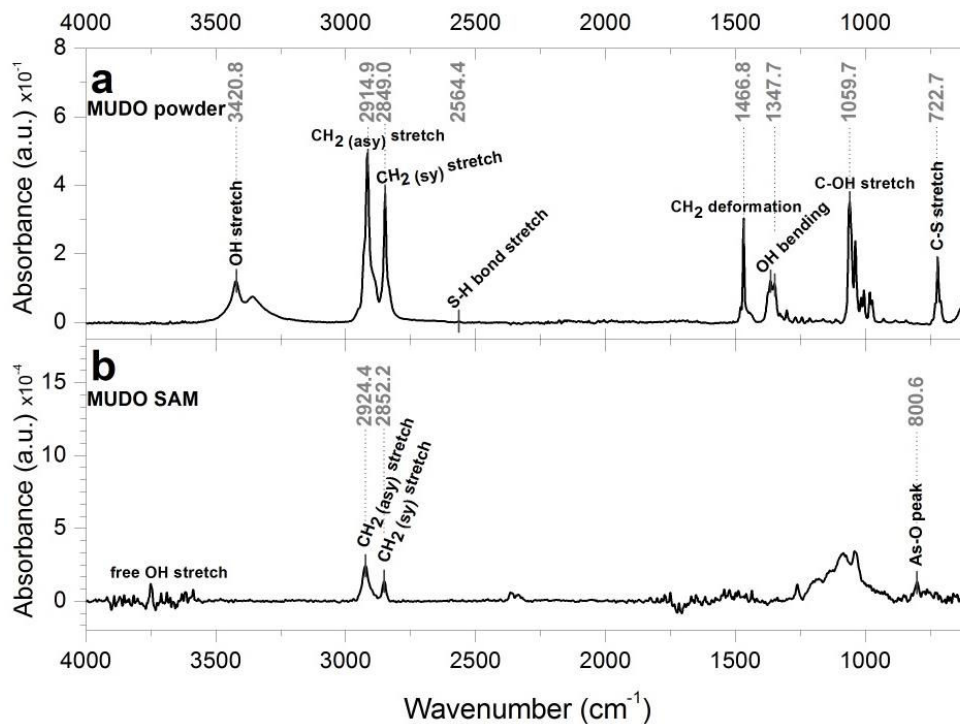


Figure 3.15: Spectre infrarouge complet du composé MUDO sous forme (a) de poudre et (b) de SAM sur GaAs

Concernant le spectre du composé PEG-Biotin mesuré par ATR, nous pouvons déduire les pics de méthylène correspondant à la chaîne alkyle (voir plus haut) et les pics correspondant au polyéthylène glycol avec notamment la vibration $\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}^{248}$ à 1152.2 cm^{-1} . La signature liée à la biotine est quant à elle, représentée essentiellement par des vibrations carbone-carbone, carboxyle (1712.9 cm^{-1}) et carboxylate (1560.6 cm^{-1})²⁴⁹. Pour

son spectre sous forme de SAM, les éléments correspondant à la signature sont beaucoup plus difficiles à observer, il est toutefois possible d'identifier les vibrations νCH_2 et $\nu\text{C-O-C}$ (1099.3 cm^{-1}) des molécules. Les pics sont difficilement observables, d'une part car les molécules sont plus diluées sur la surface (notamment à cause de l'encombrement un peu plus important des PEG-biotin comparativement aux MUDO ou MHDA) et d'autre part, parce qu'il y a une plus grande variété de vibrations des liaisons carbone (selon à quel groupement chimique ou quel atome est lié le carbone, l'énergie de vibration sera différente). Les pics correspondants sont plus larges et ont une intensité moindre pour cette molécule.

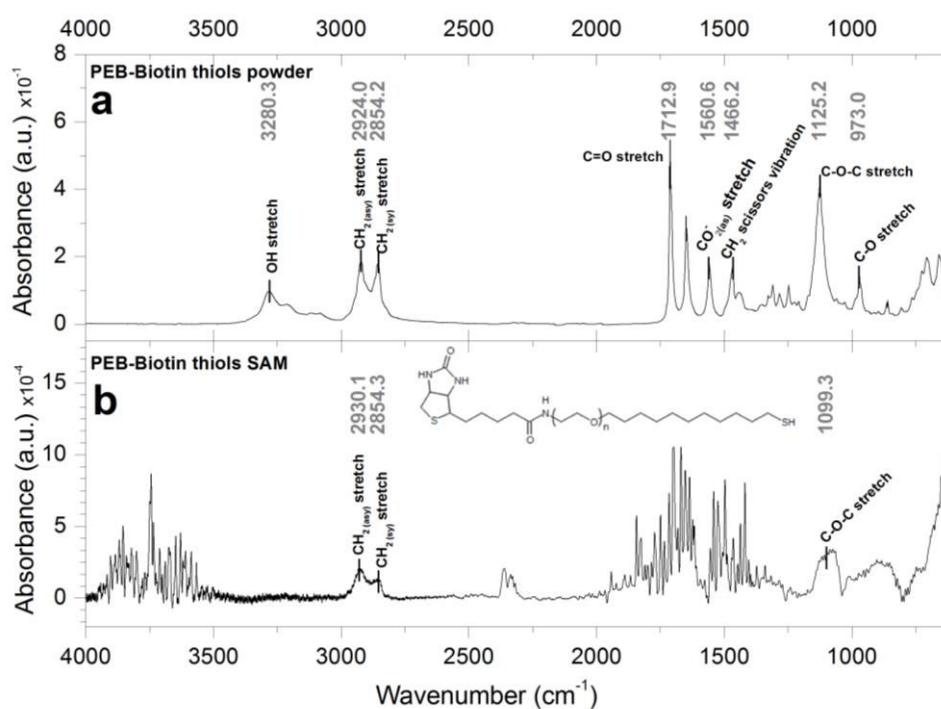


Figure 3.16: Spectre infrarouge complet des thiols PEG-biotine sous forme (a) de poudre et (b) de SAM sur GaAs

3.6 Formation et cinétique d'adsorption d'architectures mixtes de thiols sur GaAs

3.6.1 Adsorption mixte simultanée

- Architecture MHDA/MUDO

Dans cette partie, les SAMs sont formées à partir de solutions d'alkanethiols mixtes, c'est-à-dire que les composés de thiols sont mélangés dès le départ en solution. Comme mentionné dans la partie 1.6.3, l'architecture principale choisie dans ces travaux est celle

composée des molécules de MHDA/MUDO. Nous étudierons également et succinctement le mélange MHDA/DDT. Il convient d'étudier les SAMs obtenues avec différents ratios en solution des deux composés. La présence des espèces et leur organisation seront essentiellement données par interprétation des courbes en termes d'absorbances et de positions des vibrations asymétriques (en étirement) des méthylènes pour chaque monocouche (voir paragraphe 3.5) et par identification des vibrations carbonyles. L'absorbance du pic en fonction du ratio (où X est le pourcentage de MHDA dans le mélange) est tracée dans la Figure 3.17a, où l'on peut observer un comportement quasi-linéaire. Cette courbe peut être décomposée en deux phases linéaires avec un point d'inflexion à 50% de MHDA. Nous le verrons plus tard, cela peut être expliqué par des différences de cinétique d'adsorption entre les deux molécules. Lorsque le MHDA devient prédominant en solution ($x > 0.5$), l'intensité des méthylènes augmente plus rapidement. Cela montre que la proportion de MHDA par rapport au MUDO devient plus importante que leur proportion en solution. Marshall et al. a évalué la courbe d'absorption en fonction du nombre de carbones pour des alkanethiols à terminaison $-\text{CH}_3$ ²³⁷. Après normalisation par l'absorbance obtenue avec le MHDA dans nos résultats, la courbe a été superposée avec les résultats obtenus sur les mélanges. La courbe issue des résultats de Marshall et al. présente une pente inférieure à la pente globale de la courbe expérimentale obtenue dans nos travaux (entre le point à 100% de MUDO et le point à 100% de MHDA). Nous pouvons expliquer cette différence par la présence de deux groupes terminaux différents entre le MHDA et le MUDO. En effet, Ding et al. montrent que les inclinaisons de chaînes peuvent varier selon leur type de terminaisons²²⁸. Dans le cas de monocouche mixte, ces différences de groupe fonctionnel peuvent induire plus de défauts dans la formation de la SAM et donc engendrer une couverture moins importante que celle attendue. Parallèlement, l'augmentation de l'adsorption de MHDA assure la formation d'une couche plus dense. Donc plus la proportion de longues chaînes par rapport aux courtes chaînes devient importante, meilleures sont la cristallinité et la densité de la couche. La Figure 3.17b illustre la dépendance de la position du pic $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ en fonction du ratio X. Lorsque X tend vers 1, nous pouvons observer un décalage de νCH_2 vers les basses fréquences. Ce décalage est associé à une meilleure organisation des alkanethiols à chaîne longue (MHDA). Nous pouvons voir également que due à la relativement faible absorbance des molécules de MUDO, la procédure de traitement permet plus difficilement de retrouver avec précision la position du pic. Cela explique l'augmentation des barres d'erreurs pour les petits ratios observées dans cette figure.

Ces courbes de suivi des pics de carbone, nous donnent une première indication des caractéristiques de l'auto-assemblage des SAMs mixtes MHDA/MUDO. Les courbes suivent un comportement quasi-linéaire avec un point d'inflexion situé à 50% montrant un phénomène d'absorption prédominant lorsque ces molécules sont majoritaires en solution.

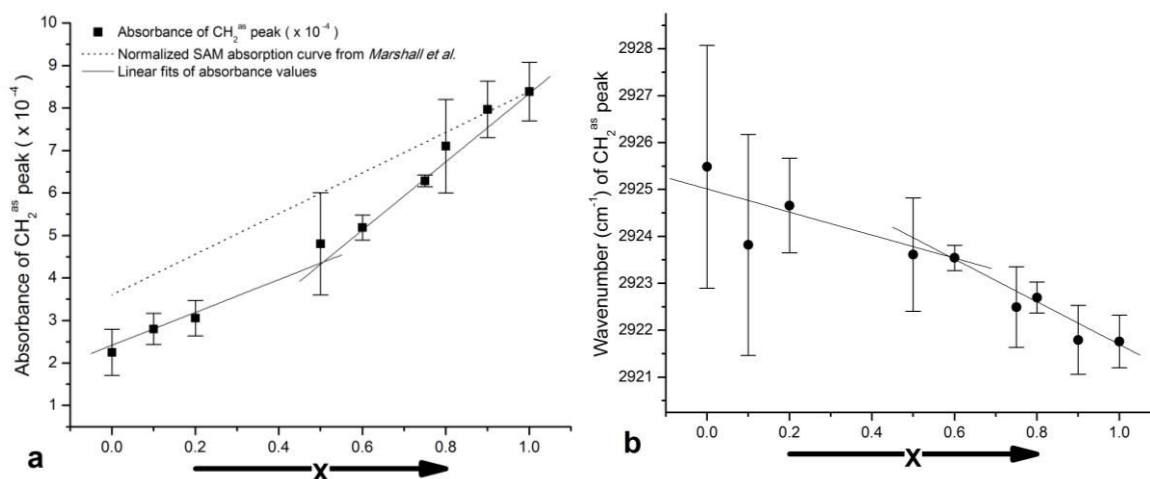


Figure 3.17: (a) Absorbance et (b) position des pics $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ des SAMs sur GaAs en fonction de la composition des solutions mixtes $(\text{MHDA})_x:(\text{MUDO})_{1-x}$ (trait plein). Les résultats expérimentaux en absorbance sont comparés aux données publiées par Marshall et al. (trait pointillé)²³⁷

Comme indiqué dans la partie 3.5, la caractérisation des mélanges MHDA/MUDO à travers le suivi des groupes carboxyles présents uniquement dans le MHDA reste compliquée à mettre en place. En effet, les groupements carboxyles après fonctionnalisation peuvent être ionisés, donc difficilement quantifiables. De plus, dans la région d'analyse se trouvent également les nombreux pics d'absorption des molécules d'eau résiduelles. Les techniques de spectroscopie IRRAS^{241,246}, PM-IRRAS^{247,250} ou à angle rasant²⁵¹ appliquées aux surfaces d'or ont des sensibilités de mesure de couches moléculaires relativement élevées. A la différence de ces techniques, nos mesures en transmission ne sont pas suffisamment sensibles pour la distinction d'un faible nombre de groupes fonctionnels en surface. Nous avons donc étudié la possibilité d'améliorer la signature propre de ce composé en réalisant une réaction avec son groupe terminal. N-hydroxysuccinimide (NHS) est l'agent de réticulation le plus connu pour lier les groupements amines aux carboxyles. Ce réactif est la plupart du temps utilisé en conjonction avec l'EDC pour obtenir un groupement acide intermédiaire extrêmement réactif. Les concentrations de ces réactifs utilisés dans l'étude sont de 100mM pour le NHS mélangé avec 400mM d'EDC et dissous dans de l'eau déionisée²⁵². Ils sont utilisés pour

l'immobilisation covalente des récepteurs biologiques (par exemple, des anticorps) pour des applications de capteurs. Dans cette étude, les réactifs sont utilisés pour obtenir une absorbance infrarouge accrue des vibrations C=O par l'ajout temporaire de l'ester NHS. Les échantillons sont dans le cas présent immergés pendant 30min dans la solution d'activation. Dans la Figure 3.18a, la bande apparaît à environ 1740cm^{-1} et est la convolution des pics d'absorbance pour les vibrations $\nu\text{C}=\text{O}$ du MHDA et de l'ester de NHS. Nous pouvons voir sur cette figure que la bande apparaît pour le MHDA et le mélange MHDA:MUDO (1:1) montrant la présence de l'ester dans les deux cas. Basé sur les résultats obtenus au début de cette partie et sur la mesure d'échantillons avec des SAMs constituées de 100% MUDO, 10%, 50% et 100% MHDA, nous obtenons les courbes reportées sur la Figure 3.18b. Le rapport entre les absorbances des vibrations $\nu\text{C}=\text{O}$ et $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ avec 10%, 50% et 100% de MHDA est respectivement égal à 83%, 74% et 51%. Cela montre que la proportion de carboxyles activés devient plus importante lorsque ceux-ci sont plus dilués dans la monocouche. De par l'encombrement stérique des molécules de NHS, la réaction avec les groupes carboxyles sature lorsque leur nombre devient trop important en surface. Il a été d'ailleurs rapporté, pour des SAM uniquement à terminaison $-\text{COOH}$, que la formation d'ester peut difficilement atteindre la totalité de la surface²⁵³.

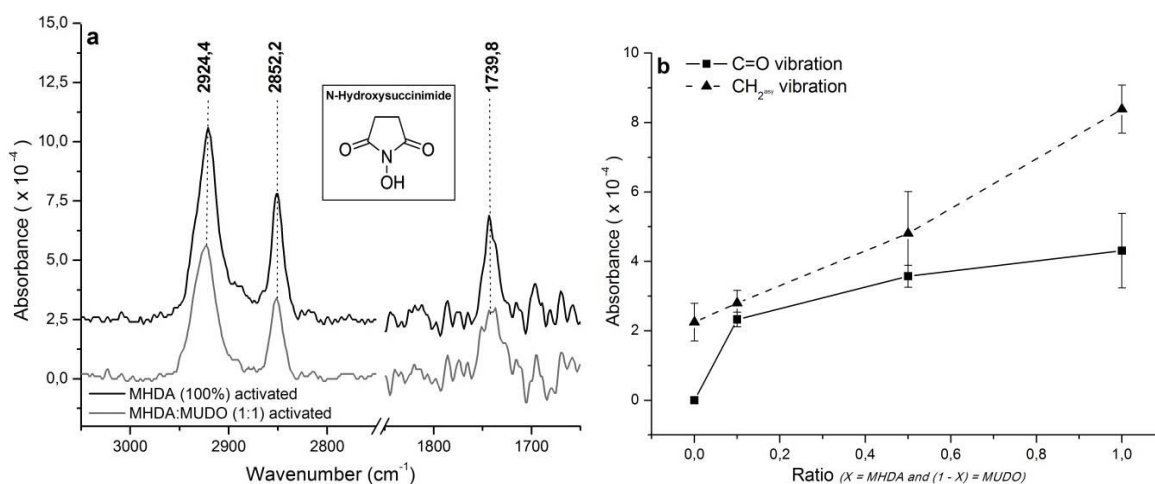


Figure 3.18: (a) Spectres infrarouges des groupes CH_2 et COOH après activation par EDC/NHS pour des SAMs de MHDA et MHDA:MUDO (1:1) sur GaAs (b) absorbance des pics $\nu\text{C}=\text{O}$ et $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ en fonction du ratio MHDA:MUDO en solution

Pour étalonner la présence de MHDA dans les SAMs mixtes, il est également envisageable d'immerger les échantillons après fonctionnalisation dans une solution diluée d'acide acétique pour reprotoner les groupements carboxyles. Les échantillons peuvent par la suite

être mesurés avec l'ASC pour éviter tout masquage des pics obtenus par les molécules d'eau présentes dans le compartiment de mesure.

- **Architecture MHDA/DDT**

En ce qui concerne l'architecture mixte constituée de MHDA et de DDT, nous pouvons observer (Figure 3.19), des spectres quasiment similaires pour les monocouches constituées de DDT pure ou en mélange. Cela prouve de nouveau une prévalence des molécules de DDT lors de leur adsorption sur le substrat pendant l'auto-assemblage comme cela a été déjà prédit par mesure des angles de contact (voir paragraphe 3.4.2). L'utilisation de cette monocouche pour immobiliser les biorécepteurs a été écartée car la présence de MHDA dans ces architectures mixtes n'a pas pu être établie.

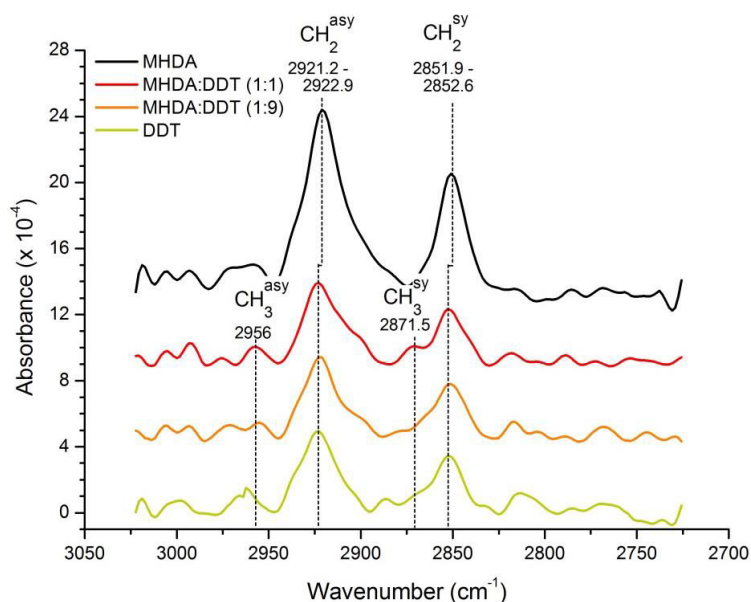


Figure 3.19: Spectres de la région des méthylènes pour les SAMs de MHDA, DDT, MHDA:DDT (1:1) et MHDA:DDT (1:9) reconstitués sur GaAs

3.6.2 Cinétique d'adsorption

Le mécanisme d'auto-assemblage est décrit par un régime en deux étapes : une rapide adsorption (chimisorption) suivie par une phase d'organisation lente où la densité surfacique des thiols continue à augmenter^{165,254}. Comparés à l'or, les SAMs sur GaAs nécessitent une phase initiale d'adsorption plus importante. Par exemple, McGuinness et al. ont estimé qu'il fallait plusieurs heures pour l'auto-assemblage d'ODT sur GaAs(100)¹⁶⁵ alors que sur substrat d'or, les SAMs peuvent se former et s'organiser en moins d'une

minute²⁵⁵. Nous expliquons ces temps plus longs par le concours d'adsorption des thiols et de ré-oxydation progressive du substrat de GaAs.

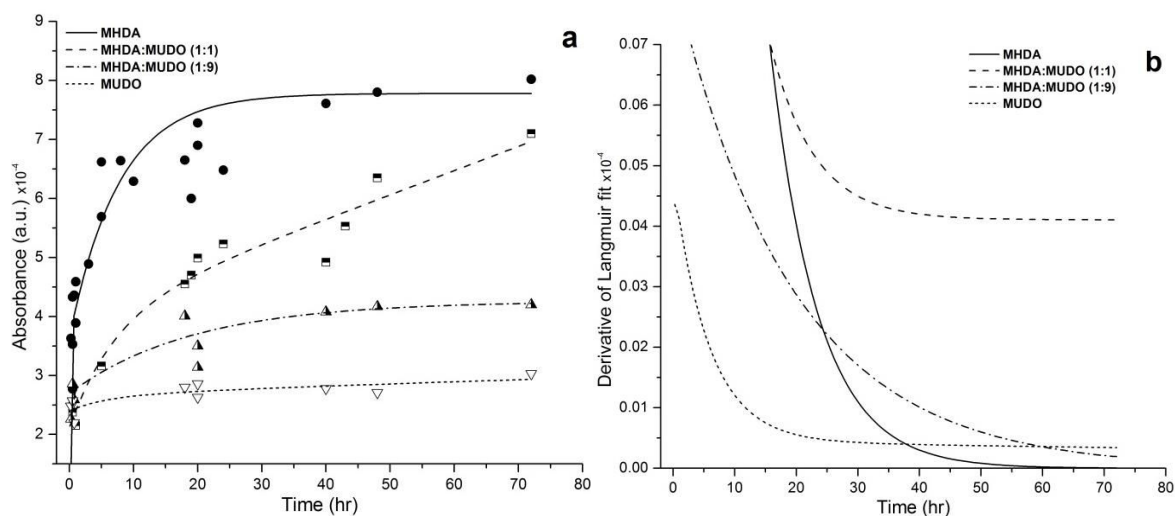


Figure 3.20: (a) Cinétique d'auto-assemblage du MHDA (trait plein), MHDA:MUDO (1:1) (trait pointillé), MHDA:MUDO (1:9) (trait en point-tiret) et MUDO (trait en tiret) sur substrat de GaAs et (b) dérivée des 4 courbes de Langmuir illustrant le temps pour atteindre la saturation pour chaque SAM.

Les courbes de cinétique d'adsorption correspondent à un modèle d'adsorption de Langmuir du second ordre qui décrit à la fois l'adsorption et le réarrangement des thiols^{238,256,257} :

$$A = A_0 \left(1 - A_{ads} e^{-\frac{t}{\tau_{ads}}} - (1 - A_{ads}) e^{-\frac{t}{\tau_{rea}}} \right) \quad (3.5)$$

Où A_0 indique l'absorbance maximale d'une monocouche complètement organisée, A_{ads} et τ_{ads} correspondent respectivement au coefficient et à la constante de temps de la phase d'adsorption (1^{ère} phase) tandis que τ_{rea} désigne la constante de temps de la phase de réarrangement (2^{ème} phase). Le coefficient de réarrangement est remplacé par $(1 - A_{ads})$ pour satisfaire la condition $A=0$ à $t=0$ h. La courbe de MHDA a été ajustée par l'utilisation de ce modèle et ce qui a permis l'évaluation des coefficients et des constantes de temps. A_{ads} a été évalué à 0.51 ± 0.09 ce qui est proche de la valeur de 0.43 obtenue par Kim et al.²³⁸ pour l'auto-assemblage de HDT sur GaAs. La constante de temps pour l'adsorption est équivalente à 0.11 ± 0.09 h tandis que celle du réarrangement est de 2.62 ± 0.98 h, valeurs relativement proches de celles obtenues par le même auteur²³⁸. L'adsorption rapide des thiols et la faible valeur d'absorbance obtenues pour les molécules de MUDO font que la

détermination des coefficients et constantes de temps devient trop complexe. Chaque solution atteint différents niveaux de saturations (A_0) compris entre 2.93×10^{-4} pour le MUDO et 7.98×10^{-4} pour le MHDA. Le calcul des paramètres pour les solutions mélangées n'est pas possible avec le modèle présent, car il doit inclure les phénomènes de remplacement et de concurrence entre les deux types de molécules thiolées. L'absorbance à saturation peut être légèrement différente de l'absorbance à $t = 20$ h qui est donnée comme le temps nécessaire pour atteindre la saturation avec une SAM d'hexadécane sur GaAs²³⁸. Nous pouvons toutefois estimer visuellement les cinétiques des autres solutions : la plus rapide est observée pour les SAMs de MUDO, suivie successivement par les SAMs de MHDA à 10%, MHDA 100% et finalement MHDA à 50%. Telle qu'illustrée sur la Figure 3.20b, la formation des SAMs mixtes semblent s'achever beaucoup plus tard que pour les SAMs homogènes ce qui suppose qu'il y a compétition entre les deux molécules. En effet, un phénomène n'a pas été considéré, jusqu'à présent pour la formation de SAMs mixte : c'est le remplacement des thiols entre eux. Kim et al. et Baralia et al. ont en effet montré qu'il y avait substitution de l'ODT par des molécules de MUDA²⁵⁸ et de MUDO²⁵⁹ (substitution qui n'est pas forcément réversible).

3.6.3 Formation de SAMs mixtes par remplacement de thiols

Dans cette partie, est étudié le remplacement d'un composé thiol A déjà auto-assemblé sur le GaAs par un autre composé B. Kim et al. et Baralia et al. ont déjà montré la substitution de la molécule d'ODT sous forme de SAM par respectivement du MUDA²⁵⁸ et du MUDO²⁵⁹ sur des substrats d'or. La Figure 3.21a montre l'absorbance des pics $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ et leurs positions mesurées sur des échantillons constitués d'une monocouche de MHDA (20h d'incubation) selon leur temps d'immersion dans une solution de MUDO. Les échantillons sont exposés 0, 2, 3, 6, 25 et 45 heures à la solution éthanoïque de MUDO. En parallèle, pour quelques échantillons mesurés dans ces séries, a également été quantifiée l'absorbance du pic correspondant à la vibration C=O. Celle-ci a été mesurée en utilisant l'ASC et avec une préalable activation des groupements -COOH par l'EDC/NHS (Figure 3.21b).

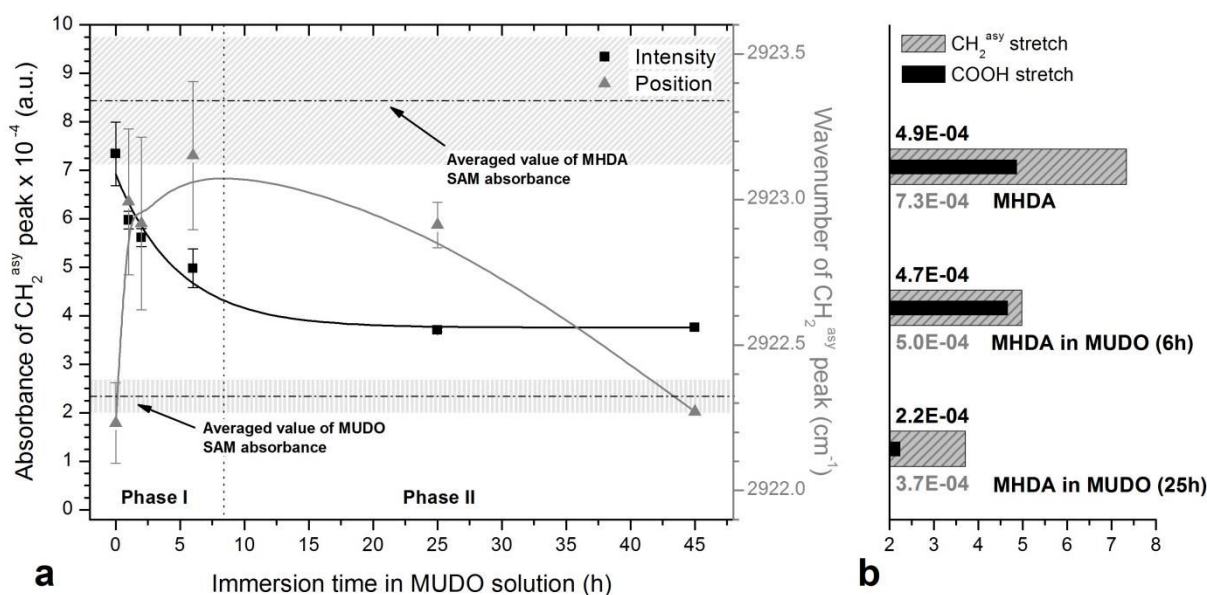


Figure 3.21: (a) Absorbance du pic de CH_2^{asy} pour une SAM de MHDA immergée dans une solution éthanoïque de MUDO et (b) Intensité d'absorbance pour les vibrations $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ et νCOOH pour 0h, 6h et 25 h d'immersion

Nous pouvons observer sur cette figure la présence de deux phases distinctes décrites ci-dessous :

- La phase I ($t \leq 6\text{h}$) décrit une rapide décroissance de l'absorbance corrélée avec une variation de la fréquence de vibration vers les plus hautes fréquences (Figure 3.21a). Le phénomène sous-jacent est probablement relié à l'adsorption des molécules de MUDO au dépend de la désorption du MHDA. La variation de la fréquence de vibration indique une désorganisation partielle de la monocouche pendant cette phase jusqu'au point d'inflexion à environ $t \approx 6\text{h}$. La mesure des carbonyles pour la SAM de MHDA homogène donne une valeur de 4.9×10^{-4} correspondant à une couverture saturante du NHS (voir partie 3.6.1 pour la caractérisation d'architecture MHDA/MUDO après activation).
- La phase II ($t > 6\text{h}$) montre une faible diminution de l'absorbance et de la position du pic $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$, ce qui indique une réorganisation de la nouvelle architecture de thiols sur la surface du GaAs. Les courbes tendent à se stabiliser après plusieurs heures. A $t > 25\text{h}$, on peut considérer que la monocouche n'évoluera plus. L'absorbance ainsi atteinte correspond à environ 1.6x l'absorbance moyenne d'une SAM homogène de MUDO. Cependant la position de la vibration $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ (2923cm^{-1}) semble atteindre une valeur proche du minimum obtenu dans le cas des mélanges MHDA/MUDO ou même des monocouches de MUDO pures. L'intensité de

vibration de la liaison carbonyle décroît de 4.7×10^{-4} à 6h d'immersion jusqu'à 2.2×10^{-4} après 25h d'immersion.

En ce qui concerne le remplacement de monocouches déjà formées de MUDO par les molécules de MHDA, nous avons réalisé une expérience similaire (Figure 3.22a). Cette fois-ci les échantillons constitués d'une SAM de MUDO sont immergés dans la solution contenant les thiols MHDA pendant 0, 25, 45 et 65 heures.

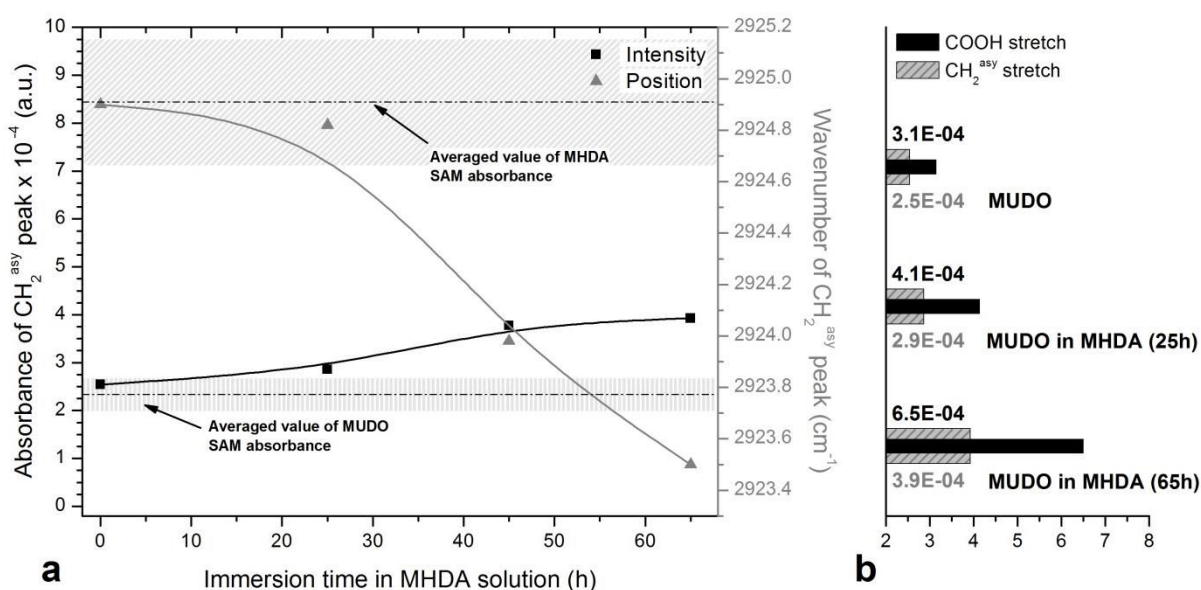


Figure 3.22: (a) Absorbance du pic de CH₂^{as} pour une SAM de MUDO immergée dans une solution éthanoïque de MHDA et (b) Intensité d'absorbance pour les vibrations $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ et νCOOH pour 0h, 25h et 65h d'immersion

Nous pouvons voir dans ce cas seulement une faible augmentation de l'absorbance en fonction du temps. Par contre, la position du pic dévie fortement vers les basses fréquences révélant probablement une densification de la monocouche ou une meilleure organisation de celle-ci. Le phénomène de remplacement ne semble donc pas entièrement réversible entre le composé A et B ce qui a également été montré²⁵⁸ avec les molécules d'ODT et MUDA dans la littérature. De la même façon, nous prélevons quelques échantillons pour y mesurer les vibrations C=O à l'ASC après activation. On observe cette fois-ci une augmentation de ces pics en fonction du temps d'immersion. Leur intensité est étonnamment plus importante que pour les précédents échantillons. Smith et al. suggèrent, dans le cas d'une SAM homogène de MHDA, qu'une partie des groupes de tête se lie pour former des dimères $-\text{COOH} \cdots \text{HOOC}-$ qui provoqueraient une légère désorganisation des

groupes de tête. Or dans le cas du remplacement des molécules de MUDO par celles de MHDA, ces dernières seront plus diluées dans la SAM et ne présenteront pas de liaison tête-à-tête favorisant ainsi l'activation de ces groupes.

Les résultats des caractérisations effectuées dans cette partie démontrent que la méthode de remplacement offre un meilleur contrôle des proportions de thiols composants la SAM mixte qu'une méthode d'adsorption simultanée. La substitution des molécules de MUDO par celles de MHDA est un phénomène particulièrement lent par rapport au procédé réciproque. Néanmoins, celui-ci offre des perspectives très intéressantes pour l'activation d'un plus grand nombre de sites que par les méthodes « traditionnelles ».

3.7 Optimisation et densification de SAM

3.7.1 Densification sur monocouches simples

Il a été déjà prouvé que les monocouches de thiols se forment et s'organisent mieux lorsque le solvant utilisé a une forte polarité, forte solubilité, faible dimension moléculaire et une forte viscosité²⁶⁰. Dans ce contexte, l'utilisation de mélange éthanol/eau a déjà démontré son efficacité pour obtenir une couverture plus dense d'alkanethiols que ce soit sur or^{260,261} ou sur GaAs^{90,91}. Une étude plus quantitative a été mise en place dans le but de déterminer le rapport optimal permettant d'obtenir la monocouche de la meilleure qualité possible. De plus, ont été étudiés les impacts des longueurs de chaîne alkyl et des différents groupes terminaux dans ce phénomène. La Figure 3.23a montre le spectre FTIR de la région méthylène de trois différentes monocouches d'alkanethiols obtenues soit dans l'éthanol soit dans un mélange éthanol/eau (2:1 en volume). Trois échantillons pour chaque cas ont été mesurés et les résultats en terme d'absorbance et de nombre d'onde ont été reportés dans le Tableau 3.1. Une augmentation de l'absorbance des pics asymétriques et symétriques est observée pour toute les SAMs formées dans la solution éthanol/eau. En parallèle, la position se décale légèrement selon les molécules, de 1.2 à 2.9 cm^{-1} vers les basses fréquences. Des molécules comparables ont été étudiées pour comprendre l'effet du groupe terminal et de la longueur de chaîne, lors de leur chimisorption sur le GaAs, dans des solutions d'éthanol/eau. Le MHDA et le MUDA (même groupe terminal $-\text{COOH}$) ont été choisies pour comparer l'impact de la longueur de chaîne dans le processus tandis que le MUDO (terminaison $-\text{OH}$) et le MUDA ont été sélectionnés pour comprendre l'effet du groupe terminal. Les SAMs de MHDA, MUDO et MUDA formées dans l'éthanol/eau (2:1) montrent respectivement une absorbance de 2x, 2.1x et 1.34x plus grande que celles

formées dans l'éthanol. Pour le même groupe terminal $-COOH$, les thiols à longues chaînes (16 carbones) génèrent une plus forte augmentation des pics méthylènes dans l'éthanol/eau que les thiols à courtes chaînes (11 carbones). Ceci souligne le rôle des forces intermoléculaires entre les chaînes alcane dans la formation de SAMs de haute qualité. A travers cette observation nous pouvons affirmer que les forces intermoléculaires deviennent d'autant plus importantes que la longueur de chaîne alkyle est grande²⁶². D'un autre côté, les molécules avec de longues chaînes hydrocarbonées sont sujettes à être non-polaires et leur solubilité dans l'eau décroît. La structure des monocouches est donc fortement influencée par les interactions entre les chaînes hydrocarbonées de thiols à travers les forces de van der Waals qui peuvent améliorer la conformation de la SAM, augmenter sa densité et réduire le nombre de défauts²⁶³.

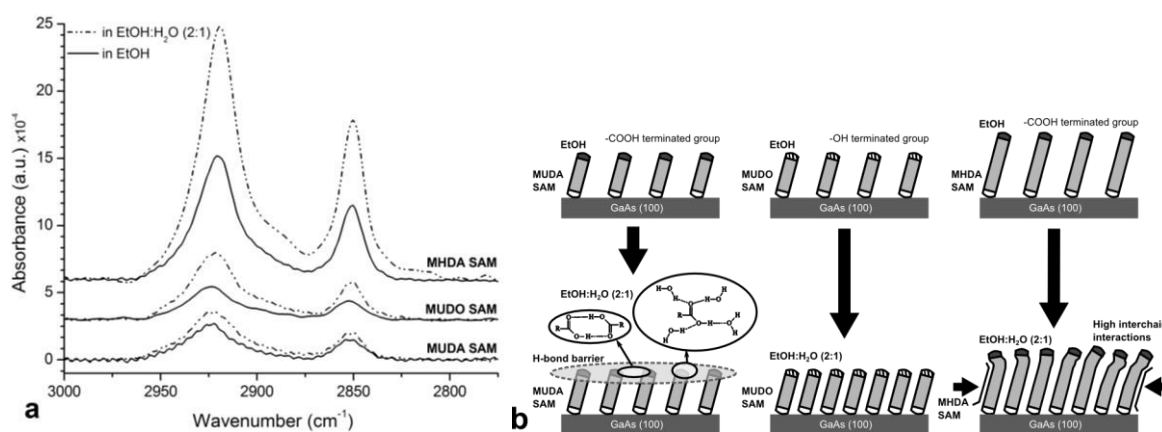


Figure 3.23: (a) Région ν_{CH_2} du spectre IR des SAMs de MHDA, MU DO and MUDA formées dans l'éthanol ou dans le mélange EtOH:H₂O (2:1) et (b) Schéma de principe des phénomènes lors de l'auto-assemblage des différentes monocouches dans l'éthanol et dans le mélange EtOH:H₂O

Nous avons vu que les thiols à terminaison $-OH$ forment des monocouches moins denses que les thiols à terminaison $-COOH$ dans l'éthanol. Mais on observe le comportement inverse lorsque les SAMs sont formées en milieu semi-aqueux. En effet, on obtient une plus forte densité pour les SAMs de MU DO que pour les SAMs de MUDA dans l'EtOH:H₂O (Tableau 3.1). L'explication est que l'énergie totale des liaisons hydrogène pour les acides carboxyliques est plus élevée que celle observée pour les groupements hydroxyles car les premières ont des accepteurs ($-C=O$) et donneurs ($-OH$) de H. En milieu aqueux, les acides carboxyliques peuvent interagir plus librement entre eux et avec les molécules d'eau et peuvent former une "barrière" surfacique (Figure 3.23b). Nuzzo et al. affirment que 50% des molécules voisines sont liées par pont hydrogène²⁵¹ tandis que Li et al. suggèrent même que jusqu'à 100% de ces molécules peuvent être liées ensemble²⁶⁴.

Cette barrière est une limitation pour la chimisorption de nouvelles molécules sur le substrat et explique la différence en absorbance entre la SAM de MUDA formée dans l'éthanol/eau comparée à celle de MU DO. Kim et al. suggèrent que les thiols à terminaison carboxyle sont plus stables grâce aux liaisons latérales qui peuvent être formées entre leurs groupes de tête²⁵⁸.

	Absorbance de $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ ($\times 10^{-4}$)	Nombre d'onde $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ (cm^{-1})
MHDA dans l'EtOH	8.44 ± 1.34	2921.8 ± 1.0
MHDA dans l'EtOH:H ₂ O (2:1)	17.40 ± 3.16	2918.9 ± 1.0
MUDO dans l'EtOH	2.34 ± 0.37	2923.9 ± 2.0
MUDO dans l'EtOH:H ₂ O (2:1)	4.85 ± 0.70	2921.9 ± 0.4
MUDA dans l'EtOH	2.71 ± 0.34	2923.7 ± 1.9
MUDA dans l'EtOH:H ₂ O (2:1)	3.62 ± 0.74	2923.4 ± 2.2

Tableau 3.1: Valeurs d'absorbance pour le pic $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ pour les SAMs de MHDA, MU DO et MUDA auto-assemblées sur GaAs dans l'éthanol ou le mélange EtOH:H₂O (2:1)

Des monocouches formées dans les solutions d'éthanol/eau ont été caractérisées à différents pourcentages d'eau dans la solution (Figure 3.24a et b). Les courbes révèlent une augmentation de l'absorbance corrélée avec une déviation de la fréquence de vibration vers les basses fréquences des $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ en fonction du pourcentage d'eau dans la solution. La valeur d'absorbance pour les monocouches de MHDA augmente quasi-linéairement avec la proportion de H₂O jusqu'à un maximum de 35-40% d'eau avant de décliner. La cristallinité de la monocouche indiquée par la position des pics suit un comportement similaire. Le maximum d'absorbance est atteint au ratio éthanol/eau correspondant à la limite de solubilité des thiols.

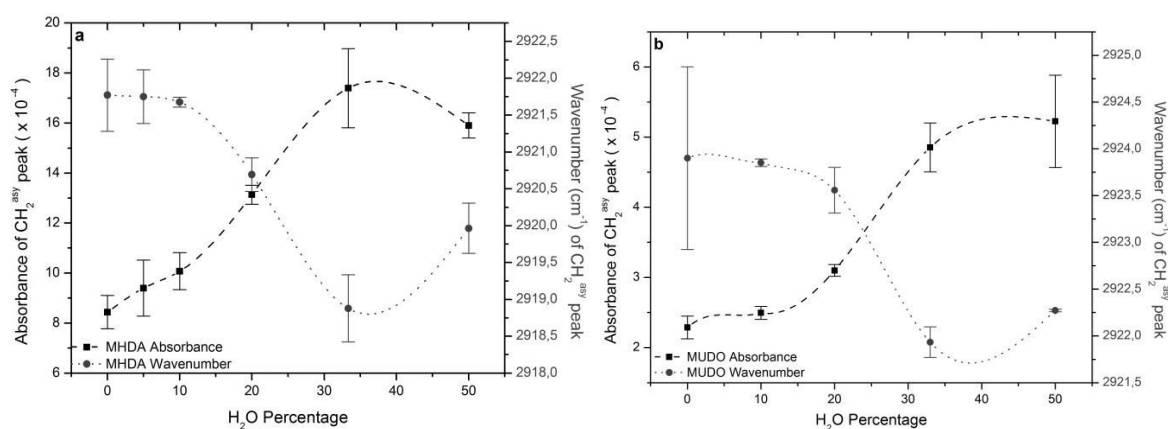


Figure 3.24: Absorbance et nombre d'onde des vibrations $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ pour les SAMs constituées (a) de MHDA et (b) de MU DO en fonction du pourcentage d'eau dans la solution de thiols

Des mesures de densité optique à $\lambda = 600\text{nm}$ des solutions ont été effectuées pour obtenir la limite de solubilité des solutions de thiols en fonction des proportions d'éthanol/eau. La Figure 3.25a montre les valeurs de densité optique pour le MHDA et le MUDO dans des solutions éthanol dilué avec de l'eau entre 30 et 60%. La modification de la densité optique au-delà de 35% d'eau pour le MHDA indique une perte de solubilité des molécules à ce pourcentage. Ce résultat coïncide avec la diminution de l'absorbance et l'augmentation en énergie de la vibration $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ (décalage vers les nombres d'onde élevés) obtenues dans la Figure 3.24a au-delà de 35% d'eau. Les molécules de MUDO sont plus polaires que le MHDA et ne semblent donc pas perdre leur solubilité jusqu'à 60% d'eau. La courbe d'absorbance pour cette molécule montre également une croissance entre 0 et 35% mais sans réelle diminution au-delà de ce seuil (Figure 3.24b). On peut expliquer cette saturation par l'obtention d'une monocouche de densité maximale (saturée). Le rôle de l'eau dans la formation de SAMs plus denses sur GaAs semble être lié à deux phénomènes. Le premier est l'augmentation des interactions hydrophobes entre chaînes alcanes provoquées par la présence d'eau²⁶⁵. Le second phénomène est la modification de l'état chimique de la surface du GaAs. Comme l'a suggéré Huang⁹⁰, l'eau permet de dissoudre plus facilement les complexes As-oxydes formés sur la surface du matériau et donc de libérer des sites disponibles pour la chimisorption d'autres molécules²⁶⁶.

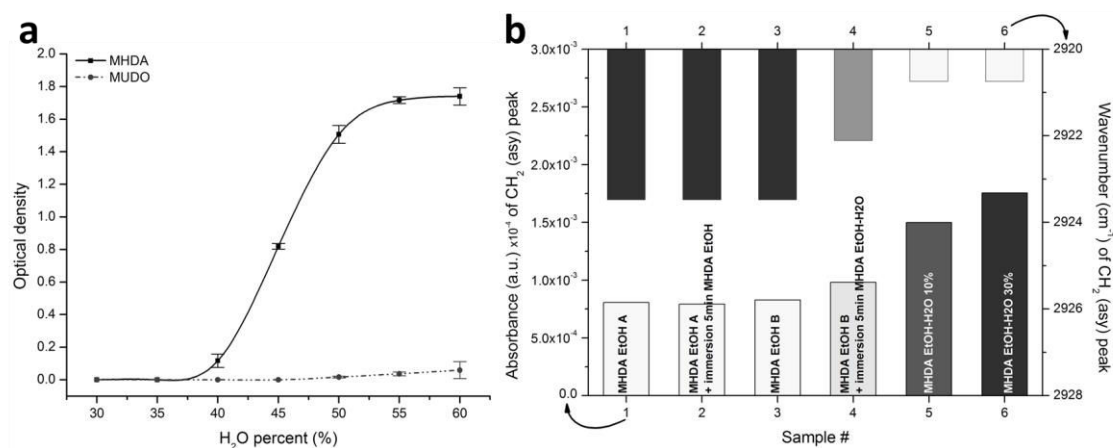


Figure 3.25: (a) Densité optique à $\lambda = 600\text{nm}$ mesurée sur les solutions de thiols avec différents ratios EtOH:H₂O et (b) absorbances et positions de la vibration $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ pour des échantillons ré-immérgés en solution de thiols

Une expérience a été menée pour déterminer s'il était possible d'observer ce phénomène lorsqu'une monocouche a déjà été préalablement formée. Deux échantillons ont été préparés de la même façon avec une monocouche de MHDA formée en 20h dans une

solution éthanoïque uniquement. Après une première caractérisation, les échantillons ont été immergés séparément dans deux solutions, l'une (échantillon A) contenant de nouveau 2mM de MHDA dans l'éthanol et l'autre (échantillon B) contenant 2mM de MHDA dans un mélange EtOH:H₂O (2:1 en volume). Après 5min seulement les échantillons ont été rincés puis remesurés. Nous pouvons voir sur la Figure 3.24b, les résultats en absorbance et en position de la vibration $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ comparés à des caractérisations sur des échantillons préparés dans des solutions d'EtOH:H₂O à 10 et 30 %. On remarque qu'il n'y a pas eu de changement pour l'échantillon A ré-immersé dans la solution éthanoïque. Par contre, pour l'échantillon B l'intensité du pic de $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ a augmenté et sa position a diminué. On suppose que si l'immersion est plus longue on atteindra des valeurs d'absorbance et de nombre d'ondes similaires à celles obtenues pour les SAMs formées directement dans la solution EtOH:H₂O. Ce qui prouve que le processus de densification de SAM peut être appliqué directement sur une monocouche déjà formée (par exemple dans l'éthanol).

Nous pouvons conclure que la présence d'eau dans l'éthanol, lors du processus d'auto-assemblage, permet la formation de SAMs plus denses et donc plus organisées quel que soit le type de thiols utilisés. Toutefois, plus la chaîne alcane sera longue plus ce phénomène sera exacerbé. Par contre, les groupes terminaux favorisant la formation de ponts hydrogène vont être un facteur limitant, de même que la limite de solubilité de ces molécules en solution aqueuse.

3.7.2 Densification sur monocouches mixtes

L'effet de l'ajout de l'eau pour la formation de monocouches mixtes a également été étudié. De la même façon que dans la partie 3.7.1, les monocouches ont été préparées avec différents ratios de MHDA/MUDO : 0, 5, 10, 25, 50, 75, 90 et 100 % de MHDA. L'absorbance et la position des pics pour chaque SAM constituée dans un mélange EtOH:H₂O (2:1) sont reportées sur les Figure 3.26a et b respectivement. A des fins de comparaison, la courbe d'absorbance des SAMs formées dans l'éthanol est également reportée sur la Figure 3.26a. En dessous du point d'inflexion à X=0.5, l'absorbance du pic CH_2^{asy} double, entre un ratio MHDA/MUDO de 0 et 0.5, lorsque la SAM est formée dans l'éthanol tandis qu'elle reste relativement constante pour les SAMs préparées en présence d'eau. Il est suggéré que les molécules de MUDO ont une cinétique d'adsorption plus rapide, due à leur petite taille, comparées au MHDA. Lorsque la SAM est formée en présence d'eau, la densité de celle-ci est plus élevée et donc laisse peu d'interstice ou

d'espace pour l'adsorption des molécules de MHDA qui est plus lente. Ceci conduit à une rapide saturation de la surface comparé aux SAMs formées dans l'éthanol uniquement. Au-delà du point d'inflexion, l'absorbance augmente drastiquement pour la SAM incubée dans l'EtOH:H₂O (2:1). La pente à $x > 0.5$ est alors égale à $(8.0 \pm 0.7) \times 10^{-4}$ pour l'EtOH tandis que l'EtOH:H₂O (2:1), atteint $(24.4 \pm 3.0) \times 10^{-4}$. La diminution de l'énergie de la vibration $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ observée sur la Figure 3.26b suggère une augmentation de la qualité de la SAM et est de nouveau bien corrélée avec les résultats d'absorbance. La figure donne une idée schématique des hypothèses énoncées précédemment sur la formation de SAMs mixtes MHDA/MUDO dans des solutions d'EtOH et d'EtOH:H₂O (2:1).

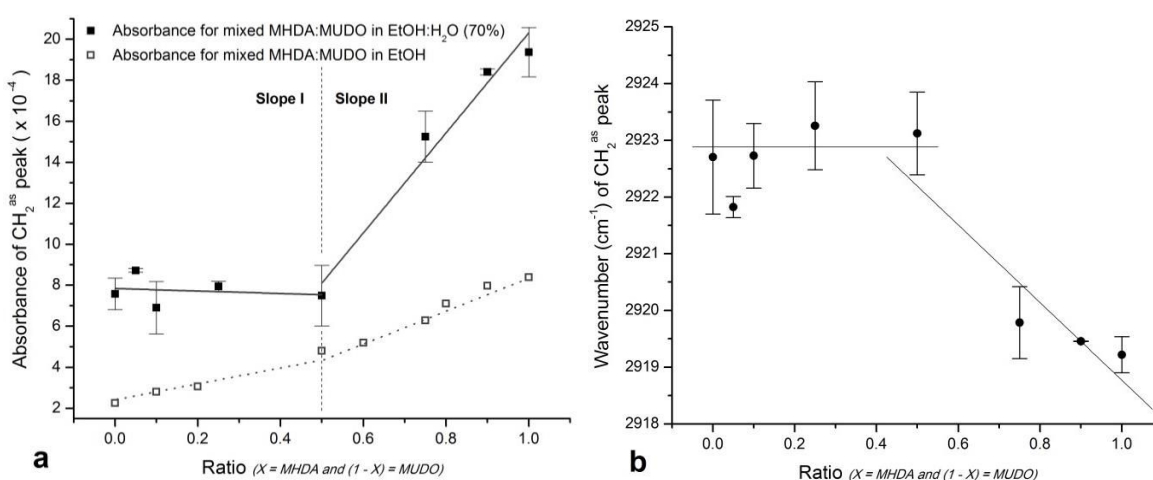


Figure 3.26: (a) Absorbances et (b) positions du pic $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ en fonction du rapport $X/1-X$ des solutions MHDA:MUDO solubilisées dans un mélange EtOH:H₂O (2:1)

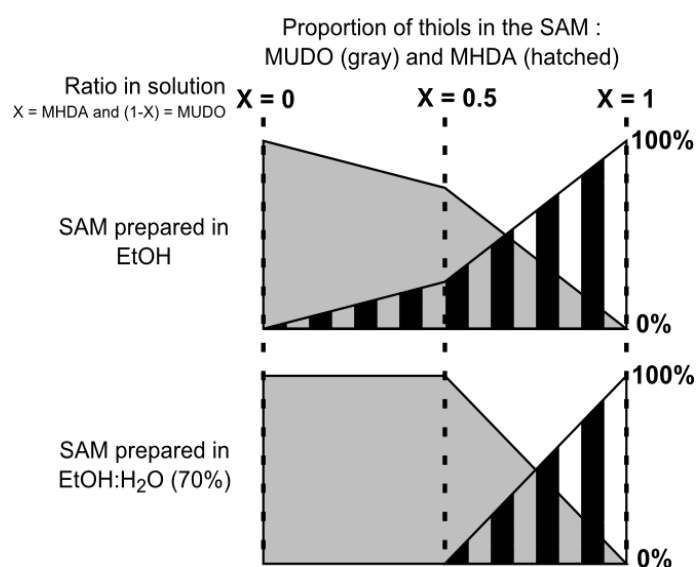


Figure 3.27: Représentation schématique des proportions MHDA/MUDO dans la SAM en fonction du rapport des composés en solution pour des monocouches préparées dans l'éthanol et dans le mélange EtOH:H₂O (2:1)

3.8 Immobilisation des récepteurs immunologiques

3.8.1 Analyse de la cinétique de greffage des anticorps par FTIR

Cette partie décrit le protocole d'immobilisation d'anticorps sur SAMs pures de MHDA (utilisées comme référence). Les terminaisons carboxyles des alkanethiols de MHDA sont utilisées pour immobiliser les anticorps à travers une réaction en présence de carbodiimide. Pour assurer la liaison covalente avec les anticorps, les échantillons sont immergés pendant 30min dans un mélange de NHS à 0.1M et d'EDC à 0.4M (solubilisé dans de l'eau DI). Les réactifs préalablement aliquotés sont décongelés puis utilisés directement après mélange (instable dans le temps)¹³⁵. Après activation, les échantillons sont rincés avec de l'eau déionisée (DI) pour enlever l'excès de NHS et d'EDC qui n'a pas réagi avec la SAM. Les échantillons sont ensuite immergés dans une solution d'anticorps anti-*E. coli* diluée dans du PBS (1x) et de TWEEN20 (0.05%) à une concentration de 100µg/mL pour 30min, 1h, ou 2h d'incubation. Les échantillons sont finalement rincés abondamment avec la solution PBS (1x) et TWEEN20 (0.05%) puis avec de l'eau DI pour enlever les sels en surface. Les mesures sont réalisées par FTIR, en mode transmission, dans le compartiment sous vide et en utilisant l'ASC. Les échantillons incluant celui de référence sont placés dans le compartiment de mesure avec l'ASC et mesurés après 24h de pompage. Sur la Figure 3.28, nous pouvons voir le spectre IR d'un échantillon fonctionnalisé par une monocouche de MHDA seul sur laquelle des anticorps ont été immobilisés selon la méthode précédemment décrite et avec 1h d'incubation.

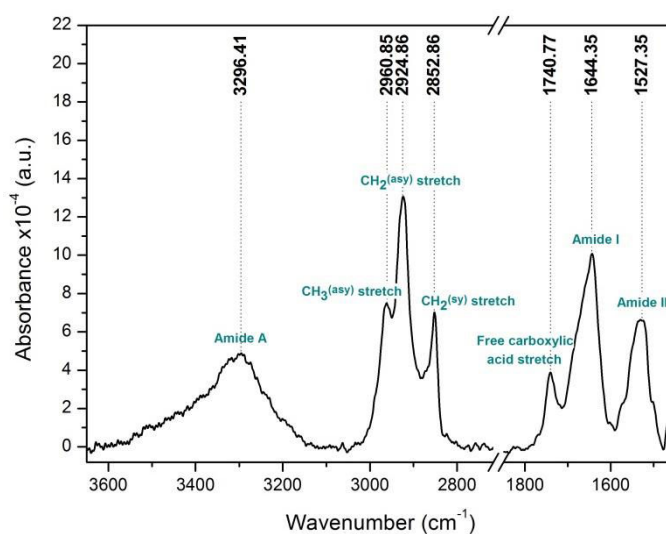


Figure 3.28 Spectre FTIR d'anticorps immobilisés sur une SAM de MHDA sur GaAs(100)

Le pic à 1740.8cm^{-1} est lié aux vibrations carbonyles présentes dans la SAM et dans la structure de l'anticorps. Mais la présence d'anticorps immobilisés sur la surface est démontrée grâce aux bandes amides A, I, et II situées respectivement dans les régions à 3296.4cm^{-1} , 1644.4cm^{-1} et 1527.4cm^{-1} . Selon Bandekar et al., au sein des protéines, la bande amide A est essentiellement due aux vibrations N-H en étirement, l'amide I est plutôt associée aux vibrations C=O également en étirement, tandis que l'amide II est liée aux modes de torsion des liaisons N-H ainsi que des modes d'étirement des liaisons C-N²⁶⁷. On observe l'apparition des pics liés aux vibrations de la liaison CH₃, $\nu\text{CH}_3^{\text{asy}}$ (localisé à 2960.9cm^{-1}) et $\nu\text{CH}_3^{\text{sy}}$ (dissimulé par le chevauchement des pics CH₂^{asy} et CH₂^{sy}). Les modes d'étirement de la liaison CH₂ ($\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ et $\nu\text{CH}_2^{\text{sy}}$ à 2924.9cm^{-1} et 2852.9cm^{-1}) sont amplifiés par rapport aux mesures de la SAM correspondante.

La Figure 3.29 montre l'évolution des bandes amides I et II ainsi que des vibrations CH₂^{asy} en fonction du temps d'immersion dans la solution d'anticorps. Ces composantes qui sont corrélées à la quantité d'anticorps immobilisés sur l'échantillon ont une nette tendance à se stabiliser après 1h d'incubation. Nous pouvons en conclure que 1h d'incubation est suffisante pour saturer les sites disponibles sur une architecture simple de MHDA, ce paramètre sera conservé pour la suite des travaux.

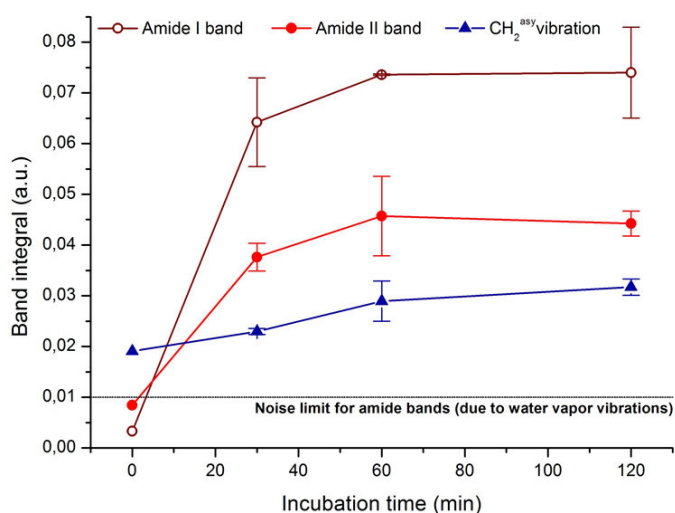


Figure 3.29: Intégrale des bandes méthylène et amide I et II en fonction du temps d'incubation des échantillons de GaAs fonctionnalisés par du MHDA activés dans une solution d'EDC/NHS et immergés dans une solution d'anti-*E. coli*

3.8.2 Caractérisation du greffage de l'anticorps avec différentes architectures de SAM par FTIR

Nous avons caractérisé le greffage des anticorps sur les architectures de SAMs précédemment étudiées (MHDA à 100%, 90%, 50%, 10% dans le MUDO, MUDO à 100% et PEG-biotin). Pour chaque monocouche à base de MHDA ou MUDO, les anticorps ont été immobilisés selon le protocole décrit dans la partie 3.8.1. Pour l'architecture PEG-biotin, les anticorps (biotinylés) sont immobilisés par l'intermédiaire du couplage biotin-NeutrAvidin-biotin. L'ensemble du protocole est réalisé dans des conditions normales de température et de pression et les protéines sont diluées dans un tampon salin phosphate (PBS 1x, pH7) avec l'ajout de surfactant TWEEN20 à 0.05%. La NeutrAvidin est d'abord diluée dans le tampon pour obtenir une concentration de 100 μ g/mL. Les échantillons sont exposés à la NeutrAvidin pour une durée de 2h avant d'être rincés avec une solution de PBS 1x et de TWEEN20 (0.05%). Puis les anticorps biotinylés dilués également dans la solution tampon à une concentration de 100 μ g/mL sont greffés pendant 30min sur les échantillons avant qu'ils soient à nouveau rincés par la solution tampon seule (dans le but de retirer les anticorps physisorbés). Les échantillons sont ensuite analysés par FTIR avec le module ASC, les spectres sont moyennés avant d'être représentés sur la Figure 3.30a. On observe pour chacune des architectures la présence de bandes amides I, II et A indiquant la présence d'anticorps immobilisés sur la surface. Nous pouvons voir également que la proportion des pics CH₃ par rapport aux pics CH₂ est plus importante pour les SAMs de MHDA à 10% que les SAMs de MHDA à 100% dû à l'augmentation du nombre d'anticorps et la diminution du nombre de carbone composant la SAM mixte. On remarque néanmoins la présence de bandes amides sur l'architecture homogène de MUDO indiquant la présence d'anticorps absorbés de façon non spécifique sur la surface. Le calcul des intégrales des bandes amide I et II permet de quantifier la couverture protéique pour chaque architecture (Figure 3.30b). Parmi les architectures à base de MHDA, celle à 10% semble immobiliser le plus d'anticorps (1.38x plus que pour une monocouche de MHDA), cela confirme les résultats obtenus par Bienaime et al. obtenus au sein du groupe, avec des caractérisations AFM et MALDI-TOF^{128,197}. Nous expliquons cette augmentation par une accessibilité plus évidente des sites de greffages de la SAM (groupements carboxyles). En revanche, c'est l'architecture PEG-biotin qui donne les valeurs les plus élevées sur l'ensemble des SAMs testées (1.7x plus que pour le MHDA). Il faut toutefois prendre en compte dans ce cas, que ces bandes correspondent à la présence des anticorps et de la

NeutrAvidin. Afin d'avoir une quantification plus correcte de la densité d'anticorps seule, nous ajoutons un facteur de correction que nous estimons avec le rapport de taille des protéines. La NeutrAvidin est une protéine de $u_{NA} = 60\text{kDa}$ tandis que l'anticorps est de $u_{Ac} = 150\text{kDa}$. Bien que la NeutrAvidin possède quatre sites de liaison avec la biotine nous considérons qu'en moyenne, pour chaque NeutrAvidin liée à la SAM, un seul anticorps se liera à chaque protéine. Cette supposition nécessiterait d'être confirmée par une caractérisation de la couche seule de NeutrAvidin (cela n'a pas pu être réalisé par manque de temps). Le facteur de correction, équivalent au pourcentage massique des protéines ($\frac{u_{Ac}}{u_{NA}+u_{Ac}}$), est donc égal à 71.43% des bandes amide (barres hachurées sur la Figure 3.30b). Les valeurs d'intégrale corrigées restent toujours plus élevées que pour les autres biointerfaces. La forte hydrophilicité des molécules PEG permet de favoriser les interactions spécifiques avec le groupe de tête. Ces interactions sont importantes dues à la forte affinité du couple NeutrAvidin/biotine.

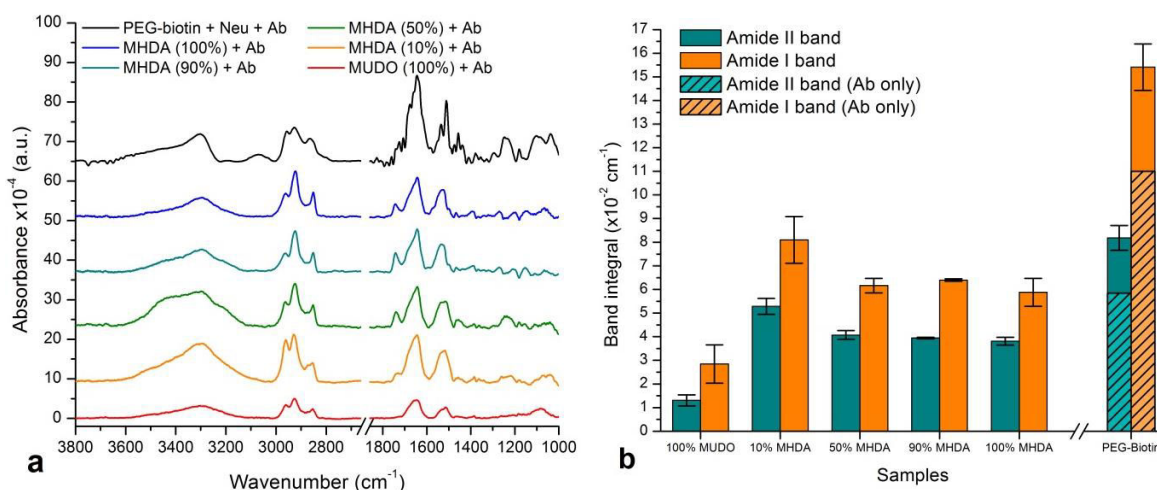


Figure 3.30: (a) Analyse FTIR du greffage d'anticorps en fonction des différentes architectures (100%, 90%, 50%, 10% MHDA, 100% MUDO et PEG-biotin) et (b) évaluation de l'intégrale des bandes Amide I et II pour chaque architecture

Pour conclure, la biointerface la plus efficace pour greffer des anticorps semble être la SAM de PEG-Biotin dû probablement à la forte affinité du couple NeutrAvidin/biotine. La valeur obtenue a été préalablement corrigée par un facteur permettant de considérer uniquement la présence d'anticorps. Enfin si l'on compare les architectures de MHDA, celle contenant 10% de MHDA semble se détacher des autres SAMs et offre la plus forte densité de greffage.

3.8.3 Caractérisation du greffage avec différentes architectures de SAM par spectroscopie à décharge lumineuse

La spectrométrie à décharge lumineuse (ou SDL) est une technique de caractérisation pour l'analyse de concentrations élémentaires d'échantillons solides permettant la réalisation de profils de concentrations. L'utilisation de cette technique pour la caractérisation de couches biofonctionnalisées ou de biointerfaces est relativement atypique. Il y a toutefois certains auteurs qui ont réalisé des analyses SDL pour étudier des monocouches formées sur substrat métallique^{268,269}. Nous n'utiliserons pas cette technique pour l'analyse directe des différentes architectures de SAMs étudiées dans ce chapitre car cela nécessite des conditions de mesures optimales et une maîtrise complète de l'appareil. Cette étude a pour objet d'avoir une idée du potentiel de ce système pour l'étude d'immuno-interface. Nous souhaitons en effet quantifier le nombre de biorécepteurs immobilisés sur la surface du GaAs selon les différentes architectures employées.

Cette technique a un certain nombre d'avantages; (1) elle permet la détection simultanée de nombreux éléments chimiques (30 éléments détectables), (2) l'échantillon à mesurer ne nécessite pas de préparation particulière, (3) l'analyse est très rapide et s'effectue dans un vide primaire seulement. De plus, cette technique bénéficie d'un coût d'achat relativement modeste par rapport aux techniques SIMS ou XPS et un coût d'entretien réduit.

Le principe de fonctionnement est illustré par la Figure 3.31. L'échantillon est placé sur une anode dans une chambre à atmosphère d'argon sous faible pression. Une décharge radio-fréquence de plusieurs centaines de volts est appliquée entre l'anode et la cathode. Les ions argon créés vont former un plasma qui va pulvériser l'échantillon petit à petit (échantillon polarisé négativement). Les atomes présents en surface vont en être éjectés dans un état excité. Les photons générés lors du retour à l'état fondamental des atomes excités sont détectés par des photomultiplicateurs (un pour chaque élément car chaque élément à une longueur d'onde caractéristique). L'appareil utilisé dans cette étude est le *GD Profiler*® de HORIBA Scientific. Il est doté d'un monochromateur permettant la détection d'un élément supplémentaire, l'arsenic, non présent dans la liste des 30 éléments détectés par les photomultiplicateurs (tout comme le gallium). Pour ces expériences, sont utilisés, des échantillons de GaAs(100) de 12x12mm² seulement fonctionnalisés ou avec une biointerface complète.

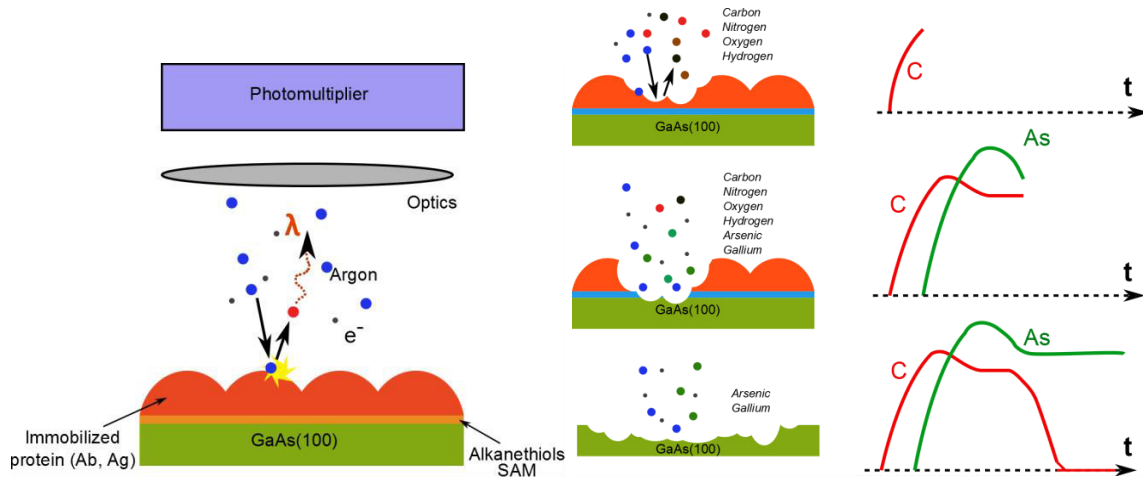


Figure 3.31: Principe de fonctionnement de la spectroscopie à décharge lumineuse (SDL) avec un exemple appliqué à la caractérisation de couches protéiques

La Figure 3.32a montre l'évolution des éléments arsenic et carbone pendant l'érosion d'un échantillon avec une monocouche de MHDA sur laquelle ont été immobilisés des anticorps. On peut voir une décroissance du profil de carbone et une croissance de celui d'arsenic indiquant l'érosion pendant les premières secondes de la couche protéique et de la monocouche puis celle du GaAs. Cinq types d'échantillons différents ont été mesurés de cette façon : MHDA, MHDA:MUDO (1:1), MHDA:MUDO (9:1), MUDO et du GaAs sans SAM. Une étape de greffage d'anticorps a été appliquée sur chaque échantillon selon le protocole énoncé dans la partie 3.8.1. Après rinçage, les échantillons ont été mesurés, un par un, dans le *GD Profiler* donnant les profils d'intensité pour chaque élément sur chaque échantillon. Les profils de soufre, azote et oxygène ont été étudiés mais sans révéler d'information pertinente sur la biointerface. Les profils de carbone pour chaque échantillon ont été tracés sur la Figure 3.32b. Les intensités de carbone sur les surfaces de MUDO sont non-nulles contrairement à ce que l'on obtient sur un échantillon sans SAM. On peut toutefois supposer que l'intensité de carbone mesurée correspond aux chaînes alkyles composant la monocouche. Sur la surface de GaAs nue, les anticorps n'ont pas pu adhérer, montrant que la procédure employée pour l'immobilisation n'autorise pas les adsorptions non-spécifiques des biorécepteurs sur les surfaces non-fonctionnalisées. Même si l'on considère qu'une partie des composantes carbonées de la biointerface est reliée à la présence des chaînes alkyles sur les échantillons (monocouche), on peut cependant admettre que les monocouches mixtes (10% et 50% de MHDA) devraient avoir un profil de carbone de plus faible intensité que celui des échantillons de MHDA (d'après les résultats obtenus par FTIR dans la partie 3.6.1). Or les mesures révèlent des résultats

similaires pour les monocouches de MHDA à 100% et à 10% et une plus forte intensité pour la monocouche mixte à 50%. Ceci suggérerait une plus forte présence d'anticorps sur les monocouches mixtes que sur celle de MHDA pure. C'est en accord avec les résultats présentés dans la partie 3.8.2.

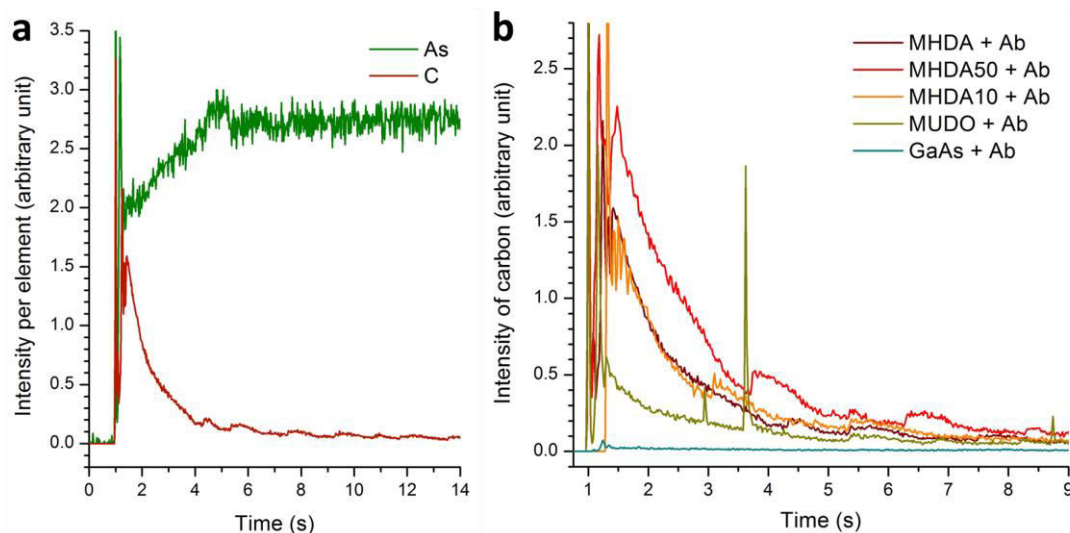


Figure 3.32: (a) Profil SDL d'arsenic et de carbone pour un échantillon de GaAs avec des anticorps immobilisés sur une SAM de MHDA et (b) profil de carbone pour des échantillons avec des anticorps immobilisés sur des SAMs de MHDA, MUDO:MHDA (1:1), MUDO:MHDA (9:1) et MUDO

3.9 Conclusion

Nous avons étudié dans ce chapitre plusieurs architectures d'alkanethiols mixtes ou pures utilisées pour l'élaboration de biointerfaces sur Arséniure de Gallium. Les monocouches mixtes MHDA/MUDO et MHDA/DDT ont été choisies pour améliorer la couverture de protéines/biorécepteurs sur la surface, et rendre plus accessible les groupes COOH pour l'immobilisation de ces protéines tout en limitant les adsorptions non-spécifiques. Une architecture pure à base de thiols à chaîne PEG et à terminaison biotine a également été étudiée.

La formation de couches mixtes a été étudiée par des mesures de tension de surface et par des caractérisations FTIR en transmission. Ces caractérisations ont pu mettre en évidence la prévalence des molécules DDT lors de la formation des SAMs mixtes MHDA/DDT. Ceci rend presque inutilisable cette architecture pour le greffage covalent d'anticorps. Nous nous sommes donc focalisés sur l'étude des monocouches MHDA/MUDO et sur leur cinétique de formation, par adsorption simultanée et par remplacement de thiols. Nous

avons pu déterminer approximativement les proportions surfaciques de ces composés et estimer comment évoluent la densité de surface de ces molécules et leur conformation en fonction des proportions en solution. L'analyse des SAMs hétérogènes MHDA/MUDO par mesure FTIR des vibrations $\nu\text{CH}_2^{\text{as}}$ a révélé une modification du comportement d'auto-assemblage pour un rapport de 50% entre le MHDA et le MUDO. Cela a pu être expliqué partiellement par une organisation de la SAM en deux phases combinées avec un phénomène de substitution des molécules entre elles. Nous avons observé les cinétiques de remplacement de ces deux composés sur GaAs, montrant une nouvelle procédure de formation d'architectures mixtes avec un meilleur contrôle des proportions.

Nous avons mis en évidence l'effet de la polarité du solvant sur la densité de la couche de SAM obtenue en utilisant des mélanges eau DI / éthanol. Cette étude a révélé l'impact de la longueur de la chaîne et du groupe terminal sur le processus d'auto-assemblage. Les monocouches les plus denses ont été obtenues avec un rapport eau/éthanol de 33% en volume donnant une densité de thiol doublée. Enfin le taux de greffage des biorécepteurs (anticorps) a été analysé par les techniques FTIR et SDL. En conclusion, nous pouvons affirmer que l'interface composée de PEG-biotin semble celle qui permet le greffage d'une couche plus dense de protéines, d'après les caractérisations FTIR, juste devant les couches mixtes composées de 10 % de MHDA et 90% de MUDO.

Ces résultats sur l'optimisation et l'étude des SAMs sont essentiels pour l'élaboration de biointerfaces stables dans le temps (densification des SAMs, meilleure conformation), rendant sensible (meilleur greffage) et spécifique (limitation des absorptions non-spécifiques) notre biocapteur en GaAs.

CHAPITRE 4 Régénération de la biointerface

4.1 Introduction

Nous avons vu dans le chapitre précédent la réalisation de la biointerface immunologique sur substrat de GaAs constituée d'une interface chimique (SAM de thiols) permettant l'immobilisation de récepteurs biologiques (anticorps). De par l'émergence du GaAs dans le domaine des biocapteurs^{65,66,68,197,270-272}, il est d'une importance cruciale de caractériser finement les interfaces biospécifiques sur ce matériau. En effet, nous avons pu voir dans le chapitre précédent comment optimiser et maîtriser la formation des fonctionnalisations chimiques et biochimiques du GaAs. C'est celle-ci qui permettra le suivi d'évènements de biorecognition et donc la détection et le dosage sensible et spécifique d'analytes en milieu biologique.

Hormis quelques biocapteurs onéreux utilisés en laboratoire de recherche ou d'analyse, seuls les moins chers seront compétitifs pour pénétrer des marchés plus larges. Le coût des biocapteurs est essentiellement dû à la nature de l'instrumentation requise pour son fonctionnement ainsi qu'à l'utilisation de matériaux ou réactifs de haute qualité pour sa fabrication. Ces dernières années ont vu un regain d'intérêt pour la conception de dispositifs jetables²⁷³ par l'utilisation de matériaux à bas coût tel que le PDMS²⁷⁴, le papier de cellulose²⁷⁵ ou en utilisant des techniques de fabrication bon-marché telles que l'impression de polymères (« polymer ink-jet printing »)²⁷⁶. Ces dispositifs vont se révéler très utiles notamment pour des applications médicales où les risques de contamination croisée sont importants²⁷³. Cependant, les capteurs jetables ne sont pas nécessairement adaptés à tous les types d'analyses notamment à cause de leur faible reproductibilité entre dispositifs. Dans notre cas, nous utilisons un transducteur composé d'arséniure de gallium, qui a été structuré par des techniques de microfabrication (chapitre 2). Les coûts associés au matériau GaAs et à la fabrication du transducteur ne peuvent pas être écartés et dans cette situation la régénération du dispositif reste l'unique moyen de réduire le coût d'utilisation du système. La réduction du prix d'un biocapteur est cruciale lorsque l'on considère que le développement de ces outils est destiné à la sécurité alimentaire^{277,278}, l'assainissement de l'eau²⁷⁹, la détection de pathogènes dans l'environnement²⁸⁰, ou encore dans le domaine de la santé pour réaliser des diagnostics précoces de maladie à haut taux de mortalité^{281,282}. Pour beaucoup de capteurs, les écarts de reproductibilité et de sensibilité

d'un dispositif à un autre peuvent être un frein à la commercialisation. La régénération permet donc de s'acquitter de ces problèmes à condition qu'elle n'affecte pas les propriétés de détection du transducteur. Par exemple, les techniques de régénération de la biointerface doivent à tout prix préserver la morphologie et la structure du matériau support.

Ces dernières années, la tendance est au développement d'outils multi-analyses, constitués de réseaux de capteurs. L'analyse multiplexée de plusieurs biomarqueurs²⁸¹ (dans le cas d'un diagnostic de maladie) ou de plusieurs pathogènes dans une analyse environnementale ou alimentaire²⁷⁷ permet de fournir plus d'informations ou de certitudes dans la détection. La régénération de réseaux de capteurs peut se révéler comme un défi mais permettra à terme de rendre le prix de ce type de systèmes moins prohibitif qu'il ne l'est actuellement et de lever la barrière à leur commercialisation.

Il n'y a pas de méthode simple pour la régénération de biointerfaces, tout dépendra de la constitution de celles-ci : quels types de récepteurs ont été utilisés (enzymes, immuno-récepteurs, ADN, aptamères...) et quelle technique d'immobilisation a été employée (couplage covalent, adsorption, piégeage...). Dans nos travaux, nous avons sélectionné une détection par immuno-capture avec des anticorps immobilisés covalamment sur le substrat par une architecture à base de SAM d'alkanethiols. On peut définir deux catégories de régénération, l'une agissant uniquement sur le couple récepteur/analyte, l'autre sur l'architecture permettant l'immobilisation du récepteur sur le capteur. La seconde permet de retrouver une surface nue, telle qu'elle était à son origine (avant biofonctionnalisation). Nous verrons ainsi les techniques employées pour chaque catégorie.

Les résultats présentés dans la partie 4.3 de ce chapitre, sur la régénération par voie chimique, ont été publiés dans la revue *Biointerphase*²⁸³.

4.2 Matériel et méthode de caractérisation de surface

4.2.1 Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique d'imagerie à balayage permettant de générer des profils topographiques d'une surface, et de cartographier les interactions entre une pointe extrêmement fine et une surface. L'AFM est constituée d'un levier souple supportant la pointe qui se déplace à l'aide d'un système piezoélectrique. La torsion et la déflexion du levier sont mesurées par un laser focalisé sur l'extrémité du

levier et se réfléchissant sur une photodiode à quadrants. La force d'interaction pointe-surface se déduit de la déflexion du levier par la loi de Hooke. Les variations sont compensées par l'asservissement en position de l'actionneur piézoélectrique afin de conserver une force constante lors du balayage. Les surfaces dégradables ou molles (par exemple, les matières biologiques), sont généralement mesurées à l'aide de modes oscillants (allant des modes à contact intermittent aux modes sans contact).

Dans notre cas, les états de surface des échantillons régénérés seront étudiés par AFM sur le système Nanoscope III (Digital Instruments Nanoscope III) opérant en mode « tapping » (contact intermittent). Nous utiliserons une pointe en silicium monocristallin gravé et constitué d'une poutre rectangulaire TESP (Digital Instruments) pour scanner la surface. La pointe TESP utilisée a un rayon de courbure d'environ 5-20nm, la constante de raideur de la poutre est de 20-100 N/m et sa fréquence de résonance est dans la gamme 200-400 kHz. La rapidité de scan a été fixée à 1.97 Hz sur une région $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ ou $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ avec 512 points par ligne. A partir de ces caractérisations, nous chercherons à comparer les propriétés de rugosité et d'état de surface, avant et après, régénération. Les mesures de rugosité ont été effectuées en utilisant les paramètres rapportés dans la littérature²⁸⁴.

4.2.2 Spectrométrie photoélectronique X

La spectrométrie photoélectronique X (ou X-ray photo-electron spectroscopy, XPS) est une technique spectroscopique quantitative qui permet la mesure de la composition en éléments chimiques d'un matériau. La surface du matériau est irradiée par des rayons X qui ionisent les atomes la composant par effet photoélectrique. Le photon interagit avec la couche électronique de valence en éjectant un de ces électrons.

Les spectres XPS montrent le nombre d'électrons (intensité) en fonction de leur énergie de liaison. Les énergies de liaisons sont dépendantes également de l'orbitale électronique de l'électron éjecté. Ainsi les pics obtenus sur le spectre XPS correspondent non seulement à un atome spécifique mais leur position varie selon la nature des liaisons qu'il a avec les atomes voisins. Les intensités de photoélectrons sont proportionnelles à la concentration de l'élément dont il est éjecté. En normalisant le nombre d'électrons de chaque type détecté par un certain facteur de sensibilité, il est possible d'obtenir les rapports relatifs entre chaque atome et donc d'obtenir la composition chimique de l'échantillon étudié. La mesure XPS détecte tous les éléments excepté l'hydrogène et l'hélium. Les rayons X sont

capables de pénétrer la surface de l'échantillon sur plusieurs micromètres mais seule une fraction d'électrons à proximité de la surface (~ 10 nm) a suffisamment d'énergie pour être éjectée sans être diffusée²⁸⁵. La profondeur de mesure (d) de la spectrométrie XPS est dépendante du libre parcours moyen inélastique des photoélectrons de chaque élément (λ) et de l'angle d'émission du rayon X (θ) :

$$d = 3 \lambda \cos(\theta) \quad (4.1)$$

Nous souhaitons mettre en évidence avec cette méthode la désorption des atomes de sulfure de la monocouche d'alkanethiols sur le GaAs ainsi que la formation d'oxydes en surface. Les mesures sur les échantillons de GaAs régénérés ont été réalisées avec le système AXIS Ultra DLD (Kratos Analytical) équipé d'une source monochromatique Al K α (1486.6eV) et d'un compartiment sous vide pouvant atteindre une pression de 10^{-9} Torr. Les balayages de survol (« survey scans ») et les balayages à haute résolution sont collectés avec une énergie de passage de respectivement 50 et 20 eV. Les balayages de survol sont réalisés à basse résolution pour avoir une vue d'ensemble du spectre des énergies de liaison. La surface d'analyse est d'environ $220\mu\text{m} \times 220\mu\text{m}$. Les mesures ont été effectuées avec un faisceau d'incidence 60° avec la normale²⁸⁶. Les résultats ont été traités puis analysés avec le logiciel CASA XPS 2.3.15. Les pics sont déterminés en effectuant la déconvolution par des fonctions gaussiennes de chaque composante du spectre. Les données XPS sont quantifiées en mesurant l'aire des pics pour chacune des composantes. Pour compenser les effets de charge de surface (dus au matériau non conducteur), les pics sont décalés en prenant comme référence l'énergie des chaînes d'hydrocarbures saturés (des contaminants présents en surface) à 285eV ²⁸⁷. Dans la région où les pics S 2p et Ga 3s se chevauchent, des pertes liées aux diffusions inélastiques des électrons dans le matériau génèrent des non-linéarités dans la ligne de base du spectre. Une méthode de correction, proposée par Marshall et al.²⁸⁶, consiste en la calibration du rapport d'intensité des pics Ga 3s et Ga 3d en utilisant une valeur mesurée sur une surface de référence de GaAs (sans SAM et désoxydée directement avant la mesure). Ceci permet d'estimer les pics associés à ces artefacts. Appliquée de façon systématique, cette méthode donnera une évaluation raisonnable des pics S 2p en partie chevauchés par les pics Ga 3s et les pertes par diffusion.

4.2.3 Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence est une technique de détection optique à marquage très utilisée dans le domaine de la biologie moléculaire et cellulaire. Elle nécessite l'utilisation d'une molécule ou d'une particule combinant un fluorophore attaché à une particule (microbille..) ou à une biomolécule (anticorps, antigène...). Les fluorophores possèdent la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (à une longueur d'onde d'excitation) et de la restituer rapidement ($<1\text{ns}$) sous forme de lumière fluorescente (à une longueur d'onde d'émission). La détection de cette lumière par l'intermédiaire d'un filtre dichroïque correspond au fluorophore utilisé. La technique permet de vérifier la présence de molécules/particules cibles et de les quantifier.

Dans ce chapitre, nous utiliserons la fluorescéine (ou FITC) comme fluorophore. Le système permettant de la visualiser est un microscope inversé à fluorescence (Olympus IX71) doté d'un filtre dichroïque FITC. L'acquisition est effectuée par une caméra noir et blanc. Nous utiliserons un objectif avec un grossissement $\times 4$ permettant l'acquisition d'images de 2.42mm de côté. De façon à couvrir la totalité des échantillons de $4 \times 4\text{mm}^2$, quatre images (sur chaque coin) sont enregistrées. Ces images sont alignées et fusionnées sous le logiciel Photoshop®. Après redimensionnement, les franges d'interférences générées par les réflexions entre la lame de verre support et l'échantillon sont supprimées dans le domaine de Fourier. Enfin un filtre numérique est appliqué pour ajouter les fausses couleurs à l'image.

4.2.4 Ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique permettant la caractérisation de surface par la mesure du changement d'état de polarisation de la lumière après réflexion sur le matériau (la polarisation devient elliptique). Grâce à cette technique, on peut déterminer l'indice optique ou l'épaisseur d'un matériau transparent ou semi-transparent déposé en couche mince ($< 30\ \mu\text{m}$) sur un substrat connu. Elle permet par conséquent la caractérisation de l'épaisseur et des propriétés optiques du matériau mais donne également des informations sur la composition chimique, la cristallinité, l'anisotropie ou l'uniformité de celui-ci.

L'état de polarisation de la lumière peut être décomposé en deux composantes σ et π , respectivement parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence (Figure 4.1). Après réflexion, ces composantes notées $R\sigma$ et $R\pi$, sont liées aux paramètres ellipsométriques Ψ

et Δ obtenus à partir de la mesure de la forme de l'ellipse. La relation entre ces paramètres est donnée par l'équation suivante :

$$\frac{R_s}{R_p} = \tan(\psi) e^{j\Delta} \quad (4.2)$$

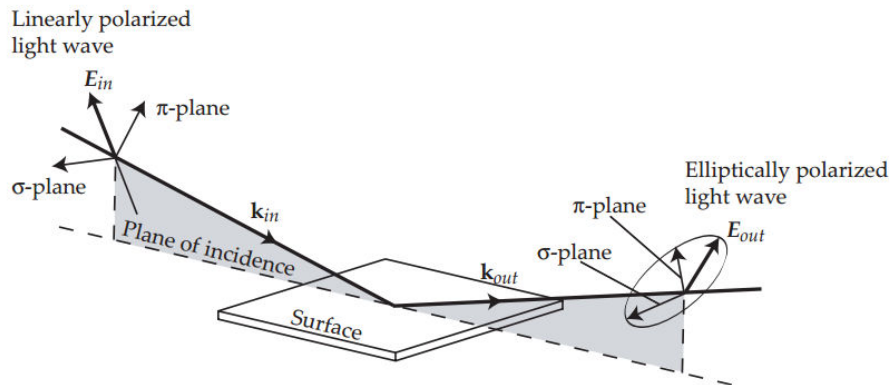


Figure 4.1 Principe de la technique d'ellipsométrie

La mesure d'épaisseur d'oxyde de GaAs a été effectuée par ellipsométrie. L'ellipsomètre est un Alpha-SE (J. A. Woollam CO., Inc) fonctionnant à une longueur d'onde de référence de 632.8nm avec un angle d'incidence d'environ 70°. Un algorithme détermine les propriétés de la couche mince en utilisant un modèle spécifiquement conçu pour la caractérisation de l'épaisseur d'oxyde sur GaAs.

4.2.5 Profilométrie

La profilométrie mesure des variations de hauteur à l'aide d'un stylet par balayage d'une surface. Le déplacement vertical du stylet provoqué par les rugosités de surface, les cavités ou bosses, est transformé en signal analogique par le biais d'une mesure accélérométrique. La profilométrie par contact peut mesurer des motifs verticaux de quelques nanomètres à plusieurs centaines de micromètres mais a une résolution latérale limitée par le diamètre de la pointe du stylet (5 à 25 μm).

Les mesures de profilométrie, dans cette partie, ont été réalisées à l'aide du profilomètre Dektak 150 (Veeco). La résolution verticale est donnée par le fabricant à 0.1nm pour une gamme de 6.5 μm et avec un stylet de diamètre 2.5 μm .

4.3 Régénération par voie chimique

4.3.1 Études des chimies de désorption

L'efficacité du procédé de désorption par voie humide sur SAM ou biointerface est contrôlée par l'analyse des pics de méthylène par analyse FTIR. Nous pouvons voir sur la Figure 4.2, le spectre IR d'une SAM de MHDA formée sur GaAs exposée au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 30%) pendant 5, 30 et 60 minutes à température ambiante.

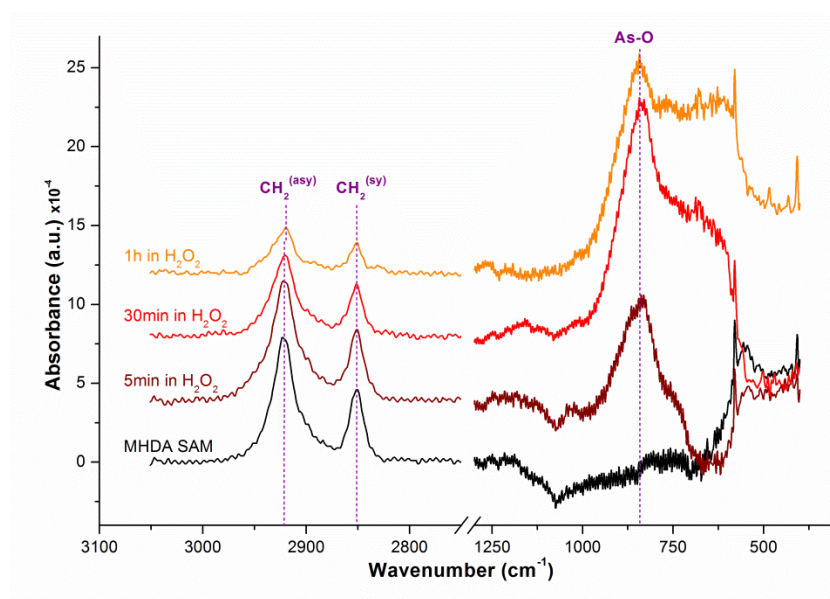


Figure 4.2 Spectre infrarouge des échantillons SAMs de MHDA sur GaAs (100). Effet du temps d'immersion dans une solution de peroxyde d'hydrogène

Les pics méthylène (pour rappel à environ 2850 cm^{-1} et 2921 cm^{-1} respectivement pour les vibrations symétriques et asymétriques en élongation des CH_2 de la chaîne alcane) voient leur intensité d'absorbance diminuée en fonction du temps d'immersion dans l' H_2O_2 . Cela signifie une diminution de la densité des molécules constituant la SAM. Jusqu'à 30 minutes d'immersion, on ne note aucun déplacement hypsochrome des vibrations CH_2 , ce qui montre qu'il n'y pas de modification significative de l'organisation de la SAM. Pour ces échantillons, nous pouvons observer l'apparition d'une bande à 842 cm^{-1} correspondant à la liaison As-O^{243} provenant de la formation d'oxydes sur la surface du GaAs. Nous pouvons relier la diminution de l'absorbance des CH_2 avec l'augmentation de celle des As-O en fonction du temps d'immersion dans le peroxyde d'hydrogène ce qui suggère une substitution des thiols par les oxydes d'arsenic ou de gallium. D'après la tendance de la courbe d'absorbance, on peut prédire le remplacement total de cette monocouche après

environ 2h d'immersion. La réaction de désorption est décrite par l'oxydation des alkanethiols et la formation de sulfonates avec les radicaux oxygènes ou hydroxyles produits essentiellement par la décomposition du H_2O_2 . Les oxydes GaO_x/AsO_y sont ainsi formés sur la surface du GaAs par la réaction de l'agent oxydant. Les sulfonates peuvent ensuite être facilement retirés de la surface par rinçage avec un solvant organique, dans ce cas de l'éthanol absolu.

La Figure 4.3 montre le rapport d'intensité du pic CH_2 asymétrique en élongation entre l'échantillon traité et l'échantillon non-traité en fonction du temps d'immersion dans les solutions à base d' HCl , NH_4OH , H_2O_2 et NH_4OH/H_2O_2 . Pour les échantillons immergés dans les solutions d'acide ou de base, nous pouvons observer une diminution systématique de l'absorbance du pic ce qui révèle le retrait ou clivage des alkanethiols en surface. Cependant, dans ces solutions, les SAMs ne sont pas complètement régénérées, même après 30 minutes d'immersion. Les SAMs d'alkanethiols sont connues pour leur résistance et la protection contre les corrosifs qu'elles apportent aux matériaux sur lesquels elles se sont formées^{98,100,288}. Les SAMs sont même parfois utilisées en tant que masque de gravure humide²⁸⁹ ou à faisceau d'électrons²⁹⁰. Tel que l'ont reporté Ma et al, les défauts d'organisation locaux facilitent la pénétration des solutions corrosives causant le retrait des thiols et la corrosion du substrat sous-jacent²⁸⁸. L'autre partie de la surface encore protégée par les alkanethiols peut rester stable sur une longue durée même en présence de forts agents corrosifs. Les terminaisons hydrophiles des molécules de MHDA peuvent être clivées aisément²⁹¹ mais la chaîne alcane va se comporter comme une forte barrière hydrophobe. Nos résultats de gravure par HCl , NH_4OH et $NH_4OH : H_2O$ présentés dans la Figure 4.3 vont dans ce sens puisqu'on observe une rapide diminution de l'intensité des pics d'absorbances suivie d'une stabilisation après plusieurs minutes d'immersion. Nous pouvons observer un comportement différent pour l'exposition à l' H_2O_2 , la solution oxyde lentement la surface, et après 1h d'immersion, 35% de l'intensité du pic initial est atteint. Il convient donc d'utiliser des solutions plus agressives pour retirer complètement la SAM de la surface de GaAs. Le mécanisme de gravure humide du GaAs comporte deux éléments : un oxydant permettant de former des oxydes de Ga et d'As en surface du matériau et une attaque chimique pour dissoudre ces oxydes¹¹⁵. Les taux de gravure et l'état de surface obtenu dépendent de nombreux paramètres tels que l'orientation cristalline du GaAs, la composition des bains de gravure et leur température²⁰⁰. Le bain de gravure employé dans ces travaux est composé de H_2O_2 et de NH_4OH . Baca et al. ont reporté qu'un ratio 3:1:1 de

$\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ permet d'obtenir une gravure suivant les plans cristallographiques donnant un état de surface relativement lisse à température ambiante¹¹⁵. Les solutions à base de $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2$ sont largement utilisées pour le nettoyage de surface ou la gravure de substrat de Si ou de GaAs^{292,293}. Nous avons utilisé quatre différentes dilutions afin d'étudier la régénération des surfaces de GaAs, trois d'entre elles permettent d'enlever la totalité de la SAM en moins de 30s (dilution par 1, 10 et 50) et la dernière (dilution par 100) permet de le faire après 2 min d'immersion (Figure 4.3). Les taux de gravure à température ambiante pour trois dilutions différentes (par 10, 50 et 100), ont été évalués par mesure profilométrique sur trois temps d'immersion (15, 60 et 90min). Les taux de gravure pour ces trois dilutions sont reportés dans le Tableau 4.1, nous pouvons voir que ce taux reste relativement élevé même pour la dilution par 100. Nous ciblons une gravure inférieure à 50nm de façon à économiser autant que possible le substrat et à ne pas affecter le renouvellement de la biointerface par une modification trop importante de la topographie de la surface. Avec un taux de gravure $127\pm 3\text{nm}/\text{min}$, la dilution par 100 semble convenir à l'échelle de profondeur souhaitée. Nous pouvons en conclure que la solution de $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ (3:1:100) offre des perspectives intéressantes pour la régénération des SAMs ou biointerfaces sur GaAs sans pour autant "sur"-graver le matériau.

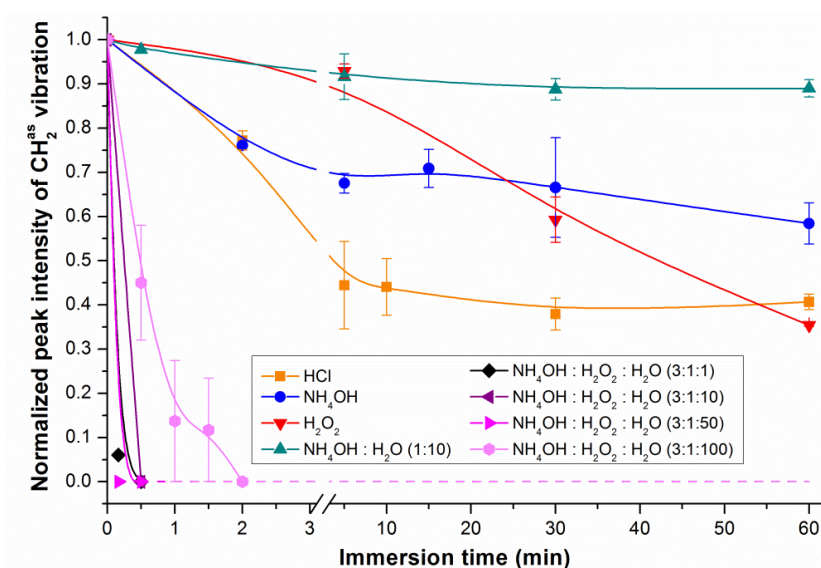


Figure 4.3 Efficacité dans le retrait de la SAM de MHDA sur GaAs(100) (visualisé par l'absorbance du pic de CH_2^{AS}) en fonction du temps d'immersion dans les différentes solutions

Rapport NH₄OH:H₂O₂:H₂O	3:1:10	3:1:50	3:1:100
Taux de gravure (nm/min)	940 ± 46	377 ± 6	127 ± 3

Tableau 4.1 : Taux de gravure du GaAs(100) pour trois dilutions de la solution NH₄OH : H₂O₂

4.3.2 Efficacité de la régénération de la biointerface

Afin de valider le processus de régénération de la biointerface par voie chimique, nous avons mesuré le spectre IR après chacun des traitements : fonctionnalisation chimique, immobilisation des anticorps, retrait chimique de la biointerface et enfin re-fonctionnalisation (Figure 4.4). Nous pouvons voir sur la Figure 4.4, après l'étape d'activation au NHS/EDC, apparaît le pic correspondant à la vibration C=O à 1741 cm⁻¹ indiquant la présence de l'ester de NHS²⁹⁴ (NHS qui contient deux liaisons C=O). La présence d'anticorps immobilisés sur le substrat est illustrée par les bandes amide A, I et II situées respectivement aux régions à 3300, 1660 et 1520 cm⁻¹ correspondant à la signature infrarouge rapportée dans la littérature²⁶⁷. Les éléments du spectre IR correspondants aux liaisons amides et méthylènes de la chaîne carbonée des thiols disparaissent après 2 min de gravure avec une solution de NH₄OH:H₂O₂:H₂O (3:1:100). La couche superficielle GaAs-MHDA a été chimiquement attaquée par la solution de gravure produisant un retrait efficace des protéines et thiols immobilisés sur le substrat. Après nettoyage du GaAs, une nouvelle monocouche de MHDA a été re-fonctionnalisée sur cette même surface. Sa caractérisation montre que la couche ainsi réorganisée présente des caractéristiques conformationnelles similaires à la monocouche originelle. En effet les vibrations CH₂^{asy} et CH₂^{sy} sont respectivement positionnées à 2923.1 cm⁻¹ et 2853.0 cm⁻¹ tandis que celles de la couche initiale sont situées à 2922.8 cm⁻¹ et 2853.4 cm⁻¹ respectivement. Cependant, nous pouvons observer une augmentation de l'intensité de ces pics sur la monocouche ré-assemblée, par exemple pour le pic CH₂^{asy}, l'absorbance est passée de [8.81 ± 0.6] x 10⁻⁴ à [9.28 ± 0.2] x 10⁻⁴ (unité arbitraire). Cette différence semble être liée à l'augmentation du nombre de molécules immobilisées sur une surface légèrement plus rugueuse. En effet, nous avons effectué des mesures AFM des surfaces avant et après traitements chimiques et évalué la rugosité RMS (« root mean square ») avant et après la régénération du GaAs(100).

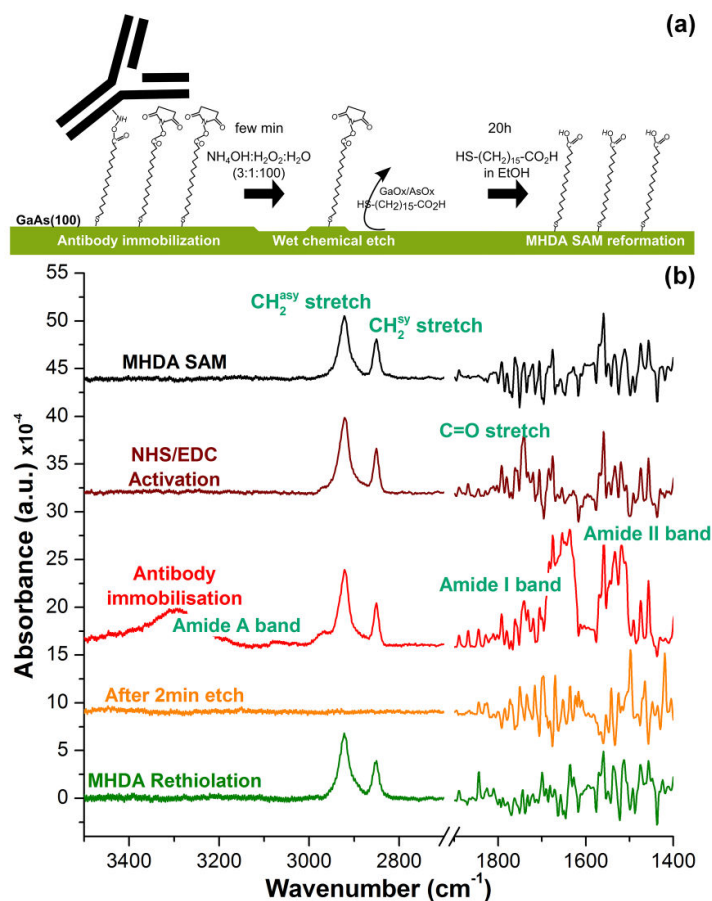


Figure 4.4 (a) Schéma montrant la fonctionnalisation puis l'immobilisation d'anticorps, la régénération par gravure humide et la re-thiolation avec une nouvelle SAM de MHDA et (b) spectres FTIR montrant les vibrations en élongation des CH₂ et des bandes amides aux différentes étapes de la régénération de la biointerface

Les données AFM ont été collectées sur deux échantillons fonctionnalisés pour les deux cas de figure (avant et après régénération). Sur chacun des échantillons, quatre zones ont été balayées : deux images à 5µm x 5µm et deux autres images à 10µm x 10µm. La Figure 4.5 montre les exemples des images AFM avec σ_{RMS} de 0.38nm et 2.76nm caractérisant respectivement des surfaces fonctionnalisées avant et après gravure. Par conséquent, la valeur σ_{RMS} est moyennée sur huit images.

Nous avons observé une augmentation de la rugosité qui est passée de $[0.41 \pm 0.03]$ nm sur les surfaces avec la première monocouche à $[2.84 \pm 0.11]$ nm sur les surfaces avec la monocouche ré-assemblée après les 2 minutes de gravure chimique. Nos résultats FTIR contredisent l'attente selon laquelle une SAM formée sur une surface plus rugueuse pourrait être de moindre qualité (moins organisée). Conformément à l'argument selon lequel les nanostructures ainsi formées sur GaAs (100) après gravure sont de dimension

considérable devant la taille de celles composant la SAM initialement¹¹², elles participent à la formation d'une SAM de haute-qualité grâce à la forte interaction thiol-thiol. La conséquence d'une surface légèrement rugueuse procure au biocapteur de meilleures conditions de greffage de protéines dû à l'augmentation de la surface disponible pour leur immobilisation²⁰⁰. Cette optimisation de densité ne peut avoir lieu que si les dimensions des protéines sont plus petites que la taille des vallées présentes sur la surface rugueuse. La largeur des vallées est de l'ordre de 134 ± 78 nm, ce qui est grand en comparaison des dimensions moyennes d'un anticorps (10 à 20nm)¹¹⁸. Il aurait été possible que la procédure de gravure puisse être affectée par la présence d'îlots de SAM restant, typiquement 10nm en largeur, connus pour se former pendant la thiolation du GaAs^{106,295}. Cependant, le protocole standard appliqué à la plupart des échantillons préparés dans ces travaux consiste en une immersion de 20h dans la solution de thiols, alors que la couverture de ces îlots tend à saturer dans les 10-15h d'immersion²³⁸. Nous ne nous attendions pas à ce que la procédure de gravure soit impactée par la présence éventuelle de ces îlots. Les images AFM ne montrent d'ailleurs aucune inhomogénéité de SAMs à l'échelle de mesure. Nous pouvons en conclure que la procédure de refonctionnalisation rapportée dans ce travail a le potentiel d'offrir de bonnes conditions pour l'immobilisation d'un nombre plus élevé d'anticorps.

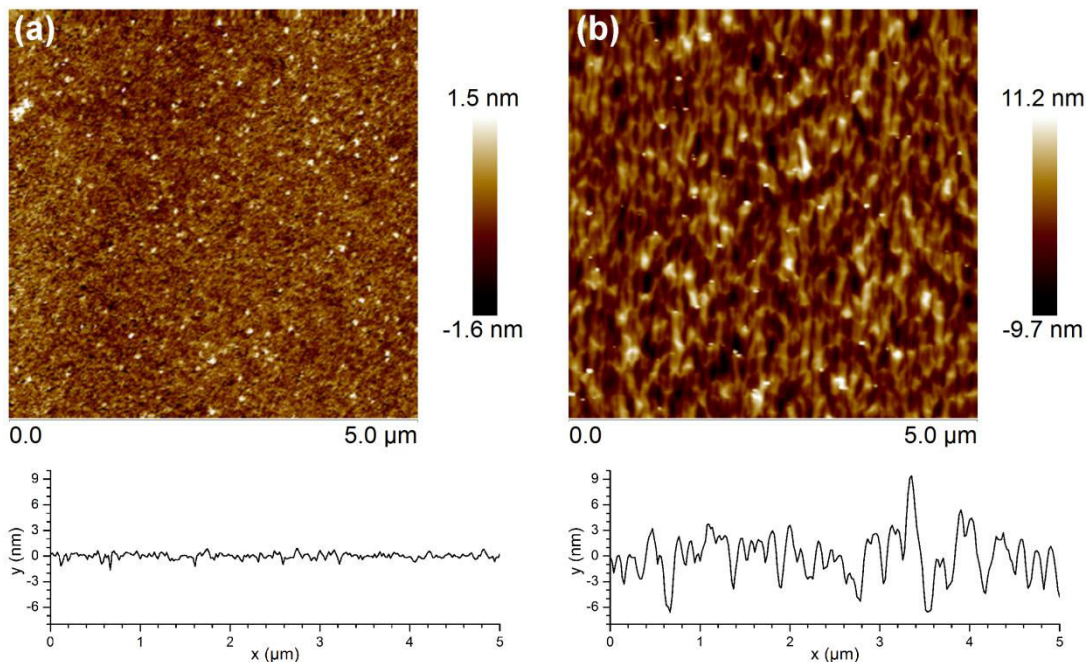


Figure 4.5 Exemples d'images AFM de la surface de GaAs(100) (a) initialement fonctionnalisée avec une SAM de MHDA et (b) refonctionnalisée avec une seconde SAM de MHDA après 2min de gravure dans une solution de 3 NH₄OH : 1 H₂O₂ : 100 H₂O

4.4 Photo-oxydation UV : principe et stratégies

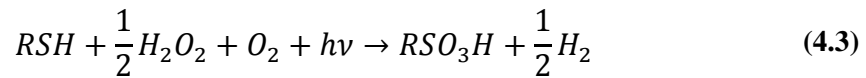
4.4.1 Principe de la photo-oxydation

L'exposition de SAMs d'alkanethiols aux ultraviolets entraîne la formation d'alkanesulfonates (RSO_3^-) qui peuvent facilement être rincés par un solvant polaire comme l'éthanol alors que les SAMs d'alkanethiol non-oxydées sont stables plusieurs jours dans ces mêmes solvants⁹¹. Le photo-patterning de SAM d'alkanethiols, c'est-à-dire la génération de motifs sur la monocouche, basé sur ce principe a donc été reporté par de nombreux groupes^{148,296,297}.

Les phénomènes de photo-oxydation par UV (ou UVPO) et de photo-patterning de SAMs ont été caractérisés par de nombreuses techniques telles que la spectroscopie Raman exaltée par effet de surface (« Surface-enhanced Raman spectroscopy » ou SERS)^{143,298}, par SIMS^{148,149,162,163,296,297,299}, SPR³⁰⁰, spectroscopie IR³⁰⁰ et par XPS^{163,164,296}. Sous exposition à une source UV, les alkanethiols adsorbés sur un substrat métallique s'oxydent pour former des alkylsulfonates^{161-163,299}. La nature du phénomène de photo-oxydation est encore sujette à controverse entre ozonolyse (par photolyse de l'O_2)^{298,300,301}, formation de radicaux oxygènes¹⁶² ou d'électrons « chauds » à proximité de la surface¹⁶¹. Cependant, il a été démontré plus récemment que la photo-oxydation peut être réalisée sans présence d'ozone, ce qui indique que ce dernier n'est pas une condition essentielle à la génération de ce phénomène^{139,161}.

La difficulté de déterminer la source de l'oxydation, rend le procédé compliqué à contrôler et à reproduire selon les conditions environnementales de l'exposition. Il est possible d'avoir un contrôle plus rigoureux sur les proportions des réactifs responsables de l'oxydation des alkanethiols en milieu liquide. Johnson et al. ont notamment montré la possibilité de réaliser la photo-oxydation des 6-mercapto-1-hexanol (MCH) en milieu aqueux en présence de peroxyde d'hydrogène¹³⁹. Le peroxyde d'hydrogène se photolyse sous irradiation UV ($h\nu$) générant deux radicaux hydroxyle (OH^*) pour une molécule de H_2O_2 . Ces espèces réactives vont oxyder les thiols en oxyde de sulfure qui comme énoncé précédemment auront une faible adhésion avec le substrat et pourront facilement être rincés avec un solvant polaire.

La réaction complète de l'UVPO-liquide sur des alkanethiols formés sur substrat or est la suivante¹³⁹ :



La nature du groupe terminal des alkanethiols a un impact sur le taux de photooxydation du substrat. Selon Cooper et al. le facteur de photo-oxydation (toujours sur or) est doublé pour les terminaisons hydroxyle par rapport aux terminaisons carboxyle tandis qu'il est quadruplé pour les terminaisons méthyle¹⁶². Pour expliquer ce phénomène, le même auteur suggère que les interactions intermoléculaires entre les groupes terminaux peuvent contribuer à la stabilisation de la SAM¹⁶². En effet, comme nous avons pu le voir dans la partie 3.7.1, la stabilité de la SAM peut être expliquée par la présence de groupes terminaux capables de former des liaisons hydrogènes. Les liaisons hydrogènes des terminaisons carboxyle confèrent, par exemple, une meilleure stabilisation de la SAM que celles procurées par les groupes hydroxyle. La longueur de la chaîne carbonée a également un impact sur ce phénomène¹⁶⁴. D'après Cooper¹⁶², la vitesse de photo-oxydation est divisée par 4 pour une longueur de chaîne augmentée de 8 méthylènes. Les SAMs à chaîne longue ont une structure plus organisée ce qui rend difficile la pénétration des espèces réactives de l'oxygène à travers la monocouche¹⁶⁴ et donc l'oxydation de l'interface S-GaAs (Figure 4.6). Pour les longues chaînes, la photo-oxydation va se limiter dans un premier temps aux défauts d'organisation localisés plus spécifiquement aux bordures des micro-domaines ou aux autres discontinuités du substrat (Figure 4.6).

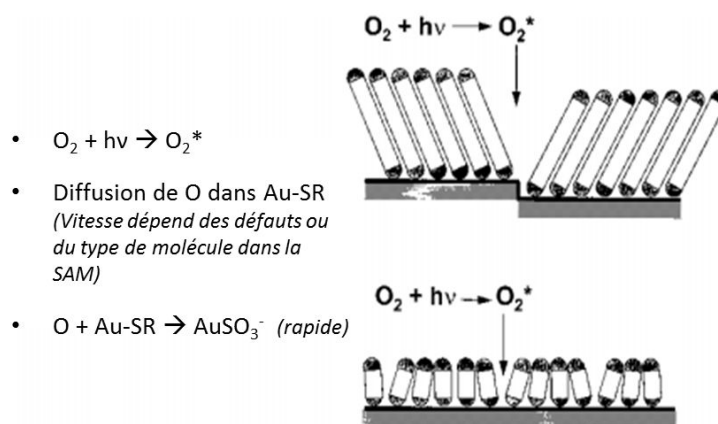
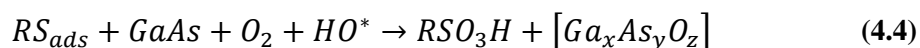


Figure 4.6 Représentation schématique illustrant l'impact des défauts de cristallinité dans le processus de photo-oxydation UV des SAMs sur substrat or et l'influence des longueurs de chaînes alkyles¹⁶²

La particularité du GaAs est qu'il s'oxyde également en présence de dérivé réactif de l'oxygène (DRO) et lorsqu'il est exposé à la lumière visible ou UV²⁸⁰. Les SAMs d'alkanethiols sur GaAs s'oxydent aussi pour former des alkylsulfonates, tout comme sur substrat or, mais il a été rapporté que ces molécules peuvent former sur GaAs des alkylsulfates¹⁴⁹. La vitesse de photo-oxydation des SAMs semble toutefois plus rapide sur GaAs que sur substrat métallique¹⁴⁹. En effet, nous avons vu dans le chapitre 1, que les thiols s'adsorbent selon la maille cristalline à la surface du matériau causant une organisation particulière et moins dense que sur substrat d'or¹¹². En quelques sortes, les défauts de cristallinité de la SAM vont favoriser une photo-oxydation plus rapide. L'équation (non-équilibrée) de réaction des surfaces thiols-GaAs avec les espèces oxygène est la suivante :



Les techniques de « photo-patterning » de SAM emploient le principe de photo-oxydation et appliquent ces effets sur une partie du substrat seulement via l'utilisation d'un masque lors de l'exposition. À la différence de l'or, il est nécessaire de procéder à une désoxydation du substrat de GaAs de manière à enlever la couche d'oxyde, et simultanément, les thiols restants.

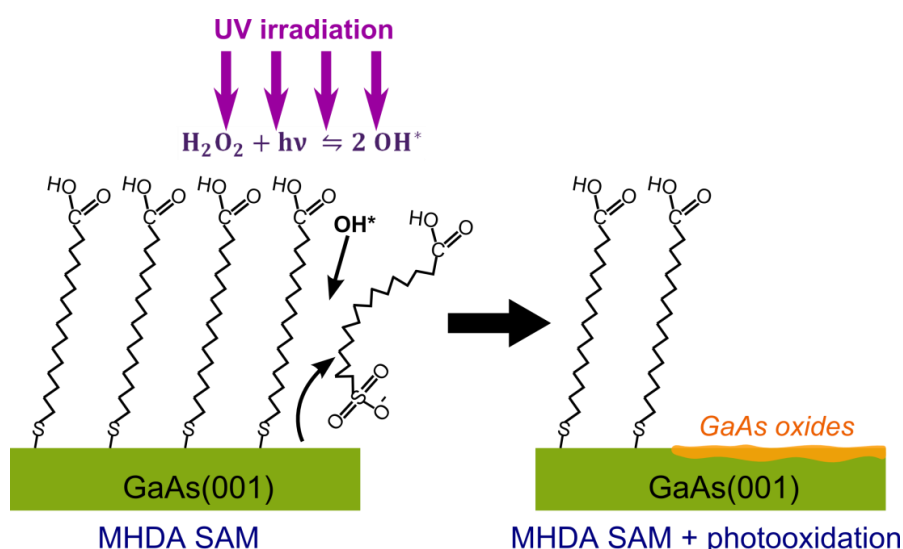


Figure 4.7 Principe de photo-oxydation UV d'une SAM de MHDA formée sur GaAs (100)

4.4.2 Stratégie de régénération UV

La plupart des auteurs travaillant sur la photo-oxydation sur or ou sur GaAs utilisent comme source UV, des lampes à mercure^{139,150,161} avec des gammes en longueur d'onde variées couvrant l'UV-C à l'UV-A. Johnson et al., par exemple, réalisent une photo-oxydation sur substrat or avec une lampe dont les bandes d'émission maximales sont à 185nm et 254nm et une densité d'énergie de 3.2mW/cm² à 1 pouce de distance¹³⁹. La bande d'émission maximale de la lampe utilisée par Brewer et al. est à 254nm également¹⁶¹. Selon son hypothèse, la photo-oxydation est provoquée par la formation d'électrons « chauds » en surface à cette longueur d'onde. Sur GaAs, il semblerait que Zhou et al. utilisent une lampe de 500W émettant plus particulièrement dans le proche UV (UV-B et UV-A essentiellement)¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

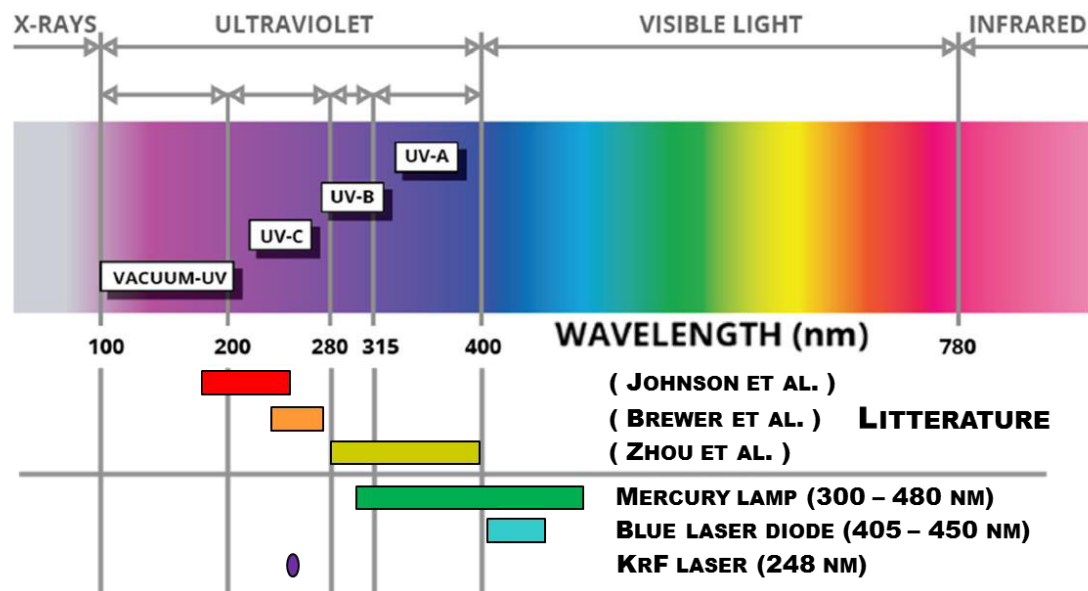


Figure 4.8: Positionnement fréquentiel des sources lumineuses utilisées dans le cadre de ma thèse, par rapport à celles utilisées dans la littérature

Dans notre cas, nous avons trois possibilités concernant la source UV (visible-UV) :

- **Une lampe à mercure** utilisée dans un aligneur de masques (Optical Associates Inc., modèle 200) pour les procédés de photolithographie en salle blanche. L'étendue de sa gamme d'émission est de 300 à 480 nm, avec une bande d'émission maximale à 365nm avec 6.5mW/cm² de densité de puissance (Tableau 4.2). La lampe est située à environ 10 cm du porte échantillon et le temps d'exposition peut être réglé manuellement sur l'aligneur.

Longueur d'onde (nm)	Densité de puissance (mW/cm ²)
300 – 350	1.7
350 – 380	6.5
380 – 420	4.7
420 – 480	4.1

Tableau 4.2 : Intensité d'émission de la lampe à mercure pour les différentes gammes de longueur d'onde

- Une diode laser bleu/violet émettant plus particulièrement dans le visible entre 405 et 450 nm avec une puissance de 100mW. La taille de faisceau est de l'ordre de 8x4mm² mais l'ajout d'une lentille va permettre d'avoir une surface au point focal de la moitié d'un échantillon de 4x4mm² (4x2mm²). La diode laser nécessite d'être stoppée toutes les 10min au moins 1min pour ne pas l'endommager. Un microcontrôleur est utilisé pour contrôler le temps d'arrêt sur de longues durées d'exposition. La puissance est quant à elle, réglée en ajustant la tension d'alimentation de la diode (Figure 4.9a).

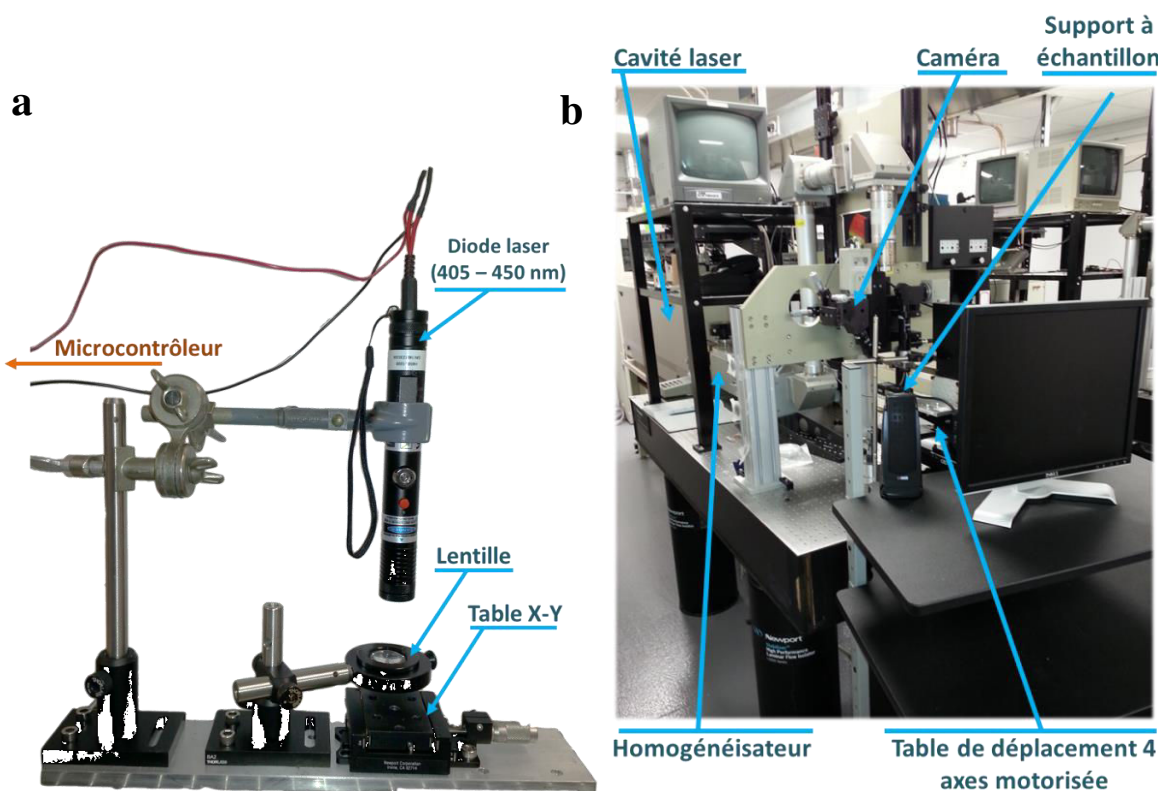


Figure 4.9: Montage (a) de la diode laser (405-450nm) avec lentille et table de déplacement et (b) laser excimer KrF (248nm). (L'aligneur n'est pas représenté ici)

- **Un laser excimer industriel KrF à 248nm** (Lumonics, Pulse master 848) pulsé à 2 Hz équipé d'un homogénéisateur optique (Figure 4.9b). Ce dernier est constitué d'une double micro-lentille « fly eye's array » utilisée pour uniformiser l'intensité du faisceau sur une surface de 15 mm x 11 mm. Un module avec possibilité d'ajouter un masque de projection est inclu au centre du champ de l'homogénéisateur ; il permet de projeter le motif sur l'échantillon avec un rapport de démagnification de 1.8. Le positionnement de l'échantillon est effectué par une table de déplacement X-Y-Z (MBX JPSA Sercel, Manchester, NH). Il est contrôlé par une interface PC et par une caméra d'inspection permettant l'alignement du faisceau laser avec l'échantillon. La calibration de la densité d'énergie est effectuée en mesurant l'énergie du laser avec un masque de dimensions connues (trou de diamètre 2.42mm).

Les gammes d'émission des trois sources sont comparées individuellement avec les gammes des sources employées dans la littérature par Johnson et al.¹³⁹, Brewer et al.¹⁶¹ et Zhou et al.²⁹⁹ (Figure 4.8). Nous pouvons voir, d'ores et déjà que si le mécanisme de photo-oxydation est, comme on pourrait le suggérer, dépendant de la longueur d'onde, alors seules les gammes couvrant les UV-C, B et éventuellement A seraient capables d'assurer ce phénomène. L'utilisation du laser émettant dans la gamme 405-450nm va nous permettre de vérifier si au-delà des UVs, il est possible de photo-oxyder les surfaces.

4.4.3 Méthodologie de mesure des surfaces photo-oxydées

Nous avons testé les trois sources pour photo-oxyder une SAM de MHDA formée sur un substrat de GaAs(100) dans l'éthanol et selon le protocole standard. Les expositions ont été effectuées en milieu aqueux (eau déionisée). Sur chaque échantillon, a été réalisée, par une pointe diamant, une marque (Figure 4.10) permettant de délimiter la partie exposée de celle non-exposée. Ceci permet de limiter les variations de reproductibilité et les erreurs d'interprétation. Les mesures FTIR réalisées dans ce chapitre ont toutes été effectuées en transmission avec le microscope *Hyperion 2000* couplé avec le spectromètre du *Vertex 70v* (chapitre 3). L'avantage de l'utilisation du microscope FTIR dans ce type de mesure est de pouvoir choisir avec précision la zone d'analyse : la zone exposée ou non-exposée. Pour

certaines caractérisations par FTIR (précisées dans le manuscrit), l'échantillon pourra être exposé sur seulement une face ou sur deux faces (Figure 4.10).

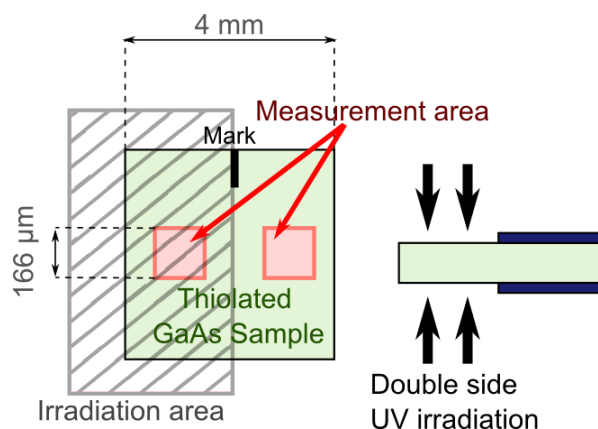


Figure 4.10 Zone d'exposition aux UVs et zones de mesure sur les échantillons de GaAs

Pour cette partie, la densité d'énergie du laser KrF a été fixée à $35\text{mJ}/\text{cm}^2$ pour 1000 impulsions. A partir des caractéristiques des sources UV et des paramètres utilisés pour l'exposition, nous évaluons le nombre de photons produit par chacune des sources, ces valeurs sont reportées dans le Tableau 4.3. Nous pouvons classer les sources par nombre de photons générés : $N_{\text{diode-laser}} > N_{\text{lampe-Hg}} > N_{\text{KrF}}$. Nous avons comparé l'efficacité de photo-oxydation des trois sources par une analyse FTIR. Sur la Figure 4.11, chaque groupement de spectres correspond à un seul échantillon, analysé soit sur sa partie exposée soit sur celle non-exposée. Nous pouvons voir que seul le laser KrF permet une modification significative de la signature spectrale de la zone exposée. On observe une diminution des pics CH_2 , et parallèlement, l'apparition de bandes liées à la formation d'oxyde sur la surface. Cet oxyde peut être enlevé de la surface en le gravant pendant 30s avec une solution de NH_4OH , le dernier spectre de la figure correspond à cette situation. En dépit d'un nombre plus élevé de photons, la diode laser et la lampe à mercure ne permettent pas d'établir une photo-oxydation de la SAM de MHDA en milieu aqueux. Les lampes à mercure utilisées dans la littérature pour ce type d'application (Figure 4.8) ont une gamme de fréquence plus lointaine dans l'UV (jusqu'aux UV-B). La longueur d'onde est de ce fait un facteur essentiel dans ce phénomène, et pour un effet optimal, il est nécessaire de privilégier les gammes UV-B ou inférieures. En définitive, nous restreindrons notre étude à la photo-oxydation par laser KrF en milieu liquide.

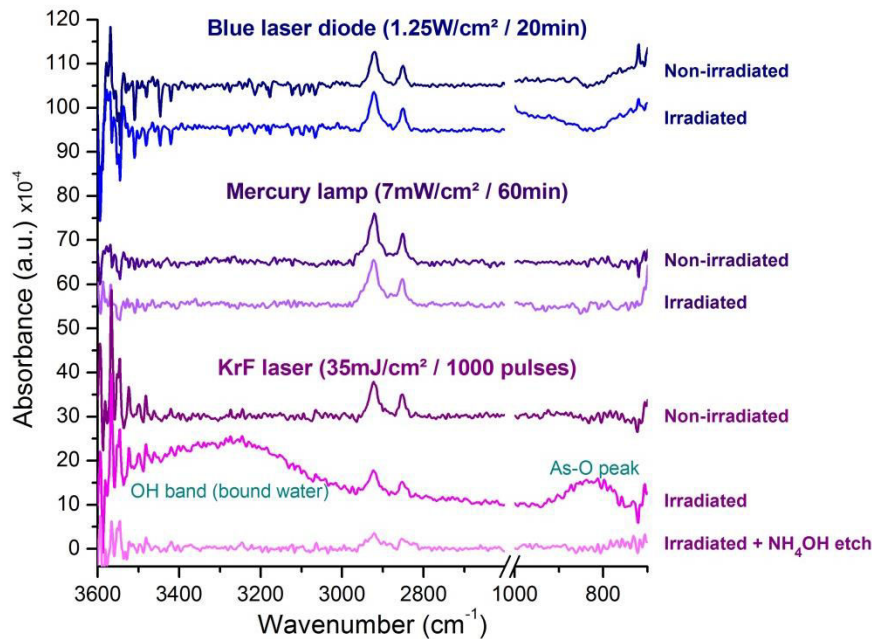
Source	Puissance (mw)	Taille de faisceau (mm ²)	Densité de puissance (pic*) (mW/cm ²)	Temps d'exposition (min)	Durée de pulse (ns)*	Taux de répétition (Hz)*	Densité d'énergie** (J/cm ²)	Nombre de pulses*	Longueur d'onde (nm)‡	Nombre de photons
Diode laser bleu	100	2x4	1250	20	-	-	1500	-	425	3,21E+21
Lampe à mercure	-	-	7	60	-	-	25,2	-	365	4,63E+19
Laser pulsé KrF	-	(masque)	1,52E+09	8,33	23	2	0,035	1000	248	4,37E+19

* Caractéristiques du laser pulsé uniquement

** Pour le laser pulsé : densité d'énergie / pulse

‡ Lorsque la source est large bande, la longueur d'onde centrale est sélectionnée

Tableau 4.3 : Caractéristiques des sources UV et paramètres d'exposition

Figure 4.11 Spectres FTIR centrés sur les régions CH₂ et As-O mesurés sur des échantillons de GaAs fonctionnalisés avec du MHDA, avant et après exposition (en milieu aqueux) par chacune des trois sources : diode laser bleu, lampe à mercure et laser KrF

4.5 Photo-oxydation UV : Régénération de surface par laser KrF

4.5.1 Montage et protocole de régénération par laser KrF

Afin d'effectuer la photo-oxydation sur GaAs, nous avons la possibilité d'utiliser deux types de laser excimer : un laser ArF à 193nm ou un laser KrF à 248nm. Les deux lasers émettent à des longueurs d'onde comprises dans la gamme de photo-oxydation selon la littérature (Figure 4.8). Cependant, il semblerait que pour les mêmes paramètres d'exposition, densité d'énergie et nombre d'impulsions, le procédé à 248nm semble moins endommager la surface de GaAs³⁰². Par ailleurs, le seuil d'ablation du GaAs effectué par laser Nd:YAG à 266nm, a été déterminé par Sanz et al.³⁰³ pour une unique impulsion à 380 ± 22 mJ/cm². Toutefois, avec un certain nombre d'impulsions, le seuil de modifications

surfaciques du matériau (formation de nanostructures)³⁰³ serait plus proche de 135mJ/cm². Brewer et al.³⁰⁴ mentionnent dans leur brevet, un seuil d'ablation avec un laser KrF à environ 100mJ/cm² pour le GaAs tandis que Craciun et al.³⁰⁵ précisent que le seuil de fusion du matériau est proche de 150mJ/cm² (avec une température de fusion avoisinant les 1240°C³⁰³). Afin de ne pas dégrader le matériau, nous choisirons des densités d'énergie inférieures à 100mJ/cm² pour l'ensemble des traitements effectués au laser KrF. Les propriétés optiques et thermiques du GaAs ont été indiquées dans le Tableau 4.4.

Paramètres	Valeur	Référence
Propriétés optiques et thermiques du GaAs		
Bande interdite	1.424 eV	Kasap et al. ³⁰⁶
Température de fusion	1238°C	Kasap et al. ³⁰⁶
Conductivité thermique	330 J.Kg ⁻¹ .K ⁻¹	Kasap et al. ³⁰⁶
Coefficient d'absorption linéaire à 248nm	1.6.10 ⁶ cm ⁻¹	Casey et al. ³⁰⁷
Indice de réfraction à 248nm	2.5	Jellison et al. ³⁰⁸
Densités d'énergie nécessaires au laser KrF pour atteindre les seuils suivants :		
Ablation	100 mJ.cm ⁻²	Brewer et al. ³⁰⁴
Fusion	150 mJ.cm ⁻²	Craciun et al. ³⁰⁵

Tableau 4.4 : Paramètres optiques et thermiques du matériau GaAs

Les interactions laser UV-GaAs peuvent affecter le matériau sur une profondeur maximum de 10-20nm. La profondeur de pénétration du laser dépend fortement de l'énergie ou des longueurs d'ondes du laser. Pour les énergies dépassant la bande interdite du matériau, le coefficient d'absorption augmente fortement provoquant une diminution de la profondeur d'absorption α^{-1} (Figure 4.12)³⁰⁷. À 248nm, on remarque que le coefficient d'absorption est élevé ce qui implique que l'absorption des photons sera proche de la surface. Cependant la diffusion thermique peut affecter le matériau sur une profondeur dépassant la profondeur d'absorption. Le taux de répétition du laser a une influence sur la dynamique des interactions matière-laser. Pour chaque impulsion, la température à l'intérieur du volume impacté augmente et atteint son maximum. La chaleur diffuse à travers le substrat et si le temps entre chaque impulsion est suffisamment long, alors le volume affecté peut retrouver sa température d'origine. Par contre si la période de l'impulsion est plus petite que le temps de diffusion thermique dans le GaAs, alors la chaleur s'accumule à chaque nouvelle impulsion. La température peut affecter la dynamique de formation d'oxyde du matériau.

Par exemple, une fréquence d'impulsion élevée favorise exclusivement la formation d'oxyde de gallium tandis qu'un taux de répétition plus lent génère un oxyde à proportion stochiométrique entre l'arsenic et le gallium³⁰⁹.

L'interaction du laser avec le matériau dépend également de la durée de l'impulsion. Par exemple, le seuil d'ablation diminue lorsque la durée de l'impulsion diminue. Avec des impulsions courtes, la conduction thermique est minimale et peut être négligée. Le volume qui interagit avec le laser est donc limité par la profondeur d'absorption α^{-1} . Ce sont des effets photochimiques qui sont associés aux interactions d'impulsions de courtes durées³¹⁰, alors qu'avec des impulsions de longues durées, les effets thermiques responsables de l'expulsion ou l'ablation du matériau sont favorisés. Dans ce chapitre, plusieurs paramètres ont été conservés tout au long des caractérisations, tels que le taux de répétition maintenu à 2 Hz, la largeur d'une impulsion à 23 ns.

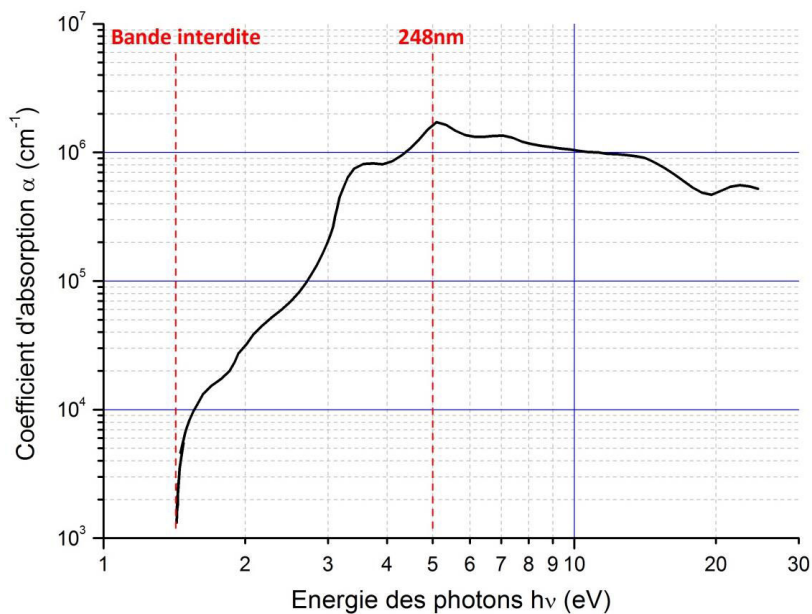


Figure 4.12: Coefficient d'absorption (α) du GaAs en fonction de l'énergie des photons ($h\nu$).
 Adapté de Casez et al.³⁰⁷

Comme cela a été énoncé dans la partie 4.4.1, l'exposition en milieu liquide permet un meilleur contrôle des paramètres environnant l'irradiation et notamment le taux d'espèces oxygènes présentes lors du procédé. Nous utiliserons une cellule fluide, sans écoulement, constituée d'une feuille d'élastomère (FKM Viton[®]) prise en sandwich entre deux fenêtres optiques de quartz (Figure 4.13). La feuille d'élastomère est découpée en son centre pour former la cavité fluide. Le maintien des lames de quartz est effectué par

effet de capillarité du liquide sur l'élastomère. L'échantillon de GaAs est placé dans la cellule avec de l'eau DI ou un mélange eau DI/péroxyde d'hydrogène à différentes proportions. Le gap entre l'échantillon et la fenêtre de quartz, où sera présent le liquide, est d'environ 120 μ m. De façon à améliorer la reproductibilité des résultats, l'échantillon sera gardé 12min dans la cellule quelle que soit la durée d'exposition (le reste du temps, la cellule et l'échantillon seront maintenus dans l'obscurité). L'eau DI utilisée pour cette expérience est dégazée pendant 15min sous un flux de N₂, de façon à éliminer les espèces oxygènes initialement présentes dans le liquide.

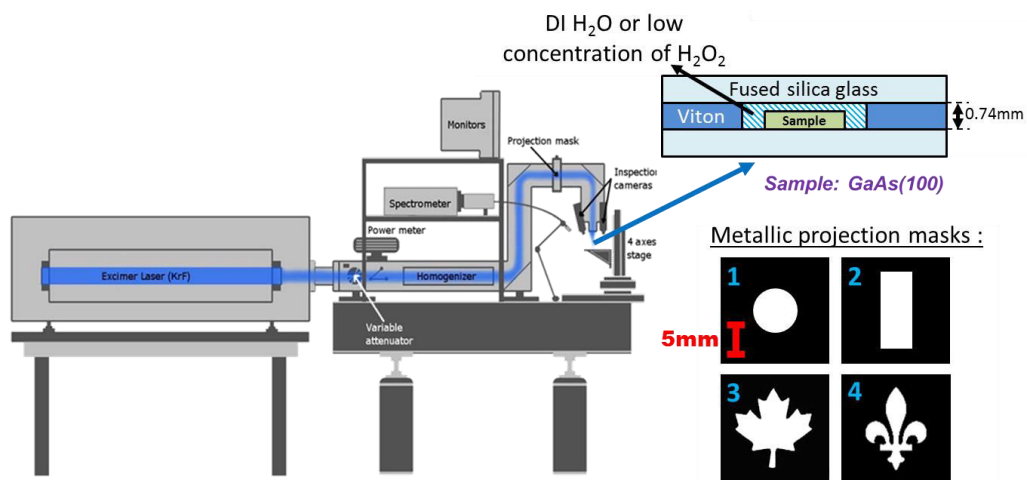


Figure 4.13: Schéma de montage du laser excimer KrF, avec représentation de la cellule fluide et des 4 masques de projection utilisés lors des expériences

Les masques de projection sont des feuillets métalliques dans lesquels des formes ont été découpées par laser. Ils sont placés dans un module situé après l'homogénéisateur du laser (Figure 4.13). Le positionnement du masque est possible par la présence de vis de déplacement X-Y. Le motif du masque est projeté sur l'échantillon avec un rapport de réduction de 1.8. Le masque 1 permet la calibration de la densité d'énergie du laser. Le masque 2 permet d'exposer la moitié d'un échantillon, et sera utilisé pour les caractérisations XPS et FTIR. L'exposition d'une partie seulement de l'échantillon va permettre de caractériser avec précision les modifications de surfaces induites par la source et de les comparer avec l'état de surface initial (surface non-exposée). Les masques 3 et 4 seront par contre utilisés pour le « patterning » par fluorescence.

4.5.2 Photo-oxydation du GaAs avec le laser KrF

Afin d'observer l'impact de la photo-oxydation du GaAs seul par laser KrF, des mesures FTIR ont été effectuées sur des échantillons de GaAs préalablement désoxydés et exposés sur un seul côté. Les paramètres d'exposition sont les suivants :

- Densité d'énergie : $98\text{mJ}/\text{cm}^2$
- Milieu d'exposition : 0.02% ou 6.4mM de H_2O_2 dans le l'eau déionisée et déoxygenée
- Nombre d'impulsions : 100/200/500 impulsions

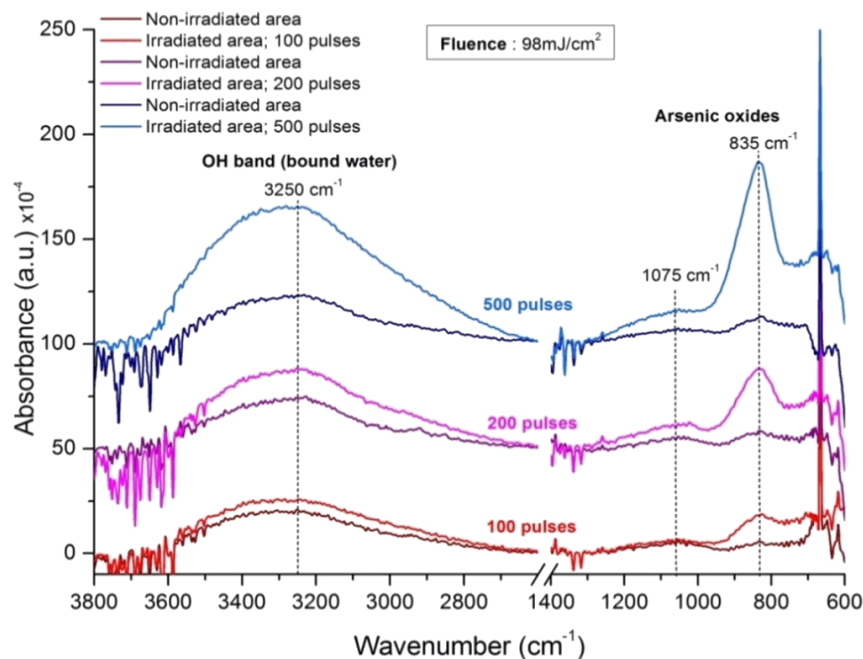


Figure 4.14 Spectres FTIR centrés sur les régions des méthylènes et des oxydes d'arsenic, mesurés sur des échantillons de GaAs bulk en fonction du nombre d'impulsions utilisé pour photo-oxyder sa surface nue

Les spectres présentés dans la Figure 4.14 correspondent aux mesures effectuées sur la face non-exposée (foncée) et face exposée (claire) pour chaque échantillon (chaque couleur). On peut voir sur les spectres de zone exposée, la présence de trois bandes situées à 3250 cm^{-1} , 1075 cm^{-1} et 835 cm^{-1} . Celle centrée à 3250 cm^{-1} correspond aux liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau et la surface oxydée du matériau²⁴³. L'environnement purgé dans lequel est effectuée la mesure ne permet pas l'évaporation totale de la couche d'eau moléculaire présente sur la surface du GaAs. Or, plus la présence d'oxydes de GaAs sera importante en surface, plus les liaisons hydrogène seront

nombreuses. Les deux autres bandes à 1075cm^{-1} et 835cm^{-1} indiquent la présence d'oxydes d'arsenic (As-O) sur les échantillons analysés (respectivement 1061cm^{-1} et 846cm^{-1} dans la littérature). Les vibrations liées aux oxydes de gallium (Ga-O), qui selon la littérature sont aux alentours de 690cm^{-1} et 760cm^{-1} sont difficilement identifiables car les pics ont une intensité plus faible ou masquée par la bande As-O²⁴³. Si l'on trace la courbe des rapports d'absorbance (R_A) avant et après exposition pour les pics d'arsenic et la bande OH, en fonction du nombre d'impulsions, on obtient un comportement quasi-linéaire (Figure 4.15). L'équation du rapport d'absorbance pour le pic d'oxyde d'arsenic à 835cm^{-1} donne :

$$R_A = \left[3,24 + 0,92 \frac{\text{pulses}}{100} \right].$$

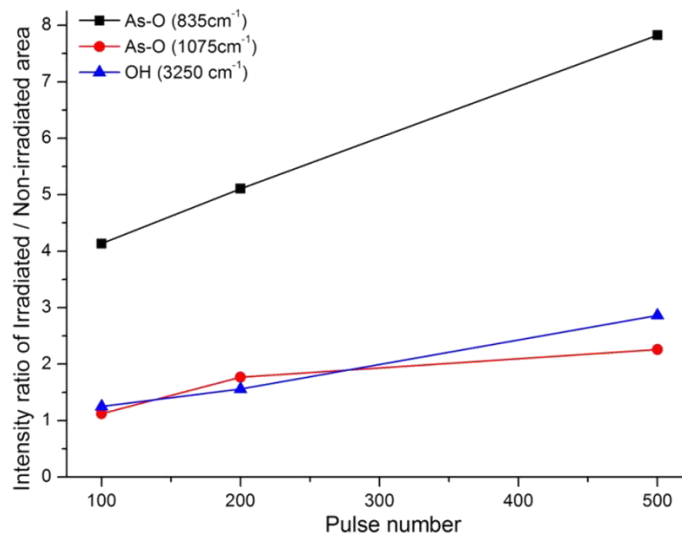


Figure 4.15 Evolution du rapport d'intensité entre les zones irradiées et non-irradiées pour les pics As-O à 835cm^{-1} et 1075cm^{-1} et la bande OH à 3250cm^{-1} en fonction du nombre d'impulsions

L'épaisseur de la couche d'oxyde ainsi formée sur les échantillons de GaAs a ainsi été mesurée par ellipsométrie (Alpha-SE, J. A. Woollam CO., Inc). De façon à ne pas impacter la reproductibilité de traitement des échantillons, ceux-ci sont désoxydés avant, à l'hydroxyde d'ammonium pendant 2min. Les échantillons ont ensuite été exposés à 1000 impulsions au laser KrF à une densité d'énergie de $98\text{mJ}/\text{cm}^2$ toujours en milieu liquide. Une partie d'entre eux a été immergée, pendant l'exposition, soit dans l'eau DI (déoxygénée) soit dans une solution de H_2O_2 à 6.4mM . A titre de comparaison, d'autres échantillons de GaAs ont été préparés sans être exposés aux UVs. Que ce soit pour les échantillons exposés ou non-exposés, nous avons conservé la durée d'immersion dans le liquide à 10min. Trois échantillons de chaque type ont été préparés pour être mesurés à

l'ellipsomètre et les résultats d'épaisseur ont été moyennés sur ces trois valeurs et indiqués dans le Tableau 4.5.

Epaisseur d'oxyde en nanomètres	Immersion dans :	
	DI H ₂ O	6.4mM H ₂ O ₂
Immersion dans le milieu sans exposition aux UVs (10 min)	1.6 ± 0.2	3.9 ± 0.3
Exposition par laser KrF en milieu liquide (248nm, 35mJ/cm ² , 1000 impulsions, 10min)	3.1 ± 0.2	5.3 ± 0.4

Tableau 4.5 : Mesures ellipsométriques des échantillons de GaAs photo-oxydés en milieu aqueux ou dans une solution à 6.4mM de H₂O₂

L'épaisseur d'oxyde mesurée sur les échantillons non-exposés et immergés seulement dans l'eau DI est proche des valeurs d'épaisseur d'oxyde natif observées dans la littérature^{311,312} (valeurs comprises entre 1.6nm et 1.9nm). Cette valeur est multipliée par 2.4 en présence d'un oxydant, même à faible concentration (6.4mM de H₂O₂). Pour la même durée d'immersion de 10min, nous observons une augmentation de l'épaisseur d'oxyde en milieu aqueux (x2), et en présence de H₂O₂ (1.4x) lorsque les échantillons sont exposés au laser KrF. Ceci prouve la capacité des UVs à générer des DRO en milieu aqueux avec ou sans peroxyde d'hydrogène. De ce fait, ces espèces induisent une plus forte oxydation de la surface du GaAs à proximité de la zone irradiée.

4.5.3 Mesures XPS de la désorption de la SAM

A partir de cette partie, les échantillons traités par le laser KrF auront une SAM de MHDA formée sur leur surface selon le protocole défini dans la partie 3.4.1. Les mesures XPS vont nous permettre de déterminer si les thiols sont encore chimisorbés sur la surface après photo-oxydation. De plus, ces mesures vont permettre d'obtenir le pourcentage des oxydes (de Ga, As ou GaAs) présents en surface selon les paramètres d'exposition : nombre d'impulsions et type de milieu.

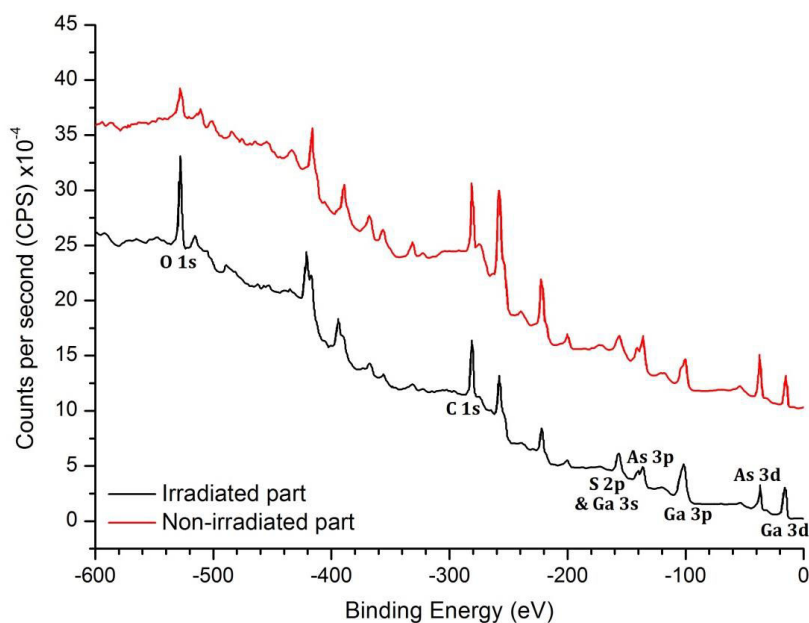


Figure 4.16 Spectre XPS de « survol » pour les parties irradiées et non-irradiées par le laser KrF d'un échantillon de GaAs(100) fonctionnalisé avec une SAM de MHTA

La position, dans le spectre des énergies de liaison, des principales contributions (O 1s, C 1s, S 2p, Ga 3s, As 3d et Ga 3d) obtenues par la mesure d'échantillons de GaAs fonctionnalisés est indiquée dans le Tableau 4.6 et comparée avec les gammes d'énergie rapportées par Wieliczka³¹³. La Figure 4.16 montre un balayage de « survol » (spectre brut sans compensation) entre -600 et 0 eV sur les parties exposée et non-exposée d'un échantillon. On peut situer les contributions Ga 3s, As 3p, Ga 3p, As 3d et Ga 3d, du substrat de GaAs dans les faibles énergies de liaison. On remarque l'augmentation de la présence de contribution O 1s liée à la formation d'oxyde après photo-oxydation. On note également la diminution des contributions As 3p et As 3d, et une stabilité des contributions Ga 3s, Ga 3p et Ga 3d, expliquée par la plus grande facilité de dissolution des oxydes d'arsenic en milieu aqueux.

Contribution	Energie de liaison (eV)	
	Valeurs mesurées (eV)	Valeurs issues de la littérature* (eV)
C 1s C-C	-285.04	-285.12
C 1s C-O	-286.54	
C 1s C=O	-287.94	
C 1s COOC	-289.34	
O 1s	-532.25	-531.4
As 3d 5/2/Ga	-41.17	-41.1
As 3d 3/2/Ga	-41.84	-41.8
As 3d 5/2/As	-41.92	-41.4
As 3d 3/2/As	-42.63	
As 3d/O	-44.22	-44.8
Ga 3d 5/2/As	-19.24	-19.21
Ga 3d 3/2/As	-19.67	-19.05
Ga 3d 5/2/O	-19.8	-20.47
Ga 3d 3/2/O	-20.23	
Ga 3s/As	-160.06	-160.5
Ga 3s/O	-162.61	-162.7
S 2p 3/2	-163.26	-163.06
S 2p 1/2	-164.66	-164.19

Tableau 4.6 : Énergies de liaison obtenues expérimentalement pour chaque élément d'intérêt et leur correspondance dans la littérature (*Issue de « NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database », <http://srdata.nist.gov/xps>)

Les spectres XPS sont ensuite obtenus en haute résolution sur des gammes d'énergie plus restreintes. Pour chaque spectre de la Figure 4.17, les données brutes (points noirs) sont déconvoluées en composantes individuelles avec les paramètres d'ajustement déjà observés dans la littérature^{165,286,314} puis ces pics sont analysés. Les spectres des contributions Ga 3d et Ga 3s / S 2p de la monocouche de MHDA mesurés sur la zone exposée ou non-exposée de l'échantillon, sont représentés sur la Figure 4.17. L'exposition a été réalisée avec une densité d'énergie de 35mJ/cm² et 1000 impulsions en milieu aqueux. Le spectre Ga 3d a été déconvolué en contribution du substrat de GaAs et sous-

oxyde de Ga (GaO_2). Le doublet issu de la contribution du substrat de GaAs est représenté par deux pics à 19.24 eV et 19.67 eV. Dans les Figure 4.17a et b, on peut observer une forte augmentation du doublet des sous-oxydes situé à plus haute énergie de liaison (>19.8 eV). Cette observation atteste de la formation d'oxyde sur les surfaces fonctionnalisées de MHDA après exposition aux UVs. Aucun pic correspondant aux liaisons Ga-S n'a pu être déterminé de par leurs proximités avec les pics de GaAs ou de suboxydes⁹⁰. Nous pouvons voir sur les Figure 4.17c et d, à la fois les doublets Ga 3s et S 2p qui se situent aux énergies de liaison 172 – 152 eV. Les pertes liées aux diffusions inélastiques des électrons génèrent des composantes qui chevauchent également les pics de cette région provoquant des erreurs en termes de pourcentage atomique par rapport aux autres pics de Ga (par exemple avec les Ga 3d). De façon à limiter cet effet, nous utiliserons la méthode de calibration évoquée plus haut (partie 4.2.2) et proposée par Marshall et al.²⁸⁶. Ainsi les contributions du doublet Ga 3s (Ga-As) ont été estimées à partir des pourcentages atomiques de celles du Ga 3d (Ga-As). La différence par rapport à l'enveloppe du spectre est comblée par les composantes GaOx et artificiellement par la diffusion inélastique du substrat à 156.2eV²⁴⁰. Les contributions S 2p sont finalement évaluées sur les pics restants du spectre respectivement à 163.06 eV et 164.19 eV^{240,314}. Ces dernières indiquent, pour le spectre de la surface non-exposée, la présence de thiols immobilisés covalamment avec les atomes Ga et As du matériau. Après exposition, on remarque, de la même façon que précédemment, une augmentation des contributions GaOx et la disparition du doublet S 2p indiquant la désorption des espèces thiolées. Les pourcentages atomiques des éléments d'intérêts sont détaillés dans le Tableau 4.7 pour des échantillons exposés en milieu aqueux avec 6.4mM (0.02%) ou sans H_2O_2 . Dans chacun des deux cas, l'exposition a été réalisée avec 500 et 1000 impulsions et une densité d'énergie fixée à 35mJ/cm². Comme mentionné précédemment, nous observons une réduction de l'élément soufre, lié à la présence de thiols sur le substrat, jusqu'à une valeur nulle à partir de 500 impulsions pour le milieu $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$ et à partir de 1000 impulsions pour le milieu H_2O seul. Ce phénomène de désorption est également indiqué par la diminution des contributions C 1s (chaînes carbonées) par rapport aux autres éléments. Cependant, la composante de l'élément carbone ne s'annule pas comme celle du soufre car même après un nettoyage rigoureux, il reste toujours des contaminants en surface. La présence d'oxydes (As_yO_x ou Ga_yO_x) ou d'éléments oxygènes O 1s, à l'inverse, augmente de manière significative en fonction du nombre d'impulsions. Le pourcentage de O 1s, même pour les surfaces non-exposées, y est plus important pour les échantillons immergés dans le milieu $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$. Pour 1000

impulsions, on note une différence de stoechiométrie entre les deux types oxydes As_yO_x et Ga_yO_x pour les deux milieux. Cela peut être expliqué par la génération d'oxydes à proportion stoechiométrique en présence de peroxyde d'hydrogène alors que l'exposition seule aux UVs permettrait la génération d'oxyde de gallium plus spécifiquement.

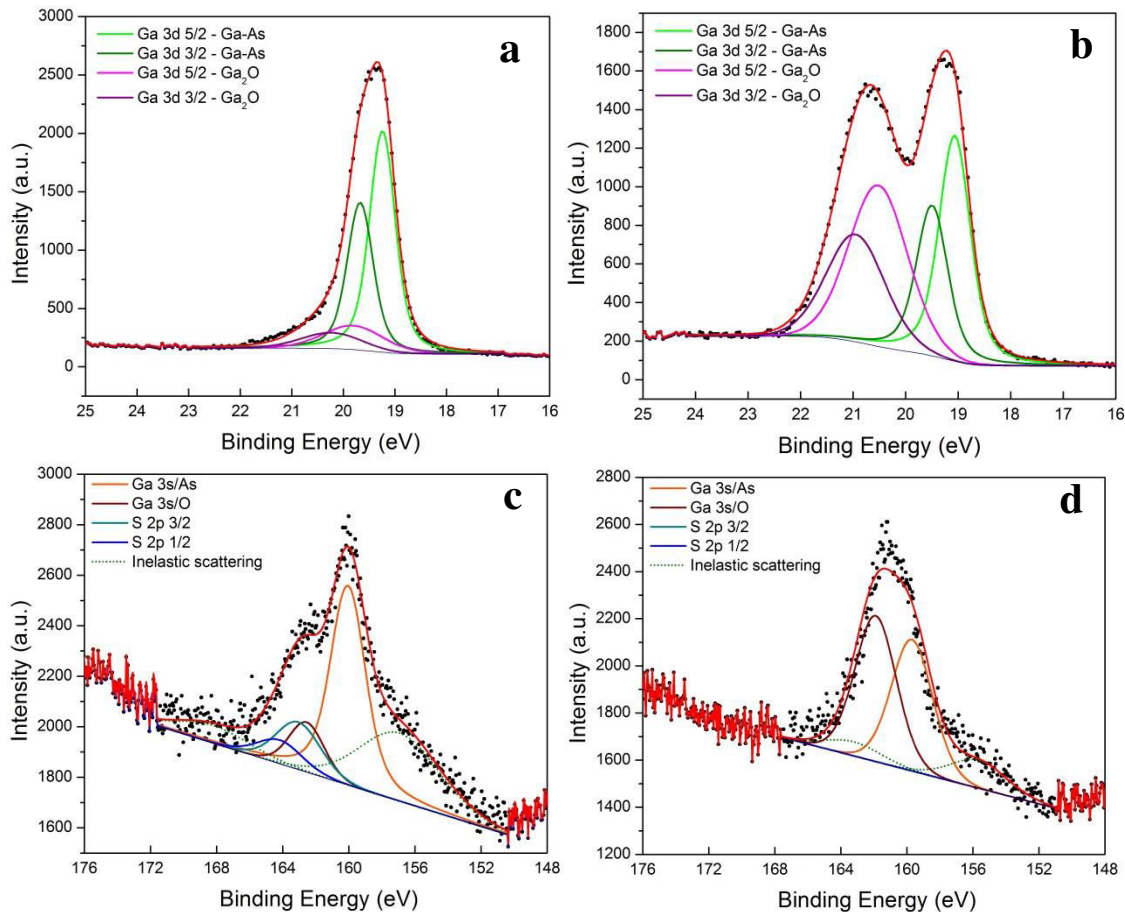


Figure 4.17 Contributions XPS de Ga 3d et S 2p / Ga 3s d'une SAM de MHDA formée sur GaAs(100) pour les parties non-exposées (a et c) et exposées (b et d) en milieu aqueux

Nous pouvons conclure que la désorption totale de la SAM de MHDA par irradiation aux UVs semble être atteinte à 1000 impulsions en milieu aqueux ou 500 impulsions dans un milieu H_2O/H_2O_2 . Toutefois ce dernier milieu affecte également la surface non-exposée provoquant ainsi une désorption partielle des thiols dans ces zones (Tableau 4.7). A partir de ces informations, il est important d'ajuster les paramètres d'exposition et du milieu d'immersion pour (1) réaliser une désorption complète de la SAM en zone exposée et (2) obtenir le plus fort contraste de densité de molécules entre les zones exposées et non-exposées. L'impact des paramètres d'exposition sera étudié par spectroscopie infrarouge, en utilisant le microscope FTIR Hyperion 2000, dans les prochaines parties.

Milieu d'immersion	DI H ₂ O			0.02% H ₂ O ₂		
	0	500	1000	0	500	1000
Exposition (nombre d'impulsions)	0	500	1000	0	500	1000
C 1s	43,9	36,7	39,1	39,3	28,5	26,2
O 1s	10,3	19,8	25,0	26,0	33,8	36,7
As 3d	20,0	15,6	10,8	9,1	12,1	11,4
(% As _y O _x)	(2,0)	(1,3)	(10,5)	(43,5)	(74,0)	(85,7)
Ga 3d	22,1	26,3	25,1	23,2	25,5	25,6
(% Ga _y O _x)	(17,2)	(39,6)	(52,6)	(70,5)	(77,9)	(86,9)
S 2p	3,7	1,6	0	2,4	0	0

Tableau 4.7 : Concentration atomique (résultats XPS) des éléments C, O, As, Ga et S pour des échantillons exposés et non-exposés dans l'eau DI ou dans une solution à 0.02% de H₂O₂

4.5.4 Influence de la densité d'énergie, du nombre d'impulsions et de l'environnement d'exposition

Dans cette partie, nous avons étudié l'impact de deux paramètres essentiels de l'exposition, qui sont la densité d'énergie et le nombre d'impulsions (équivalent au temps d'exposition). D'après la littérature citée dans la partie 4.5.1, le seuil d'ablation du GaAs sous irradiation par laser KrF est situé aux alentours de 100mJ/cm². Nous avons voulu vérifier qu'à la densité d'énergie choisie, nous ne nous retrouverions pas dans le même cas de figure. Nous avons donc exposé deux échantillons sur leur moitié avec une densité d'énergie de respectivement 35mJ/cm² et 98mJ/cm², un nombre d'impulsions fixé à 500 et les échantillons immergés dans une solution de 0.02% de H₂O₂. Nous avons remarqué que seul l'échantillon exposé à 98mJ/cm² présente des modifications de surface observables par microscopie optique (Figure 4.18). L'autre échantillon (exposé à 35mJ/cm²) ne présente aucune modification visible de sa zone exposée. Nous notons également que les bords de

l'exposition ne sont pas nets ce qui peut être dû aux éventuelles vibrations lors de l'exposition ou au phénomène de diffusion sur les bordures du masque.

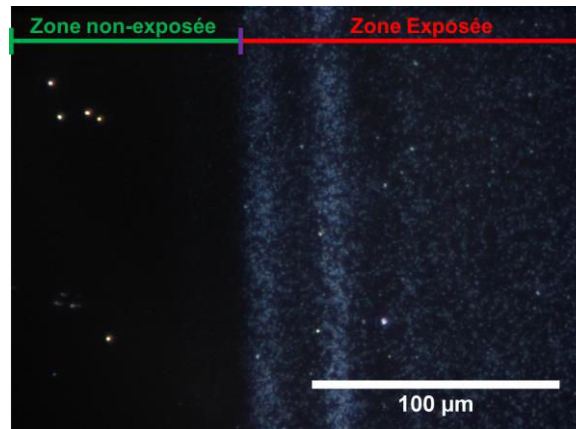


Figure 4.18 Image au microscope optique (50x) des frontières entre les zones exposées ou non, pour une densité d'énergie de $98\text{mJ}/\text{cm}^2$

Nous avons également observé par AFM, la transition des parties exposée/non-exposée pour un échantillon exposé à faible densité d'énergie. L'image (Figure 4.19a) révèle également une transition non franche entre les deux zones sur la fenêtre observable. La profondeur de marche moyenne mesurée entre les deux zones (séparées par un trait en pointillé rouge sur la courbe de profil) est de $1.87 \pm 0.20\text{ nm}$ ce qui est proche de la taille des thiols (MHDA) greffés sur la surface.

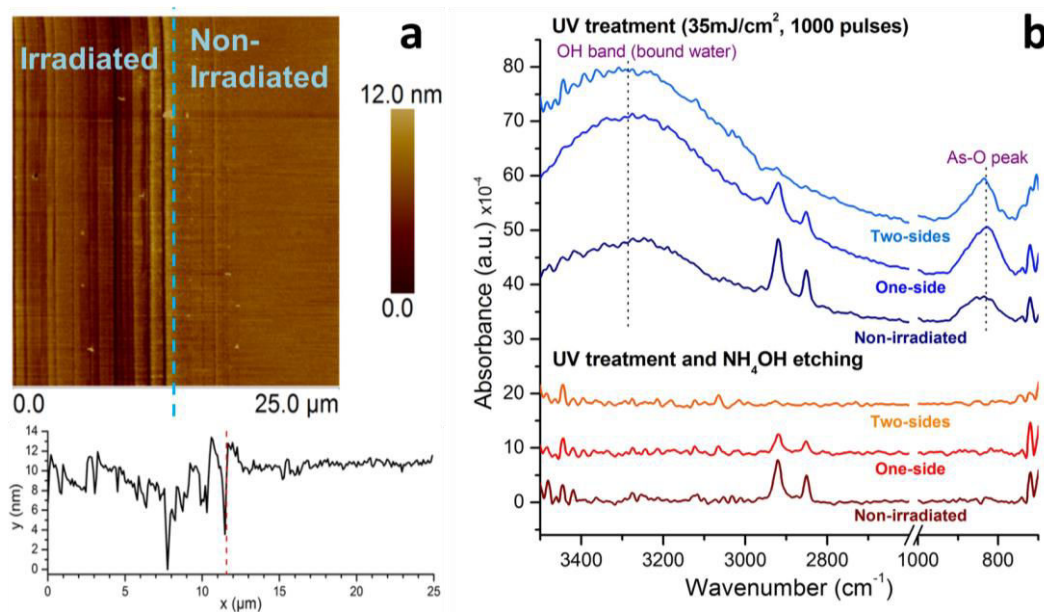


Figure 4.19 (a) Image AFM de la zone de transition entre partie irradiée et non-irradiée du GaAs(100) fonctionnalisé de MHDA et (b) spectre FTIR focalisé sur la région des méthylènes et celle des pics d'As-O

L'impact des paramètres d'exposition est évalué quantitativement par une étude en spectroscopie infrarouge. L'analyse se focalise sur les pics d'As-O, de méthylène et la bande OH (résultant des liaisons hydrogène). La gamme en nombre d'onde est ainsi de $1700-700\text{cm}^{-1}$ pour le(s) pic(s) d'AsO et la gamme correspondant aux pics de méthylènes et à la bande OH est comprise entre $3500-2600\text{cm}^{-1}$ (Figure 4.19b). La mesure étant effectuée en transmission, l'analyse s'applique sur les deux faces de l'échantillon. Donc si l'une des faces seulement est régénérée par photo-oxydation UV, alors l'absorbance des pics de méthylènes correspondra à la moitié de l'absorbance initiale. Si les deux faces sont exposées alors nous pourrions atteindre des absorbances nulles (Figure 4.19b). Un post-traitement à l'ammoniaque permet de retirer les oxydes présents en surface comme nous l'indiquent les spectres de la Figure 4.19b par la disparition de la bande OH et des pics As-O. Pour les prochaines expériences de cette partie, seulement une face sera exposée aux UVs. Le degré d'oxydation du substrat est évalué en fonction de l'absorbance des pics d'As-O mais aussi par rapport à l'absorbance de la bande OH (voir partie 4.5.2). De la même façon que pour les expériences précédentes, chaque échantillon est constitué d'une partie exposée et d'une partie non-exposée. Les courbes sont données par le rapport des intensités entre la zone non-irradiée et la zone irradiée et en fonction des deux paramètres étudiés : la densité d'énergie (Figure 4.20a) et le nombre d'impulsions (Figure 4.20b). Ainsi lorsqu'une courbe atteint un rapport de 0.5, cela implique que la totalité des thiols greffés sur la surface irradiée ont été désorbés. Le rapport d'intensité des pics de carbones et de la bande OH ont été évalués avec un nombre d'impulsions fixé à 1000 et des densités d'énergie de 25 (valeur minimum), 35, 45 et 65 mJ/cm^2 . Excepté pour la première valeur à 25 mJ/cm^2 , pour laquelle le rapport d'intensité des pics de méthylène n'atteint pas tout à fait 0.5, il semble, qu'au-delà de cette valeur, l'objectif de désorption de la monocouche soit validé. L'effet du nombre d'impulsions est obtenu cette fois-ci en fixant la densité d'énergie à 35 mJ/cm^2 (valeur minimale à laquelle le rapport atteint les 0.5). Le rapport des pics de carbone diminue quasi linéairement entre 100 et 500 impulsions puis stagne à environ 0.5. En revanche, le taux d'oxydation augmente quasi linéairement sur la gamme observée et atteint un rapport de 1.5 à 1000 impulsions. Pour assurer une désorption totale de la monocouche de MHDA, nous choisirons pour les prochaines expériences les paramètres suivants : densité d'énergie fixée à 35 mJ/cm^2 et un nombre d'impulsions fixé à 1000.

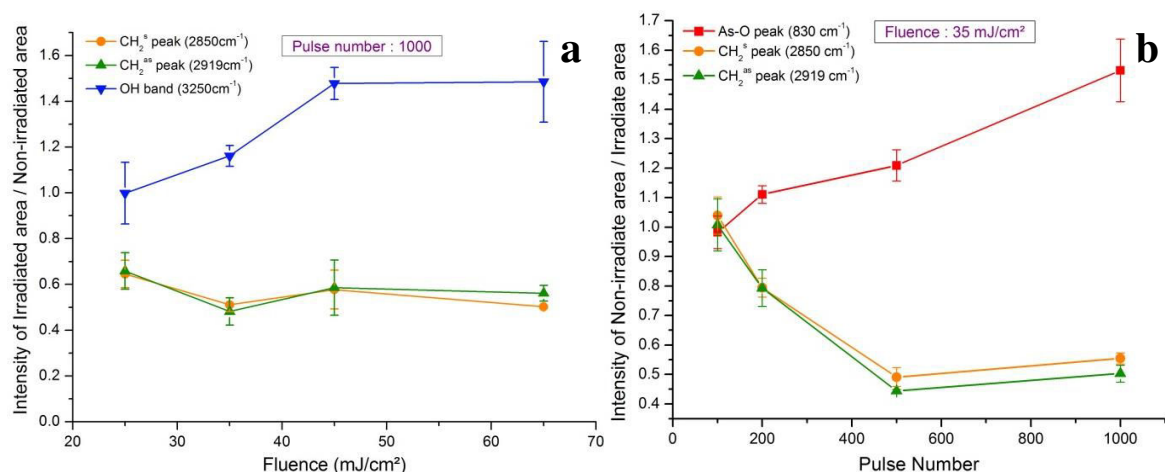


Figure 4.20 Rapport d'intensité entre surface exposée et surface non-exposée de GaAs fonctionalisé au MHDA pour les vibrations CH₂^{asy}, CH₂^{sy}, As-O et de la bande OH en fonction (a) de la densité d'énergie et (b) du nombre d'impulsions

La concentration de H₂O₂ dans le milieu lors de l'exposition a un impact considérable sur l'efficacité et la rapidité de la photo-oxydation ainsi que sur le contraste d'oxydation entre la partie exposée et la partie non-exposée. En effet, il semble évident que plus le milieu liquide dans lequel est immergé l'échantillon à régénérer aura une forte concentration de H₂O₂, plus l'interface GaAs-SAM s'oxydera rapidement, et ce, même sans exposition à la lumière. Il convient d'évaluer quelle est la concentration de H₂O₂ pour laquelle le processus est le plus efficace. Les différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène sont préparées avec du H₂O₂ à 30% dilué dans de l'eau déionisée et dégazée. Les cinq solutions sont les suivantes : H₂O, 0.02% (6.5mM), 0.01% (3.2mM), 0.005% (1.6mM) et 0.002% (0.65mM) de H₂O₂. L'immersion totale pour chaque échantillon est de 20min (10min pour l'exposition de la face avant et 10 autres minutes pour la face arrière).

La courbe (Figure 4.21) montre l'évolution de l'absorbance du pic de vibration CH₂^{asy} en fonction de la concentration de peroxyde pour la zone exposée et celle non-exposée de l'échantillon. L'absorbance (correspondant à la densité de thiols en présence) diminue en fonction de la proportion d'oxydant dans le milieu. La densité des thiols tend à diminuer pour les deux zones. Pour les paramètres d'exposition sélectionnés, la valeur d'absorbance s'annule pour une solution de concentration proche de 1.6mM (0.005% de H₂O₂). La différence entre les deux courbes (« exposée » et « non-exposée ») est appelée la selectivité du « pattern ». Plus cette différence est grande, meilleur sera le contraste du patterning. Pour les prochaines expériences nous choisirons un milieu à 1.6mM de H₂O₂, parmi ceux mesurés, c'est celui qui offre le plus grand contraste de selectivité.

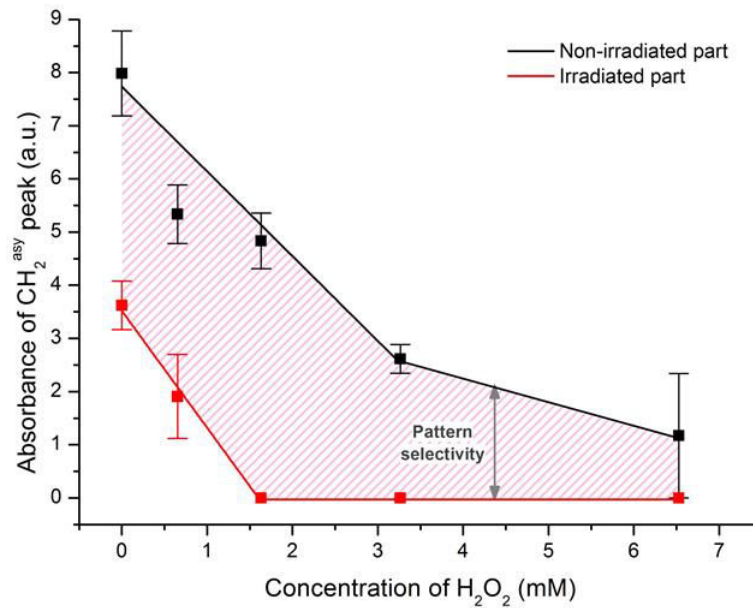


Figure 4.21 Absorbance du pic $\nu\text{CH}_2^{\text{asy}}$ en fonction de la concentration en H_2O_2 du milieu d'exposition pour des échantillons de GaAs(100) fonctionnalisés avec du MHTDA, irradiés ou non par $35\text{mJ}/\text{cm}^2$ et 1000 impulsions

4.5.5 Cycle de régénération

Afin d'évaluer la capacité de régénération de la surface, il est nécessaire de réaliser plusieurs cycles de régénération de façon à vérifier la répétabilité et la reproductibilité du processus (Figure 4.22).

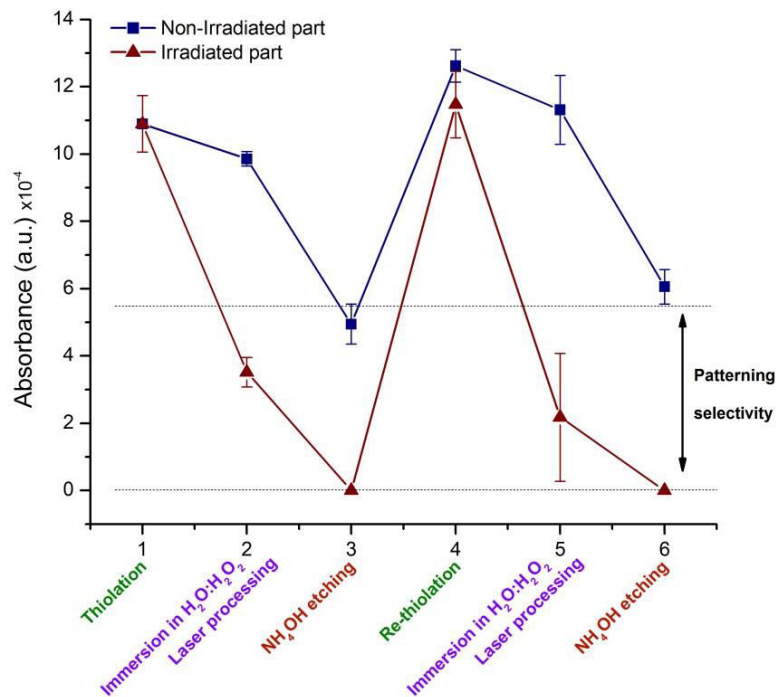


Figure 4.22 Régénération de la fonctionnalisation : Evolution de l'absorbance du pic de vibration CH_2^{asy} avec les étapes de fonctionnalisation, photo-oxydation et désoxydation.

Deux cycles de régénération ont été appliqués sur trois échantillons. Le cycle de régénération est constitué : d'une étape de fonctionnalisation, puis de photo-oxydation en milieu liquide avant de terminer par une étape de gravure à l'hydroxyde d'ammonium. Le profil de régénération semble particulièrement reproductible d'un échantillon à un autre ainsi que du premier cycle au second.

4.6 Photo-oxydation UV : Patterning de surface

De nombreuses techniques de patterning de SAM sont déjà existantes, telles que des techniques de micro-usinage³¹⁵, des techniques utilisant le faisceau du microscope à effet tunnel (STM)³¹⁶, ou de façon plus conventionnelle, la lithographie à faisceau d'électron (E-beam)^{317,318} ou les sondes ioniques focalisées (FIB)³¹⁸. Parmi toutes ces techniques, la procédure évoquée dans ce chapitre semble beaucoup plus simple, même si pour la preuve de concept nous avons utilisé un laser excimer, qui est un équipement onéreux et encombrant. Une lampe à mercure avec la bonne gamme de longueur d'onde ou une diode laser émettant à moins de 300nm permettraient de générer le même phénomène.

Nous souhaitons, à travers cette étude, révéler par fluorescence le patterning effectué sur la SAM (Figure 4.23). Nous utiliserons comme sonde fluorescente des microsphères (FluoSpheres®) contenant de la fluorescéine qui est un fluorophore dont la longueur d'excitation est à 494nm et celle d'émission à 512nm. Les microsphères, de diamètre 0.048µm, sont fonctionnalisées par des biotines. A la différence des précédentes études, nous choisirons donc une SAM à terminaison biotine pour pouvoir immobiliser les microsphères sur la surface avec une forte affinité par l'intermédiaire d'une avidine, dans le cas présent par de la NeutrAvidin (voir chapitre 1). Les thiols utilisés ont des chaînes polyéthylène glycol, nous les appellerons PEG-biotin. La totalité du protocole d'immobilisation est réalisée dans l'obscurité afin de limiter le photo-blanchiment des fluorophores. Le protocole de fonctionnalisation est le même que celui utilisé pour les alkanethiols, mis-à-part que pour des raisons économiques nous utilisons des concentrations de PEG-biotin à 0.2mM. L'utilisation de faibles concentrations ne semble en rien affecter la formation de la monocouche auto-assemblée de PEG-biotin. Après 20h d'incubation les échantillons sont rincés puis séchés avant d'être stockés. Les échantillons sont ensuite photo-oxydés avec le laser KrF en utilisant les paramètres définis plus haut. Des masques métalliques avec des motifs en forme de feuille d'érable et de fleur de lys sont utilisés pour cette étude. Après l'étape d'exposition, certains échantillons sont

immergés dans une solution de NH_4OH pendant 30s pour retirer l'oxyde formé pendant la photo-oxydation. Une étape de blocage, en utilisant la BSA, peut être également employée pour protéger les surfaces régénérées des absorptions non-spécifiques. Les échantillons sont exposés, pendant 2 h, à une solution de NeutrAvidin diluée à une concentration de $100\mu\text{g/mL}$ dans un tampon de PBS 1x avec un surfactant, le TWEEN20 à 0.5% ou 1%. Cette étape est suivie par l'immobilisation des microsphères puis par la mesure au microscope à fluorescence (Olympus IX71). Les paramètres d'exposition et du procédé, pour chaque échantillon, sont donnés dans le Tableau 4.8.

	Densité d'énergie (mJ/cm^2)	Nombre d'impulsions	Milieu d'exposition	Temps d'immersion (min)	Désoxydation NH_4OH	Etape de blocage par la BSA
Ech. A	35	1000	0.02% H_2O_2	10	Non	Non
Ech. B	35	1000	0.02% H_2O_2	45	Non	Non
Ech. C	45	1000	0.001% H_2O_2	10	Non	0.5% pour 30min
Ech. D	45	1000	0.001% H_2O_2	10	30s	0.5% pour 30min
Ech. E	45	1000	DI H_2O	10	30s	1% pour 30min
Ech. F	45	1000	DI H_2O	10	30s	1% pour 1h

Tableau 4.8 : Paramètres d'exposition et procédure pour chaque échantillon patterné de GaAs(100) fonctionnalisé par une architecture PEG-biotin / NeutrAvidin / Microsphère

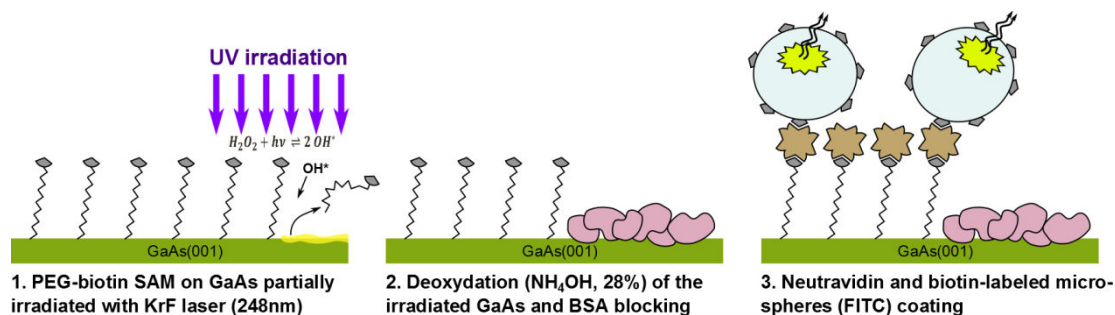


Figure 4.23 Procédé standard de photo-patterning UV révélé par fluorescence

On remarque que les échantillons qui n'ont pas eu d'étape de blocage à la BSA (Figure 4.24A-B) révèlent un comportement quasi-inverse à ce qui est attendu. Cela signifie que sans cette étape préalable de blocage, la NeutrAvidin va se physisorber sur la surface nue (photo-oxydée) du GaAs et ainsi capturer les microsphères. De plus, l'effet d'une immersion prolongée de l'échantillon B dans la solution de peroxyde d'hydrogène par rapport à l'échantillon A montre un motif aux bordures beaucoup plus diffuses dû à l'oxydation accrue des zones non-exposées. En effet, plus le temps d'immersion dans la

solution est court moins la partie non-irradiée sera oxydée. En diminuant la concentration de peroxyde, comme nous l'avons vu précédemment, une bonne selectivité peut être maintenue dans la zone patternée. Entre les échantillons C et D, nous remarquons l'impact de la désoxydation à l'hydroxyde d'ammonium. Le contraste entre les zones exposées ou non est plus important après l'étape de désoxydation, ce qui peut être expliqué par la modification de l'angle de contact avant et après désoxydation. Si le substrat est plus hydrophile, cela diminuera la capacité de l'avidine et des microbilles à s'adsorber sur la surface (moins d'interactions hydrophobe). De même, la durée d'immersion dans la solution de blocage et sa concentration améliore de façon significative le contraste (Figure 4.24E-F). On observe un contraste plus élevé sur l'échantillon D par rapport au E et de la même façon avec l'échantillon F par rapport au E. Les paramètres de cette étape sont extrêmement importants pour effectuer une passivation de la biointerface optimale. Enfin, les deux derniers échantillons, E et F, ont été irradiés en milieu aqueux seulement, ce qui ne permet pas de désorber la totalité de la surface exposée, et explique la fluorescence résiduelle observée sur ces surfaces.

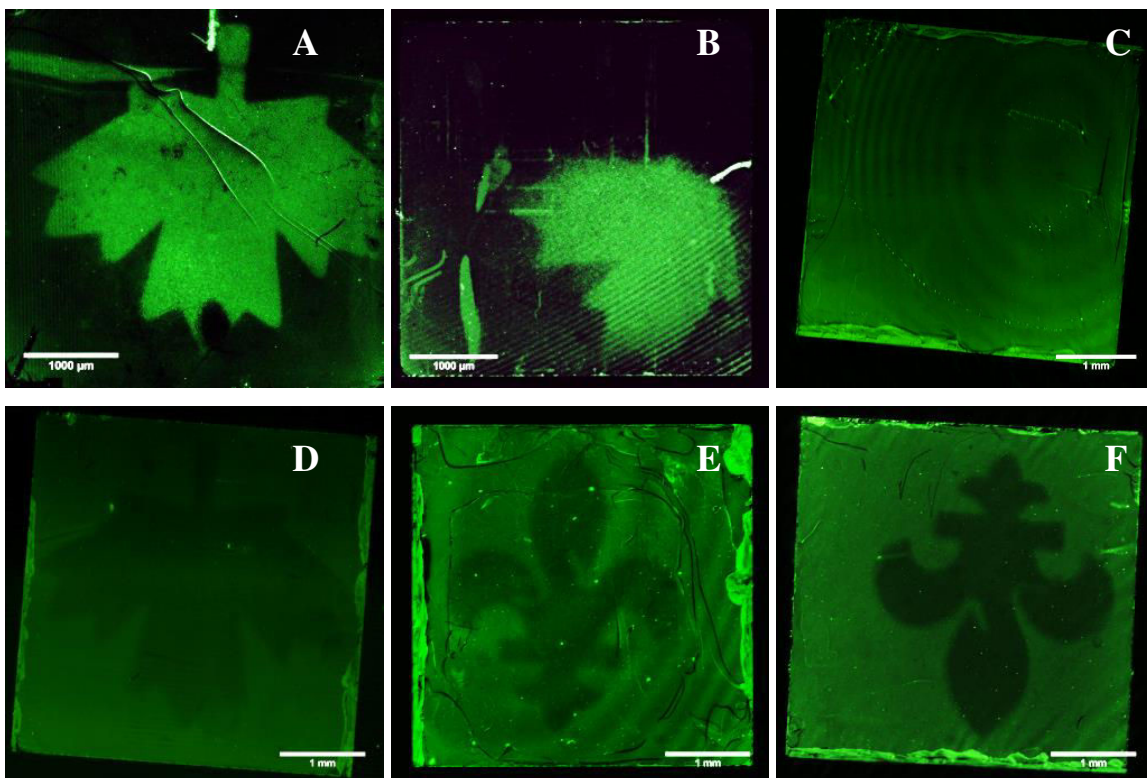


Figure 4.24 Images au microscope à fluorescence des échantillons de GaAs(100) fonctionnalisés par des PEG-biotin, patternés puis coatés de NeutrAvidin afin de tester la capture des microsphères fluorescentes

Grâce aux résultats observés dans ce chapitre, nous pouvons sélectionner les paramètres d'exposition pouvant être définis dans un protocole de photo-oxydation standard. Avec une valeur de 35mJ/cm² de densité d'énergie du laser, 1000 impulsions semblent suffisantes pour activer le phénomène de photo-oxydation. D'après les résultats obtenus précédemment, l'emploi d'un milieu à 0.005% de H₂O₂ semble optimal pour obtenir une meilleure efficacité dans le processus de photo-oxydation tout en limitant l'oxydation des zones non-exposées. En ce qui concerne le protocole d'immobilisation sur les SAMs de PEG-biotin, il est important de mentionner que les étapes de blocage et de désoxydation ainsi que l'utilisation de surfactant (TWEEN20), sont essentielles pour éviter l'absorption non-spécifique d'éléments biologiques en dehors de sites de reconnaissance.

4.7 Conclusion

Nous avons étudié dans ce chapitre, deux principales techniques de régénération de SAMs et de biointerfaces : la régénération par voie chimique et par photo-oxydation UV en milieu liquide. Le premier procédé est rapide, ne nécessite pas d'équipement sophistiqué, et peut être réalisé *in situ*. Il permet de régénérer la totalité de la biointerface, incluant les récepteurs immunologiques et la SAM sans trop affecter le matériau sous-jacent. Ses limitations pour une application de régénération de biocapteur résident dans les matériaux utilisés pour la cellule fluide, ils doivent être suffisamment résistants chimiquement à ces produits. De plus, cette méthode attaque petit à petit le substrat de GaAs, ce qui à long terme ou après un certain nombre de cycles peut détériorer la surface ou des éléments du capteur. La seconde méthode, permet de désorber plutôt efficacement les thiols en surface de GaAs par photo-oxydation UV. Cette technique permet de préserver la surface du matériau. Nous avons testé trois sources différentes : une source laser excimer KrF (248nm), une lampe à mercure (300-480nm) et une diode laser (405-450nm). D'après les analyses FTIR, seul le laser excimer a permis de générer de la photo-oxydation, ce qui signifie que les gammes de longueur d'onde des deux autres sources ne permettent pas d'atteindre ce phénomène. Toutefois, nous pensons qu'il serait possible d'employer une lampe à mercure ou une diode laser émettant dans une gamme inférieure à 300nm ce qui constituerait une solution à moindre coût. En perspective, nous souhaiterions « patterner » une surface inerte à l'absorption de molécules (par exemple, sur laquelle une SAM de MUDO est formée) à l'aide de la technique de photo-oxydation UV pour remplacer localement les molécules de MUDO par celle de MHDA dans le but de créer plusieurs

zones de greffage distinctes. Nous n'avons pas caractérisé la photo-oxydation des SAMs de MUDO, mais d'après les conclusions apportées par Cooper et al.¹⁶², nous pouvons prédire que le taux de photo-oxydation sera environ 4 fois plus rapide que pour le MHDA. En effet, la longueur de chaîne du MUDO est plus courte de 4 méthylènes, ce qui multiplierait la vitesse du procédé par deux et l'impact du groupe terminal hydroxyle sur la stabilité de la SAM la doublerait également. Ce procédé permettrait la génération de plusieurs zones, pour un même capteur, sur lesquelles différents biorécepteurs pourraient y être immobilisés pour une application de capteur multiplexé.

CHAPITRE 5 Tests du capteur acoustique en GaAs

5.1 Introduction

Après avoir décrit les travaux de modélisations analytiques et numériques, le protocole de fabrication, le développement d'une interface de bio-reconnaissance et sa régénération, nous allons vérifier les performances puis étudier le comportement du dispositif lorsqu'il est soumis à différents environnements.

Dans un premier temps, nous allons présenter la méthodologie et les montages de mesure adoptés pour ces phases de tests. Nous nous focaliserons sur la mesure d'impédance du dispositif aux alentours de la fréquence de résonance lors de la génération d'onde de volume. Les mesures électriques seront conduites en utilisant une interface électrique adaptée au dispositif, un analyseur d'impédance et un programme permettant le traitement des acquisitions.

Nous déterminerons ensuite l'impact de différents facteurs environnementaux sur la mesure, tels que la dépendance de la fréquence à la température, ou l'effet des propriétés électriques (conductivité et permittivité) et mécaniques (viscosité et densité) du milieu environnant. Nous discuterons des perspectives possibles pour l'amélioration et l'optimisation du transducteur.

Nous verrons également, l'efficacité de l'interface biochimique à immobiliser les bactéries ciblées pour notre application (*E. coli*). Nous établirons la masse équivalente mesurable par le capteur et donnerons sa sensibilité.

5.2 Montages expérimentaux

5.2.1 Mesures à l'analyseur d'impédance

Analyseur d'impédances

Les mesures électriques d'impédance ont été réalisées via les analyseurs de réseau HP 4395A et HP 4194A (*Hewlett Packard*) muni d'un module (ou d'une sonde) à impédance. Les gammes d'analyse en fréquence vont de 100kHz à 500MHz pour l'analyseur HP 4395A et 10kHz à 100MHz pour l'analyseur HP 4194A. Ce dernier est utilisé conjointement avec le module d'impédance HP 41941A. Les deux analyseurs, appartenant

au département de recherche, ont été utilisés successivement au cours de ce travail selon leur disponibilité.

L'analyseur effectue un balayage en fréquence à une tension maximale de 1.3V et restitue le module et la phase de l'impédance ou de l'admittance pour la gamme de fréquences choisie. L'analyseur muni d'un port GPIB est interfacé avec un ordinateur grâce à un module de conversion GPIB/USB. Il est donc possible de commander l'analyseur et de recevoir les acquisitions via une interface numérique. Les langages de programmation compatibles avec la communication de l'analyseur sont variés, nous utiliserons, ici, les langages propriétaires Matlab® ou Labview®.

La calibration de l'analyseur d'impédance est une étape primordiale que nous réitérons avant chacune des mesures et à chaque modification des paramètres d'acquisition (gamme de fréquences par exemple). Il permet de compenser les impédances créées par les connexions et les câbles situés entre l'analyseur et le dispositif à mesurer. La calibration est réalisée avec trois étalons, correspondant à un circuit ouvert idéal (admittance nulle), à un circuit fermé idéal (impédance nulle) et à un circuit avec une charge de 50Ω . Nous plaçons les étalons en bout de circuit, c'est-à-dire à la place du transducteur GaAs, de façon à éliminer le plus efficacement possible les capacités parasites liées aux câbles et interconnexions.

Interface électrique :

Plusieurs méthodes sont possibles pour l'interfaçage électrique. Nous proposons soit une interface permanente, où le dispositif est collé sur un circuit imprimé, soit une interface de test temporaire pour laquelle nous utilisons des pointes à ressort. Dans le premier cas, le dispositif en GaAs est collé sur le PCB (circuit imprimé) avec une colle époxy. Le circuit imprimé est métallisé par un dépôt d'or permettant de connecter le dispositif à ce circuit par pontage (ou *wire bonding*) en utilisant des microfils d'or. Nous utilisons un câble et des connecteurs SMA (*SubMiniature version A*) pour relier l'analyseur au PCB. Ce sont des connecteurs coaxiaux dont l'impédance caractéristique est de 50Ω . Un exemple de cette interface permanente est représenté sur la Figure 5.1b.

Cette interface, bien qu'intéressante pour effectuer les mesures sur un dispositif finalisé, n'est pas viable pour la caractérisation de grandes séries d'échantillons. Nous avons donc réalisé un module de test temporaire comprenant des pointes à ressort sur un PCB déplacé grâce à une table de positionnement 3 axes (Figure 5.1a). Le circuit est constitué d'un large plan de masse permettant d'éviter les effets d'antennes. Dans ce cas de figure, les étalons

pour la calibration sont réalisés sur un circuit imprimé dédié sur lequel nous avons un circuit ouvert, une piste pour le circuit fermé et une résistance de précision SMR1DZ (*Vishay*) de 50Ω pour la calibration en charge (Figure 5.1c).

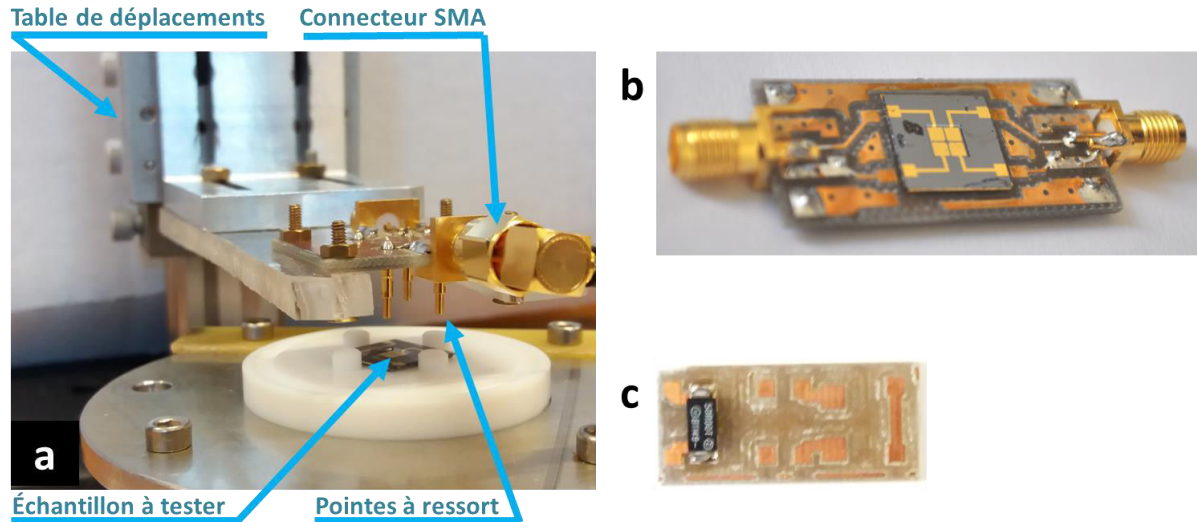


Figure 5.1: Photographies (a) du module de test temporaire, (b) d'une interface de test permanente et (c) du circuit de calibration

Programmes d'acquisition et de commande :

Une interface graphique en langage Matlab® et une interface en langage Labview® ont été réalisées par des étudiants stagiaires ingénieurs pour respectivement l'analyseur HP 4395A et HP 4194A^{218,319}.

Le programme Matlab permet via une interface graphique :

- la commande de l'analyseur et la configuration de ses paramètres d'acquisition (Figure 5.2a)
- l'affichage des données de mesure (Figure 5.2b)

Les paramètres contrôlables sont entre autre :

- la plage de fréquence balayée
- le nombre de points pour la mesure
- la bande passante
- la tension de polarisation
- le mode de représentation des mesures (amplitude de l'impédance, phase de l'impédance, amplitude de l'admittance...)
- et la gestion de la calibration (commandes de calibration en circuit ouvert, fermé et charge)

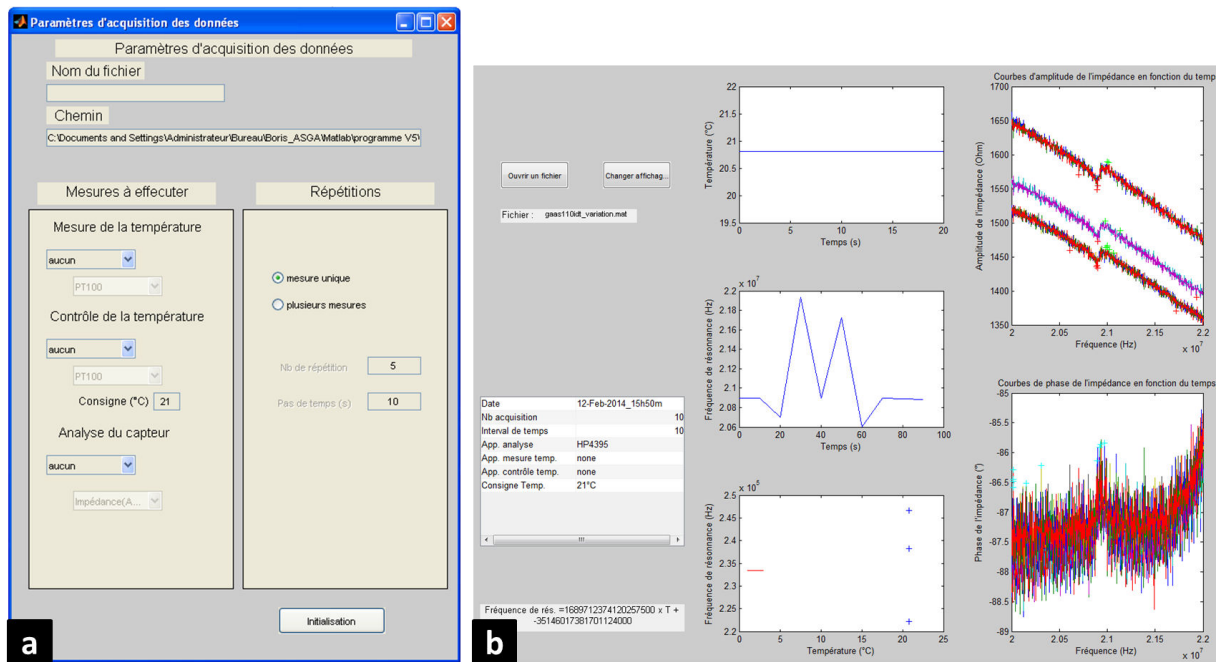


Figure 5.2: Interface graphique du programme d'acquisition et de contrôle sous Matlab® : (a) fenêtre de réglage des paramètres d'acquisition et (b) fenêtre d'affichage des résultats

De plus l'interface est capable de gérer des analyses en température. Il est nécessaire pour cela de disposer d'un régulateur, d'un élément chauffant et d'une sonde de température interfacés avec l'ordinateur. Nous détaillerons ce montage dans la partie correspondante (partie 5.4.1).

Il est aussi possible, grâce à cette interface de réaliser soit une mesure unique soit une séquence de plusieurs mesures à un intervalle de temps spécifié.

Les résultats d'acquisition peuvent être présentés sous différentes formes :

- l'amplitude de l'impédance/admittance en fonction de la fréquence
- la phase de l'impédance/admittance en fonction de la fréquence
- la fréquence de résonance en fonction du temps (pour les analyses de séquence)
- la température en fonction du temps (pour les analyses en température)
- la fréquence de résonance en fonction de la température (pour les analyses en température)

5.2.2 Mesures vibrométriques

Nous avons réalisé une étude vibrométrique par interférométrie optique du résonateur afin d'étudier les composantes des modes de cisaillement hors plan. Pour cette analyse, nous

avons employé un dispositif de mesure basé sur une sonde hétérodyne. Il est composé d'un interféromètre hétérodyne (*B.M. industrie*), d'un analyseur de réseau HP3577B (5MHz – 200MHz), d'un amplificateur à détection synchrone et d'une table de déplacement XY motorisée, l'ensemble étant interfacé avec un ordinateur (Figure 5.3a et b).

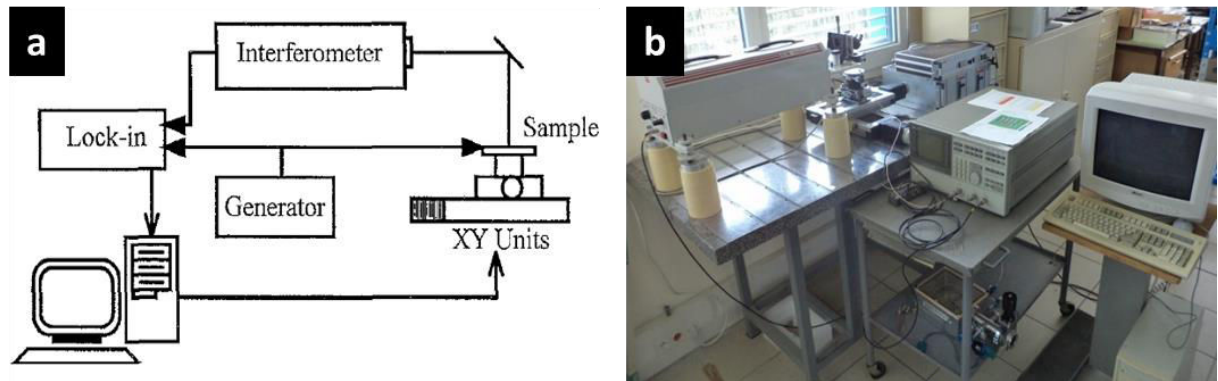


Figure 5.3: (a) Schéma de principe et (b) photographie du système de mesure vibrométrique par interféromètre à sonde hétérodyne³²⁰

5.2.3 Mesures en milieu liquide

Un module fluide a été conçu pour permettre de réaliser les tests du dispositif en milieu liquide sans avoir recours à un scellement de la cavité membranaire comme cela a été présenté dans le chapitre 2. Ce module permet de maintenir l'échantillon sur un support fluide en téflon qui peut être approvisionné par un liquide quelconque, il est représenté sur la Figure 5.4. Ce module fluide pourra de surcroit être employé pour la fonctionnalisation des échantillons sans immersion. Les matériaux en contact avec les liquides bénéficient, en effet, d'une large compatibilité chimique (support en téflon, joint torique en EPDM et tubes en PEEK). Les tubes microfluidiques sont positionnés et maintenus par un connecteur 4 voies (*Dolomite*) positionné en dessous du plateau. Deux perçages de 0.6µm de diamètre traversent le support fluide en téflon en face des tubes microfluidiques. Un méplat et des goupilles sont utilisés pour aligner le support et le capot avec le connecteur fluide.

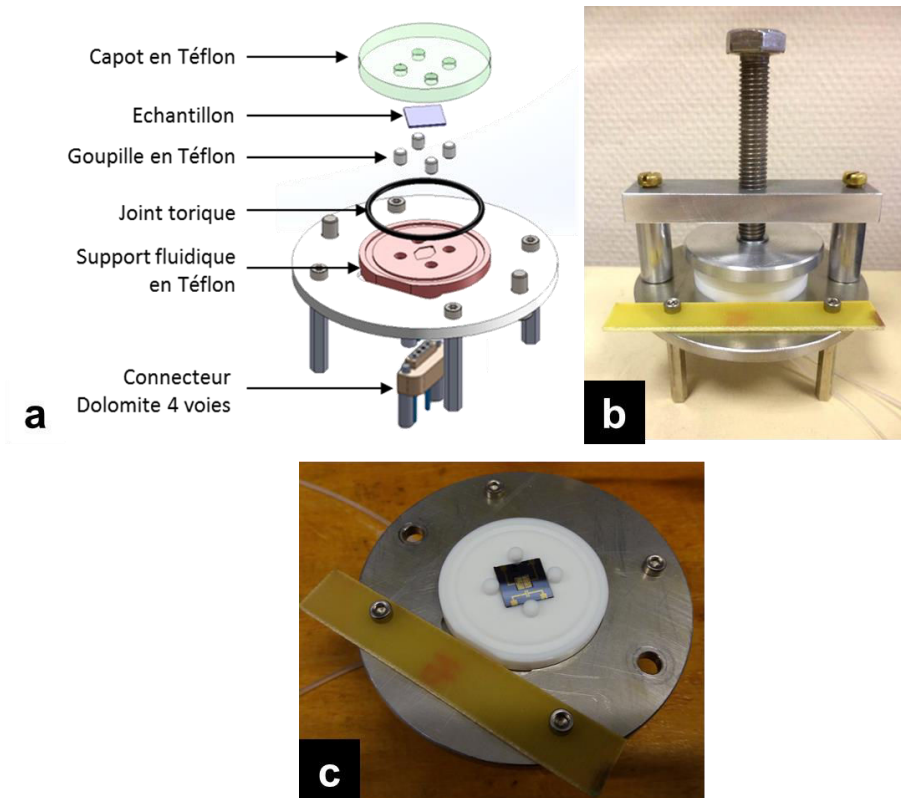


Figure 5.4: Module fluide pour les tests en milieu liquide (a) Schéma (b) photographie et (c) zoom sur la platine porte échantillon

5.3 Caractérisation électrique et vibroacoustique du résonateur

5.3.1 Séries de transducteurs fabriquées

Un certain nombre de structures de transducteurs a été fabriqué au cours de ces travaux, nous avons indiqué dans le Tableau 5.1, le récapitulatif des séries de transducteurs. En général, chacune de ces séries inclue au moins un résonateur pour chaque configuration d'électrodes excepté la série A qui a été réalisé avec un précédent design (sur wafer 2 pouces). Les épaisseurs du matériau massif (avant la gravure) et de la membrane sont données par les valeurs h_{bulk} et h_{memb} . Les épaisseurs des wafers ont été mesurées au comparateur et les épaisseurs de membrane ont été calculées en déduisant la profondeur de gravure mesurée au profilomètre. Les dimensions P_1 et P_2 , correspondent respectivement aux profondeurs de gravure inférieure et supérieure de la membrane (face avec les électrodes). Dans certains cas, les membranes ont été gravées que sur une face (séries A et F), tandis que pour d'autres échantillons il n'y a eu aucune gravure (séries B et G). Les séries E et F sont issues du même wafer, mais les transducteurs de la série F ont été gravés seulement une seule fois et que sur une face ce qui n'est pas le cas de la série E. Comme

nous avons pu le voir dans le chapitre 2, les variations d'épaisseur de membranes induites par la gravure humide sont importantes d'un échantillon à un autre sur un même wafer.

Série	Vendeur	Ref. wafer	Ø (po)	h_{bulk} (µm)	P_1 (µm)	P_2 (µm)	h_{memb} (µm)
A	Azelis	-	2	271	114	-	157
B	AXT	AU243 72	3	622 ± 1.6	-	-	622 ± 1.6
C	AXT	AU243 77	3	626.9 ± 1.1	166.2 ± 1.5	370.0 ± 12.5	84.9 ± 15.1
D	AXT	AU243 79	3	630.2 ± 1.8	214.4 ± 7.8	144.7 ± 5.7	271.1 ± 15.3
E	AXT	AU243 80	3	611 ± 0.8	341.4 ± 5.4	215.7 ± 6.5	53.9 ± 12.7
F	AXT	AU243 80*	3	611 ± 0.8	341.4 ± 5.4	-	269.6 ± 6.2
G	AXT	AU243 81	3	627.4 ± 0.5	-	-	627.4 ± 0.5

* Le wafer AU243 80 s'est cassé en deux entre les deux étapes de gravure, certains échantillons séparés n'ont été gravés que sur une seule face.

Tableau 5.1: Séries d'échantillons fabriqués et testés au cours de ces travaux

5.3.2 Tests des résonateurs pour différentes épaisseurs de membrane

Afin de valider le modèle théorique, nous avons mesuré des résonateurs avec différentes épaisseurs de membrane et selon plusieurs harmoniques. Nous avons utilisé une seule et même géométrie d'électrode pour cette série de tests, celle présentée dans la Figure 2.26 du chapitre 2. Sur la Figure 5.5 sont représentés quatre exemples de mesures d'impédance en module et en phase autour de la fréquence fondamentale du mode de cisaillement d'épaisseur ou de la 7^{ème} harmonique. Les mesures sont réalisées sur un échantillon massif d'épaisseur 622µm (série A) et deux échantillons à membrane encastrée de 266µm (série D) et 62µm (série E). Les valeurs de facteur de qualité et de fréquence des résonances mesurées sont comparées avec les valeurs calculées à partir de l'épaisseur de membrane (Tableau 5.2).

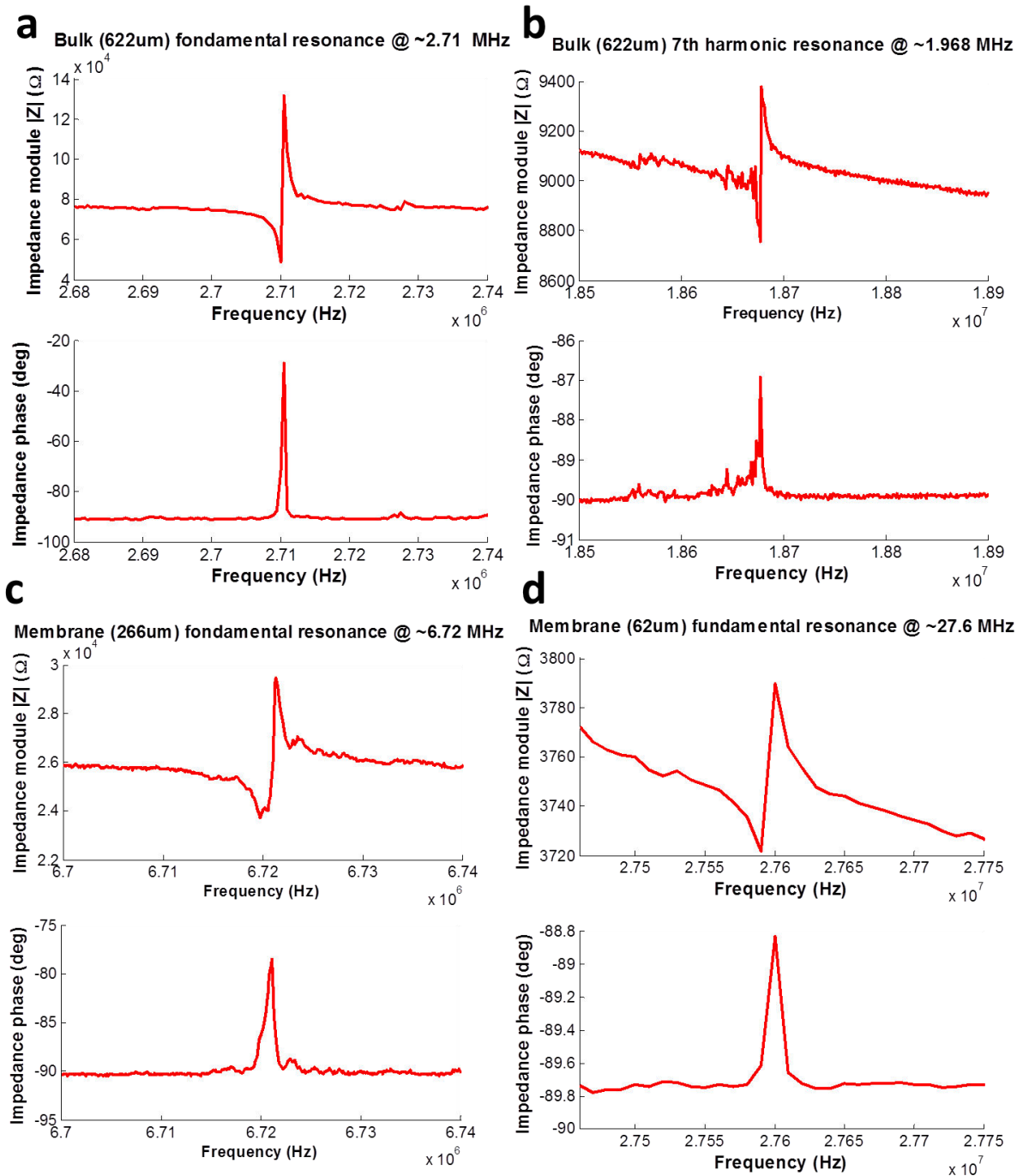


Figure 5.5 : Mesures d'impédance en module et en phase du mode de cisaillement pour un échantillon massif (série B) (a) à sa fréquence fondamentale et (b) à sa 7^{ème} harmonique et (c-d) pour deux membranes à respectivement 266µm (série D) et 62µm (série E)

Le coefficient de qualité est calculé avec l'équation (5.1) et en collectant les fréquences de résonance (ou fréquence de résonance série, f_s) et d'anti-résonance (ou fréquence de résonance parallèle f_p) sur le tracé du module d'impédance.

$$Q = \frac{f_s}{\Delta f_s} \quad (5.1)$$

Les valeurs $\Delta\phi$ et R_m correspondent respectivement à l'amplitude du pic de phase et la résistance à la fréquence de résonance. Nous avons utilisé les équations (2.25) et (2.40) pour calculer respectivement la valeur de la fréquence de résonance théorique f_{s_th} à partir de l'épaisseur de la plaque résonante et la valeur du facteur de qualité Q_{th} .

Epaisseur mesurée	Valeurs mesurées					Valeurs calculées à partir de l'épaisseur	
	f_s (MHz)	f_p (MHz)	$\Delta\phi$ (°)	R_m (k Ω)	Q	f_{s_th} (MHz)	Q_{th}
622	2.71	2.7105	60.69	48.8	5420	2.68	661554
622	18.6775	18.6787	3.07	8.76	14942	18.81	94508
266	6.71975	6.72138	11.5	23.72	4135.2	6.27	282915
62	27.59	27.60	1.17	3.72	2759	27	65942

Tableau 5.2: Valeurs caractéristiques expérimentales et théoriques (calculées à partir de l'épaisseur du résonateur et des propriétés du GaAs) des résonateurs d'épaisseur 622 μ m, 266 μ m et 62 μ m

Les fréquences de résonance des dispositifs testés sont proches des valeurs calculées théoriquement, on remarque cependant que plus l'élément est fin plus l'écart est prononcé. Les valeurs expérimentales des facteurs de qualité sont en revanche bien inférieures aux estimations théoriques. Il pourrait y avoir plusieurs raisons, nous pensons que le coefficient de pertes mécaniques utilisé dans les calculs et tiré de la littérature¹⁸⁵ est peut être sous-estimé. De plus les mesures ont été effectuées en air et non sous vide ce qui atténue sensiblement la valeur de Q. Déjà un précédent rapport¹⁹⁷ utilisant $\eta = 10^{-2} \text{ kg.m}^2.\text{s}^{-1}$ fait état d'un facteur de qualité expérimental plus faible que ce qu'il devrait être en théorie. Le wafer massif (série B) utilisé dans les mesures n'a, à aucun moment, été gravé. Il y aurait dans ce cas la présence d'une couche amorphe en surface de l'échantillon formé lors de la découpe et du polissage mécanique des wafers. Cette structure amorphe pourrait être responsable du faible facteur de qualité obtenu. Notons toutefois que lors de l'utilisation de membrane gravée sur ses deux faces cette couche ne peut pas être tenue pour responsable des pertes. Mais, selon nous, la raison la plus probable de la différence obtenue entre la théorie et les mesures expérimentale est que le modèle analytique n'est pas suffisamment précis et ne prend pas en compte la résistance dû aux contacts électriques et aux pertes diélectriques.

5.3.3 Impact de la géométrie des électrodes

Notre étude portant sur la géométrie des paires d'électrodes a été réalisée sur des dispositifs non usinés, c'est-à-dire sans membrane, pour des raisons de reproductibilité de mesure. En effet, nous voulons éviter de rajouter aux incertitudes de mesure, les variations de la réponse liées aux usinages mal contrôlés entre deux dispositifs distincts. Nous avons donc utilisé le wafer de la série G ayant une épaisseur de $[627.4 \pm 0.5] \mu\text{m}$.

Nous avons étudié l'impact sur la fréquence de résonance des 5 géométries d'électrodes représentées sur la Figure 5.6. Elles diffèrent par leur largeur, l'espacement entre les électrodes et leur forme.

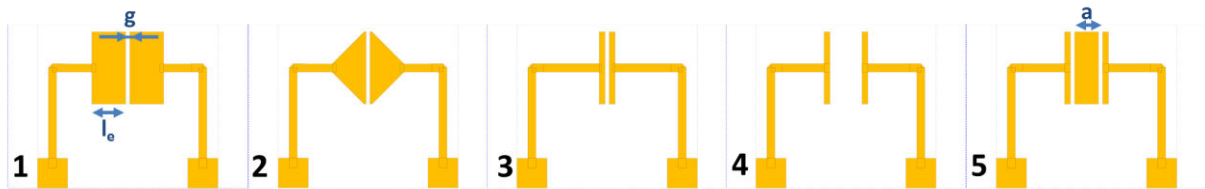


Figure 5.6: Géométries d'électrodes étudiées

Les géométries 1 et 2 ont des largeurs d'électrode I_e de $1700 \mu\text{m}$ tandis que les suivantes ont une largeur de $300 \mu\text{m}$. Les configurations 1, 2 et 3 ont une distance inter-électrode g de $200 \mu\text{m}$ alors que pour les géométries 4 et 5, g est de $1600 \mu\text{m}$. Enfin, sur la configuration 5, une zone métallisée de largeur a de $1200 \mu\text{m}$ est disposée entre les deux électrodes et espacée de chacune d'elle de $200 \mu\text{m}$.

Nous allons, pour chacune d'elles, étudier :

- la position en fréquence du pic de résonance sur le mode fondamental,
- l'amplitude du pic de phase pour cette fréquence,
- le nombre de pics parasites aux alentours de cette fréquence (à $\pm 50 \text{kHz}$)
- la reproductibilité des mesures d'un échantillon à un autre.

Pour ces tests, nous nous sommes focalisés uniquement sur les mesures en phase de l'impédance. Nous avons donc mesuré ces paramètres sur 4 mesures pour chaque type d'électrodes.

Sur la Figure 5.7a, nous constatons que les géométries 1, 2 et 5 sont préférable pour limiter le nombre de pics parasites. Cela peut être expliqué par la grandeur des zones métallisées. Il a été démontré qu'il est possible de confiner les modes de cisaillement d'épaisseur générés par excitation latérale dans la région centrale par l'ajout d'une charge massique¹⁸⁶ ou par l'augmentation de l'épaisseur des électrodes métalliques³²¹. Dans les travaux de

Wenyan Wang, cette charge massique est réalisée par la métallisation de la région entre les deux électrodes et il montre expérimentalement la réduction des modes parasites¹⁸⁶. Nous pensons donc que l'utilisation d'électrodes larges comme dans les géométries 1 et 2 ou l'ajout d'une charge massique (géométrie 5) favorise ce phénomène de piégeage.

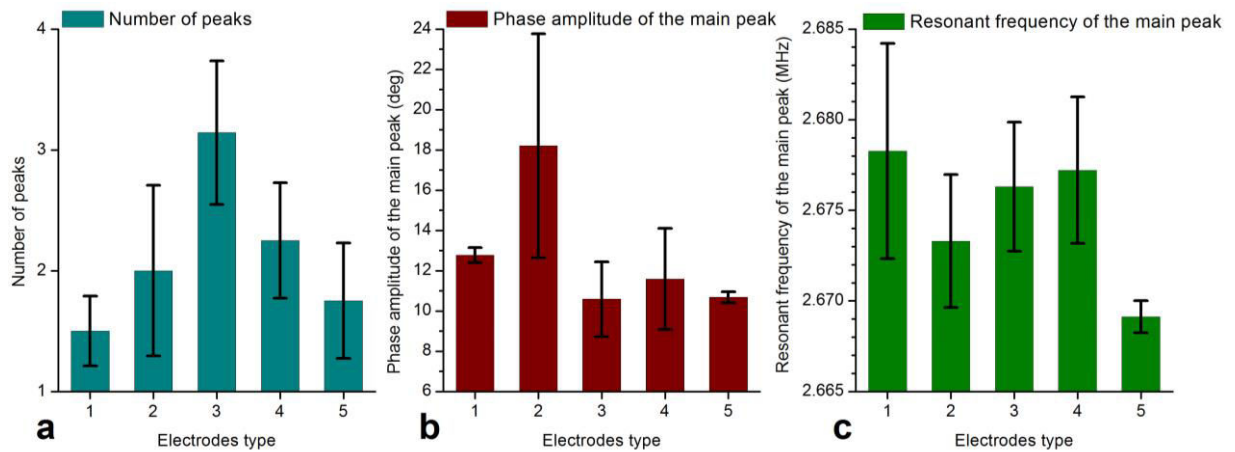


Figure 5.7: (a) Nombre de pics présents à ± 50 kHz du pic de résonance principal, (b) phase et (c) fréquence du pic principal sur des mesures de phase d'impédance selon le type d'électrodes

La Figure 5.7b montre que l'amplitude de phase de l'impédance est la plus élevée pour la géométrie 2 bien que l'écart-type sur les mesures soit très élevé. En revanche, les géométries 1 et 5 montrent une plutôt bonne reproductibilité sur les mesures. La Figure 5.7c nous indique que même issu d'un même wafer (et qui plus est non-usiné), la fréquence de résonance varie d'un échantillon à un autre sur une gamme allant de 2.668 MHz à 2.684 MHz. En mesurant les épaisseurs des wafers avant leur utilisation, nous remarquons une variation de $\pm 1.643 \mu\text{m}$ correspondant, pour une épaisseur totale de $[625 \pm 25] \mu\text{m}$, à une fluctuation de ± 0.014 MHz de la fréquence de résonance (rang fondamental). Ce point permet d'expliquer l'écart de fréquence observé lors des mesures. Nous avons réutilisé le modèle de simulation construit dans le chapitre 2 afin de tester les géométries 1, 3 et 4. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 5.3.

Géométrie d'électrode	1	3	4
f_s (MHz)	2.404	2.406	2.398
$\Delta\Phi_Z$ (deg)	2.8	2.6	7.5
Déplacement (pm)	29.6	29.6	8.22

Tableau 5.3: Valeurs caractéristiques obtenues par FEM pour différentes configurations d'électrodes

La simulation ne permet pas d'évaluer la présence de pics parasites car l'épaisseur de l'élément résonant est considéré comme uniforme et les contraintes aux limites sont quant à elles idéales (présence des PMLs). Cependant, la simulation montre qu'un petit gap semble préférable et permettra d'obtenir un plus fort déplacement de la membrane à la vibration.

Nous avons choisi de réaliser les prochaines mesures avec la configuration d'électrodes de type 1 qui à la résonance présente peu de pics parasites et une plutôt bonne reproductibilité de sa réponse.

5.3.4 Caractérisation des composantes hors plan à l'aide du vibromètre

L'analyse vibrométrique par sonde hétérodyne du transducteur nous donne uniquement les déplacements de la membrane en Z. En effet, excepté quelques systèmes récents (par exemple le MSA-100-3D de *Polytec*), la plupart des systèmes de mesure vibrométrique ne permet pas d'obtenir une analyse des déplacements dans le plan. Ces modes dont les déplacements sont hors plan peuvent être employés à des fins de métrologie de la membrane. Ils apportent, comme perspective aussi, la possibilité de générer d'autres types d'ondes tels que les ondes de Lamb. Ces derniers modes peuvent être utilisés en combinaison avec les modes de cisaillement, pour analyser les propriétés physiques (viscosité par exemple) d'un liquide biologique. D'autres de ces modes de flexion peuvent être employés pour de « l'activation acoustique », c'est-à-dire pour favoriser des mélanges au sein du liquide en contact avec le résonateur et ainsi augmenter le rendement du greffage avec la surface fonctionnalisée³²². Mais notre intérêt s'est porté sur la mesure des composantes de vibration hors plan pour la fréquence fondamentale du mode de cisaillement d'épaisseur. Nous observons effectivement sur la Figure 5.8, l'apparition de ces composantes non présentes dans les simulations FEM précédentes (chapitre 2). Le transducteur étudié est doté d'une membrane de 157 μm d'épaisseur et de 4x4mm² de surface (série A). La visualisation observée sur la Figure 5.8 montre le module (mm) et la phase (deg) du déplacement de cette composante hors plan sur une surface de 1x0.9mm² mesurée au centre de la membrane. Ces déplacements hors plan résultent de contraintes générées au sein de la membrane par les encastresments. On peut prédire, dès lors, que la perte d'énergie associée à cet encastrement va provoquer une atténuation des amplitudes du mode de vibration en cisaillement.

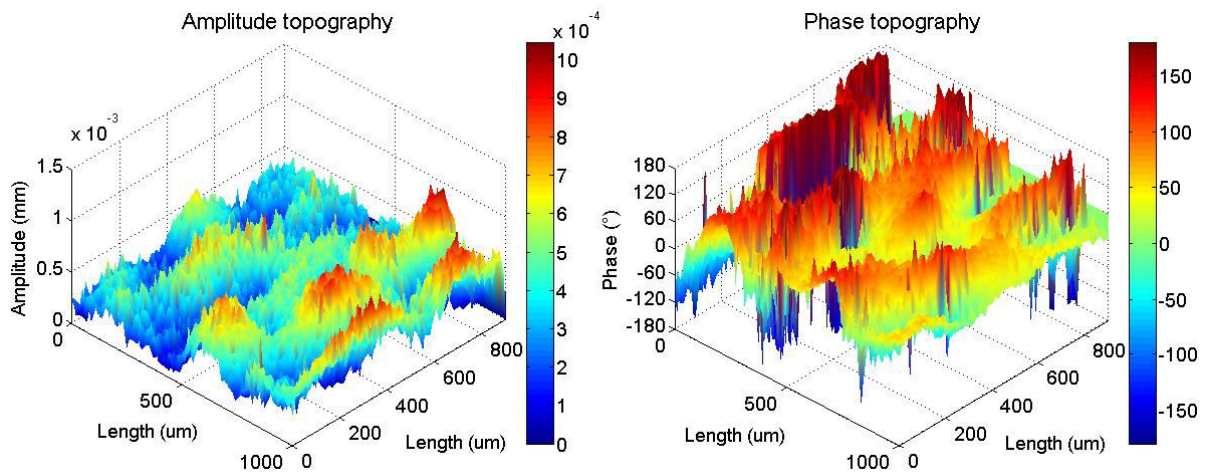


Figure 5.8: Module et phase de la composante hors plan du déplacement pour un mode fondamental de cisaillement d'épaisseur

5.4 Caractérisation du résonateur dans des milieux variés

5.4.1 Déviation en température

Etant donné que les fréquences des modes de cisaillement d'épaisseur dépendent des propriétés mécaniques du matériau (coefficients d'élasticité...), elles-mêmes dépendantes de la température, il est alors naturel de s'intéresser à la variation de la fréquence de résonance en fonction de la température.

Afin d'observer ces variations, nous avons élaboré un montage permettant la régulation du transducteur en température dans une plage allant de 23°C à 62°C (Figure 5.9). Nous avons employé ici des dispositifs fixés sur des interfaces électriques permanentes. Sur le circuit imprimé, à proximité du transducteur en GaAs, nous plaçons une sonde PT100 CMS Classe A (*Innovative Sensor Technology*). Cette sonde va permettre la mesure de la température du dispositif par l'intermédiaire d'un régulateur REG24 (REG24TP1RHU, de *Schneider Electric*). Ce dernier est connecté à une résistance chauffante de 15W et communique avec l'ordinateur par USB. L'ensemble du montage est confiné dans une chambre thermique en polystyrène afin de réduire les pertes par convection et limiter les éventuelles différences de température entre le dispositif et la sonde.

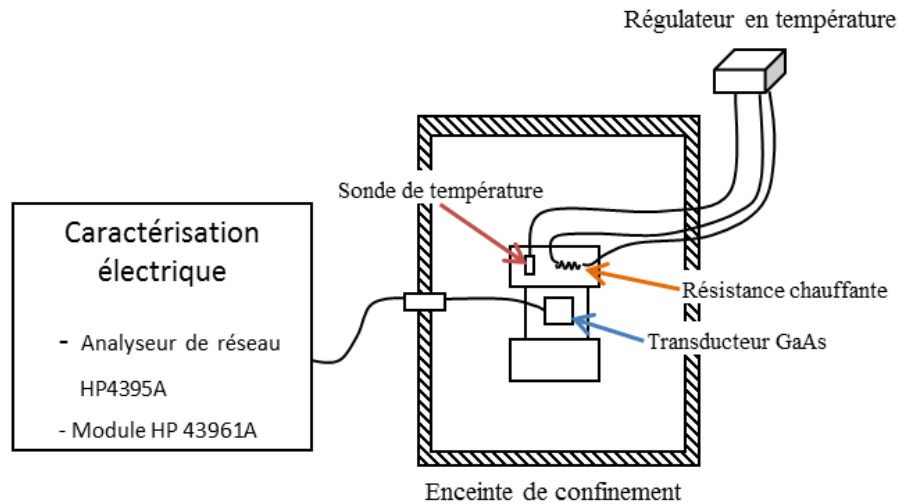


Figure 5.9: Schéma du montage de régulation en température

L'échantillon mesuré est doté d'une membrane d'environ $80\mu\text{m}$ d'épaisseur (série C) et a une fréquence de résonance à température ambiante de 20.135MHz (Figure 5.10a). Une variation de température contrôlée de 23°C à 62°C avec une rampe d'environ $4^\circ\text{C}/\text{min}$ est appliquée à l'échantillon. Nous obtenons une variation en fréquence de $-1179\text{ Hz}/^\circ\text{C}$ correspondant à une déviation de $-58.8\text{ppm}/^\circ\text{C}$ (Figure 5.10b). Cette valeur est proche de la déviation en température obtenue par la simulation FEM (pour rappel : $-60.2\text{ppm}/^\circ\text{C}$).

Ces valeurs sont courantes pour les matériaux anisotropes¹⁹⁰. Nous avons observé, la même déviation en température pour d'autres échantillons d'épaisseur plus grande. De plus, la dépendance en température est linéaire sur la gamme de fréquence testée. Cela rend le dispositif intéressant pour la mesure de température. De part cette linéarité et cette reproductibilité entre plusieurs échantillons, il est possible sans trop de difficultés, de compenser cette déviation pour des mesures d'événements biologiques. On peut adapter l'électronique d'interface pour réaliser une mesure différentielle à laquelle on peut ajouter un facteur de correction dans le traitement numérique des données en post-acquisition.

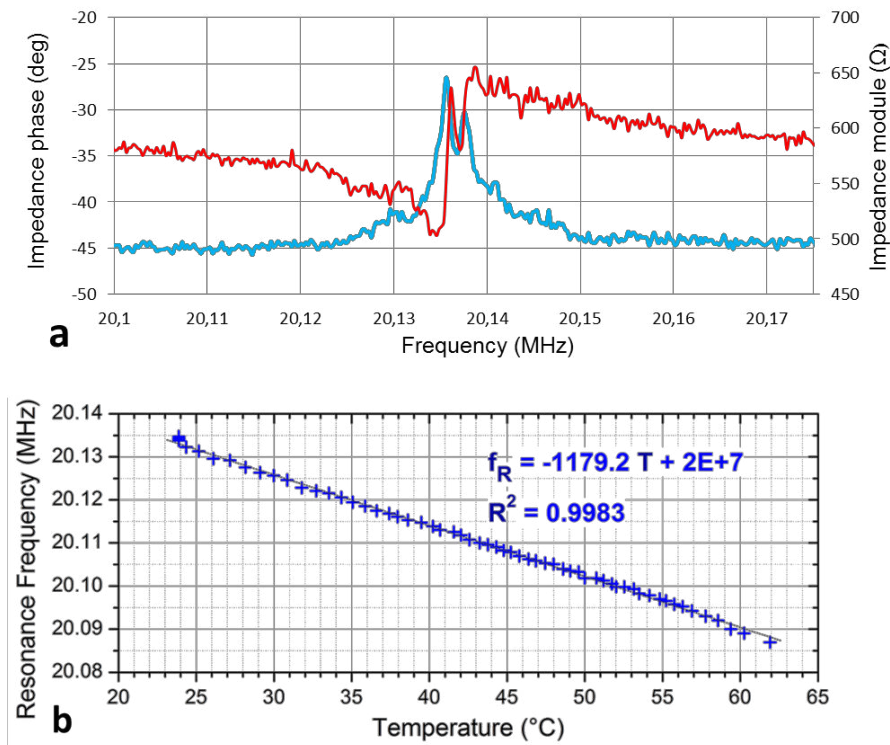


Figure 5.10: (a) Module (rouge) et phase (bleu) de l'impédance en fonction de la fréquence et (b) variation de la fréquence de résonance en fonction de la température (échantillon de la série C)

5.4.2 Impact du support sous le résonateur et considération électrique

Nous avons remarqué au cours de nos tests, que selon le type de support sur lequel est posé l'échantillon, la réponse du résonateur n'est pas la même. L'expérience suivante a été conduite sur deux échantillons identiques issus de la série B et à température ambiante de 21 $^{\circ}\text{C}$. Les échantillons sont placés sur des matériaux ou couches minces dotés de propriétés électriques de surface différentes. Ces substrats ont été préalablement caractérisés avec une station de caractérisation de la conductivité en 4 pointes. La gamme de conductivité mesurée s'étend de 10^{-23}S/m à 10^7S/m . Les courbes de module et de phase de l'impédance, ont été représentées sur la Figure 5.11a. La Figure 5.11b montre l'évolution de la ligne de base du module d'impédance et de l'amplitude du pic à la résonance en fonction de la conductivité des supports testés. Nous observons une diminution à la fois de la ligne de base et une atténuation du pic de résonance en fonction de la conductivité.

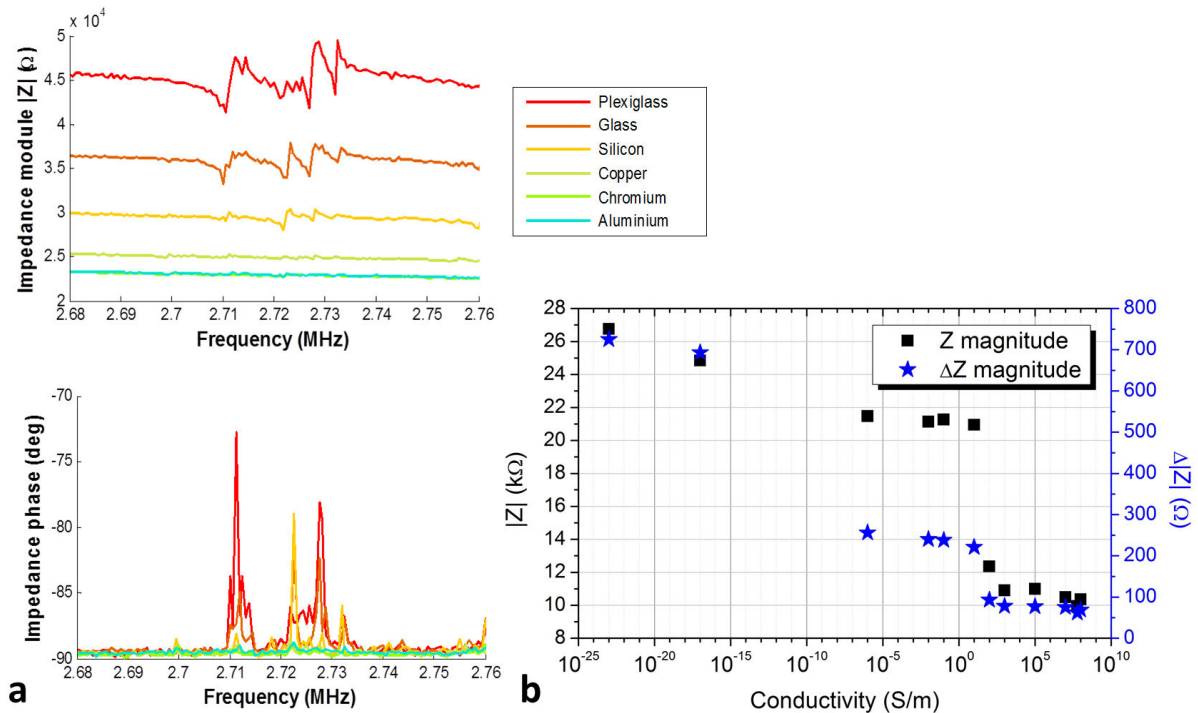


Figure 5.11: (a) Spectres en phase et module pour différents supports et (b) valeur du module d'impédance (noir) et de l'amplitude du pic de module (bleu) à la fréquence de résonance en fonction de la conductivité des supports.

Le signal souffre d'une forte atténuation lorsque les mesures sont effectuées sur un support de nature plus conducteur à l'inverse d'un support isolant. Cela implique que la réponse du résonateur est dépendante des paramètres diélectriques et de conductivité de l'environnement de la mesure. En effet, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 2, ces deux paramètres vont devenir importants lorsque le champ électrique n'est pas suffisamment confiné dans la membrane et entre les électrodes. Or notre objectif est de réduire l'épaisseur de la membrane résonante pour augmenter la sensibilité de notre dispositif. Arnau-Vives et al.⁵⁶ mentionne que le rapport entre l'épaisseur du cristal et le gap des électrodes doit être aux alentours de 3 – 6. Donc pour une membrane de 50 μm d'épaisseur, notre objectif, nous devons avoir un gap maximum de 17 μm . Les technologies de lithographie utilisées (spraycoating) et le procédé mis en place rendent difficile l'obtention d'une telle résolution pour le gap.

Afin de limiter les effets de l'environnement de mesure, deux choix s'imposent, soit réaliser des membranes plus épaisses tout en réduisant au maximum le gap entre les électrodes ou soit développer une technologie de microfabrication plus robuste mais également plus onéreuse pour la conception du capteur.

5.4.3 Impact des propriétés mécaniques et électriques d'un liquide en contact avec le GaAs

Notre intérêt, vis-à-vis de l'application ciblée, est de pouvoir effectuer des mesures en milieu liquide et si possible dans un tampon biologique adapté. Or, de précédents travaux ont confirmé les effets négatifs que peuvent avoir les propriétés viscoélastiques des liquides sur le facteur de qualité du résonateur³²³. Dans cette étude, nous souhaitons mettre en évidence l'impact des paramètres électriques du milieu en contact avec le transducteur, dans le cas présent, d'une électrolyte. Nous avons donc décidé de mesurer l'effet d'une solution d'eau salée à différentes concentrations de NaCl. A faible concentration, d'après Hasted et al., la conductivité de la solution suit la relation linéaire suivante³²⁴ :

$$\sigma = 0.06 + 9.5 C \quad (5.2)$$

où C est la concentration de NaCl en mol.L^{-1} et σ la conductivité en S.m^{-1} .

La permittivité, quand à elle, varie très peu sur cette gamme de concentration et sera considérée comme constante³²⁵.

Nous avons préparé quatre volumes de 40mL d'eau déionisée et avons ajouté dans trois d'entre eux respectivement 100mg, 250mg et 500mg de NaCl. Les molarités et les propriétés de conductivité ont été calculées et sont indiquées dans le Tableau 5.4.

Masse de NaCl ajoutée (mg)	Molarité (mmol.L^{-1})	Conductivité (S/m)
0	0	0.06
100	43	0.46
250	107	1.07
500	214	2.09

Tableau 5.4: Molarités et conductivités des solutions préparées

Nous avons procédé aux essais du transducteur en milieu liquide en mettant en contact la surface inférieure de la membrane du transducteur avec ce milieu. Nous rappelons que cette surface est nue, c'est-à-dire sans fonctionnalisation. Nous avons comparé la réponse en impédance pour chacune des solutions préparées précédemment. Nous avons tracé la

valeur du module et l'amplitude du pic d'impédance à la résonance en fonction de la conductivité de chaque solution sur la Figure 5.12.

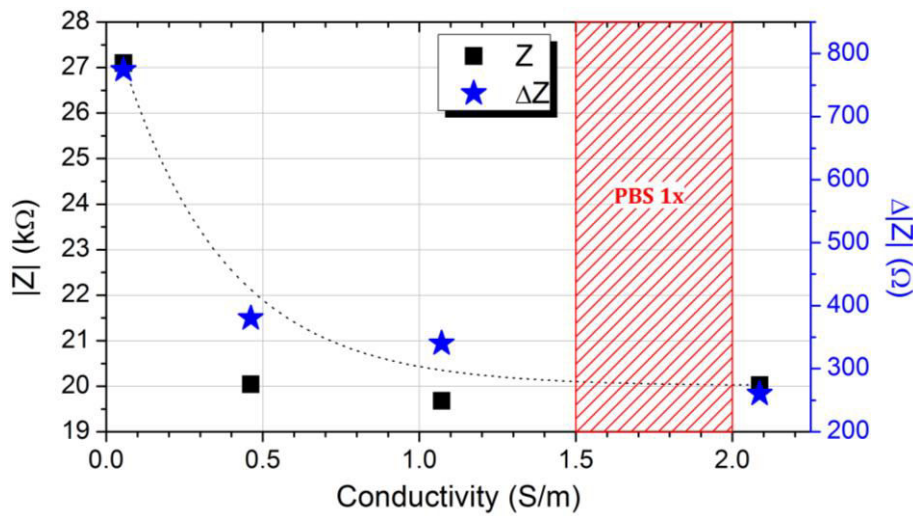


Figure 5.12: Module de l'impédance à la résonance en fonction de la conductivité de l'électrolyte en contact avec le résonateur

On peut observer une rapide atténuation de l'amplitude des pics de résonance avec l'ajout de NaCl dû à l'augmentation de sa conductivité. Le transducteur ainsi testé est donc beaucoup trop sensible aux paramètres électriques de l'électrolyte. Comme annoncé dans le chapitre 2, cette sensibilité limite fortement l'efficacité du capteur dans les analytes liquides. La concentration de NaCl dans une solution physiologique, par exemple, est généralement de 9 g.L^{-1} donnant une conductivité de 1.52 S.m^{-1} . On peut en conclure que l'efficacité du transducteur dans sa configuration actuelle sera peu efficace dans une solution physiologique. Il est toutefois possible de jouer sur ces paramètres géométriques pour limiter les effets négatifs. Pour abaisser la pénétration du champ électrique dans le milieu, il suffit de réduire le gap des électrodes cependant en le réduisant, la résistance motionnelle du résonateur augmente ce qui induit une perte de sensibilité. Cet aspect pourra faire l'objet d'études numériques ou analytiques approfondies menant à de meilleures perspectives. Il s'agira de déterminer notamment le bon rapport gap / épaisseur de membrane, afin d'optimiser la sensibilité du dispositif sans qu'il soit affecté par les paramètres électriques de l'environnement extérieur.

5.5 Perspectives pour la détection de bactéries

Le nombre de bactéries immobilisées par unité de surface a été évalué par microscopie en champ sombre sur trois architectures de biointerface sélectionnées parmi celles étudiées dans le chapitre 3 : MHDA, MHDA:MUDO (1:9) et PEG-Biotin. Le taux de couverture de bactéries a été moyenné sur 3 échantillons pour chaque architecture et pour deux analytes de concentration différente. Les échantillons de GaAs ont été préalablement fonctionnalisés et préparés selon la procédure indiquée dans le chapitre 3, jusqu'aux étapes d'immobilisation de l'anticorps anti-*E. coli* et le blocage à la BSA. Ils ont été ensuite immergés pendant 1h dans une solution de PBS 1x contenant 10^5 CFU/mL ou 10^7 CFU/mL de bactéries *E. coli*. De façon à retirer les bactéries physisorbées sur la surface les échantillons ont été rincés plusieurs fois avec une solution de PBS 0.1x. Une solution saline plus diluée a été utilisée pour minimiser la présence de sels, également visibles en champ sombre. Le nombre de bactéries a été évalué par comptage via l'algorithme Matlab « **cellc** » (disponible sous licence gpl sur <http://www.mathworks.com>) sur un total de 20 images (objectif : 50x) prises aléatoirement sur la surface du substrat (Figure 5.13a).

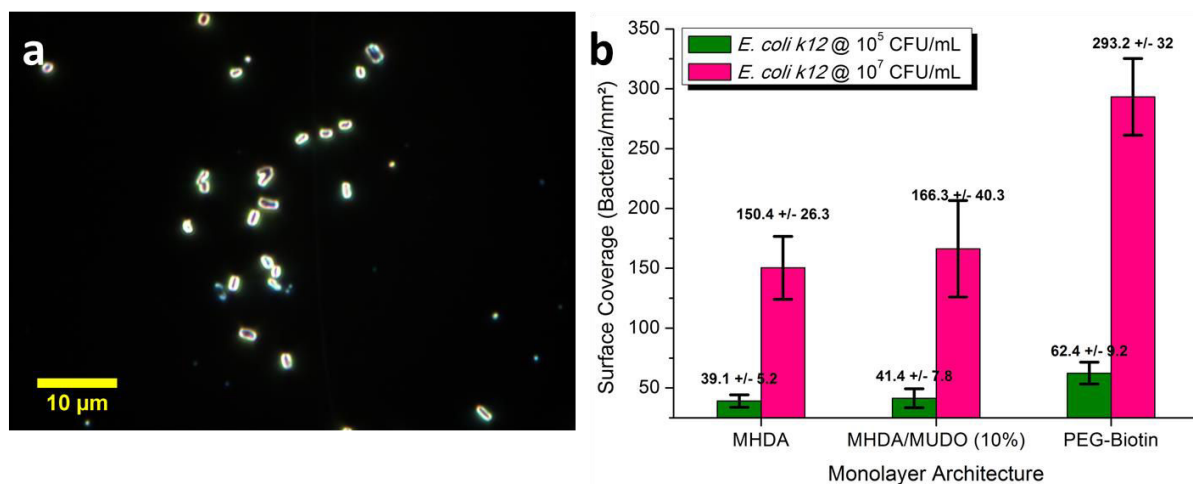


Figure 5.13: (a) Exemple d'image au microscope de bactéries *E. coli* immobilisées sur la surface d'un échantillon de GaAs (fonctionnalisé avec l'architecture PEG-biotin) et (b) taux de couverture par mm² de la bactérie *E. coli* sur les trois architectures : MHDA, MHDA:MUDO (1:9) et PEG-biotin

En accord avec les résultats obtenus dans le paragraphe 3.8.2 indiquant un taux de couverture d'anticorps supérieur pour les architectures PEG-Biotin, le taux de couverture de bactéries observé sur cette même architecture est également supérieur (Figure 5.13b). En revanche, on ne voit pas de différences significatives entre les architectures MHDA et

MHDA:MUDO (1:9). Nous expliquons la faible différence de densité de l'architecture mixte par rapport à l'architecture homogène, par la taille et le type d'objets immobilisés. Effectivement, les auteurs, qui étudient l'efficacité des monocouches mixtes, visent à immobiliser des protéines en tant qu'antigène donnant des densités de greffage relativement élevées en moyenne^{123,124}. Lors de l'immobilisation, il peut se former un tapis protéique où le nombre de sites de reconnaissance (anticorps) va influencer directement le taux de couverture de l'antigène. Or dans le cas d'un greffage d'objet plus volumineux (comme pour les bactéries), les variations de densité d'une surface à une autre vont être déterminées essentiellement par les propriétés de ces surfaces, telles que l'angle de contact, la charge surfacique et la rugosité. Les interactions cellule/surface sont complexes et ont fait l'objet d'étude par de nombreux auteurs³²⁶⁻³²⁸. Le modèle le plus employé est celui basé sur la théorie DLVO étendue (DLVO, du nom des auteurs Derjaguin, Verwey, Landau et Overbeek) combinant la théorie DLVO « classique » (stabilité des systèmes colloïdaux) avec une approche thermodynamique (incluant les interactions hydrophobe/hydrophile)³²⁶. Les différences de densité observées pour les trois architectures peuvent donc être expliquées par leur caractère plus ou moins hydrophile et par leur charge surfacique.

Si l'on considère, dans le meilleur des cas, une densité surfacique équivalente à 293.2 ± 32 bactéries/mm², on peut en déduire la masse équivalente du greffage sur une membrane de résonateur.

On obtient alors pour un échantillon greffé à partir d'une solution de 10^5 CFU/mL, une masse totale de :

$$\begin{aligned} m_{totale} &= d \times m_{E. coli} \times S = 293.2 \times 10^{-12} \times 16 \\ &= 772.8 \times 10^{-12} \text{ g} \simeq 4.69 \text{ ng} \end{aligned} \quad (5.3)$$

avec $m_{E. coli}$ la masse d'une bactérie *E. coli* équivalente à 1 pg ³²⁹ et S l'aire d'une membrane de $4 \times 4 \text{ mm}^2$.

La sensibilité du résonateur pour une membrane de $50 \mu\text{m}$ d'épaisseur a été évaluée numériquement¹⁹⁷ à 0.1 ng.Hz^{-1} . La déviation en fréquence serait alors de 46.9 Hz pour la fréquence fondamentale (33.36 MHz). Poitras et al. montrent expérimentalement avec un dispositif QCM-D, un décalage en fréquence de 0.21 Hz et de 42 Hz pour des concentrations respectives de 10^6 CFU/mL et 10^8 CFU/mL d'*E. coli*³⁷. Selon nos estimations, le capteur BAW en GaAs serait donc plus sensible se positionnant au niveau

des meilleurs systèmes commerciaux pour ce type de transduction. Les concentrations de bactéries utilisées restent toutefois, extrêmement élevées par rapport à l'état de l'art actuel (voir paragraphe 1.1). Afin de réduire cet écart, nous avons élaboré une unité de concentration en bactéries et de conditionnement de l'analyte, en amont pour diminuer la limite de détection fournie par l'ensemble du capteur et du préconditionnement. Cette unité permet de limiter les sources de perturbation du signal (élimination par filtration d'autres éléments que la bactérie visée) et d'optimiser la sensibilité du dispositif pour l'application de détection. Le montage, le schéma de principe et les résultats obtenus sont présentés dans l'annexe I.

5.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons testé le transducteur GaAs dans divers environnements. Les fréquences de résonance obtenues en air sont bien en accord avec les simulations FEMs et le modèle théorique exposés dans le chapitre 2. Nous avons retrouvé les pics de résonance correspondant aux modes de cisaillement pour le mode fondamental et ces harmoniques impaires. Nous avons observé les composantes hors plan de ces vibrations à l'aide d'un vibromètre à sonde hétérodyne. L'impact de la géométrie des électrodes a également été étudié, nous avons pu mettre en avant des géométries facilitant le confinement des modes de cisaillement et épurant le spectre de résonance autour du pic de fréquence recherché. Nous avons testé, le résonateur, en air et en liquide, et en variant quelques uns des paramètres environnementaux. Tout d'abord, nous avons évalué l'impact de la température sur la fréquence de résonance, phénomène qui peut être compensable électroniquement ou numériquement. Ensuite, l'impact de la conductivité du milieu en contact, sur la performance du capteur, a été examiné. Ce phénomène a été observé en air, en utilisant comme support du dispositif des matériaux de conductivité différente. Nous avons également observé ce phénomène en milieu liquide, au contact d'une électrolyte. Si la conductivité croît, la réponse du capteur est fortement atténuée, et en milieu liquide s'ajoutent les atténuations liées à la viscosité ou la densité du liquide. En perspective, il est nécessaire d'envisager davantage de tests et de simulations afin de déterminer les paramètres clés dans la géométrie du résonateur permettant de limiter ces effets. En particulier, les tests doivent être menés avec la présence de la biointerface sur le GaAs. Nous n'avons pas pu réaliser les tests avec des solutions bactériennes, mais nous avons toutefois estimé le décalage en fréquence induit par l'immobilisation de bactéries *E. coli*

sur la biointerface offrant le meilleur greffage. Bien que la sensibilité évaluée pour des solutions de concentration 10^5 et 10^7 CFU/mL semble supérieure à des systèmes commerciaux, la baisse de performance engendrée par l'analyte liquide complexe ne permettra pas de détecter convenablement les entités biologiques dans la configuration de membranes et d'électrodes actuelles (d'après les mesures préliminaires en liquide). Les tests effectués, en air ou en liquide, ont montré les limites du transducteur face aux variations éventuelles des paramètres électriques, thermiques et mécaniques. Cependant, à partir des résultats obtenus dans ce chapitre, nous pouvons proposer différentes stratégies afin d'améliorer les performances du biocapteur.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont porté sur la réalisation et la caractérisation d'un micro-transducteur à ondes élastiques de volume en GaAs et de sa biointerface. Cette étude a été menée dans le cadre du développement d'un biocapteur, peu coûteux, miniaturisé, pour des applications nomades de détection et de quantification de bactéries sur site. Le domaine d'application vise aussi bien la santé que l'agro-alimentaire ou l'environnement.

Au cours de ces recherches, nous avons fait appel à de nombreux domaines de compétences allant de la physique des ondes élastiques à la biochimie des interfaces, en passant par les techniques de microfabrication ou encore de caractérisation de surface. Le premier chapitre a donc introduit l'état de l'art de ces domaines tout en se focalisant sur la situation stratégique du capteur étudié par rapport aux technologies existantes appliquées à la détection de bactéries. Les capteurs acoustiques sont bien positionnés en ce qui concerne les temps de détection pour les solutions bactériennes ; ils se situent entre les capteurs électrochimiques généralement rapides et les techniques PCR nécessitant un plus long traitement.

Le second chapitre a été consacré à la modélisation numérique du transducteur à ondes acoustiques de volume après un bref rappel des relations théoriques et des modèles analytiques. Le modèle élaboré au début de ce chapitre nous permet d'entrevoir certains impacts environnementaux, telle que la température, sur les performances du capteur. Le modèle a été par la suite réutilisé dans le chapitre 5 pour valider le comportement expérimental. Un deuxième volet dans ce chapitre a permis de décrire les techniques de microfabrication, utilisées en salle blanche, pour la fabrication du transducteur et de sa cellule fluide. Pour le transducteur, nous avons testé un design permettant de confiner l'énergie générée au sein de la membrane en limitant les fuites dans le substrat. Toute la difficulté de ce procédé a reposé sur le choix d'une stratégie permettant l'usinage, dans le GaAs massif, d'une membrane fine, plane avec un bon état de surface. Nous avons mis en parallèle deux techniques d'usinage : la gravure humide basée sur des travaux antérieurs, et la gravure par plasma chloré. Cette dernière technique a permis, malgré quelques défauts de masquage, d'obtenir des résultats très intéressants pour des usinages de près de 200 μ m

de profondeur. Enfin, une procédure pour réaliser des cellules fluidiques à bas coût a été développée.

Dans le troisième chapitre, nous avons étudié et caractérisé plusieurs interfaces de biorecognition réalisées sur GaAs. Les SAMs, composant la biointerface, ont été analysées à l'aide de techniques de caractérisation fines telles que la spectroscopie infrarouge. Nous avons mis en place une méthodologie de mesure et conçu de nouveaux accessoires permettant d'obtenir une plus grande sensibilité dans la mesure des couches atomiques greffées sur GaAs. Nous avons extrait deux architectures moléculaires de SAMs particulièrement intéressantes pour une immobilisation efficace des anticorps, il s'agit de la monocouche PEG-biotin pure et de la SAM mixte MHDA:MUDO (1:9). Un approfondissement des travaux sur l'auto-assemblage des molécules solubilisées dans des solutions eau/éthanol a également montré un intérêt dans la formation de couches denses. Les meilleures conformations et structures ont été obtenues avec un rapport eau/éthanol de 37% en volume. L'ensemble des résultats a permis de mieux comprendre les phénomènes de formation de couches auto-assemblées mixtes ou pures.

Dans le quatrième chapitre, nous avons travaillé sur les aspects de régénération de la biointerface étudiée dans le chapitre précédent. Par un procédé de régénération, nous pouvons ainsi réduire les coûts de fonctionnement du capteur en le réutilisant autant que possible. Nous avons étudié en parallèle deux techniques de régénération : par voie chimique et par photo-oxydation en milieu liquide. La première, très efficace, simple à mettre en place et ne nécessitant pas d'équipement sophistiqué reste toutefois agressive pour le matériau support. En effet, il faut à tout prix, éviter d'endommager le GaAs pour ne pas affecter les performances du futur capteur. Nous avons donc opté pour une technique utilisant une source UV pour oxyder localement la surface et permettre la désorption des molécules. Le traitement de photo-oxydation est réalisé en milieu liquide afin de contrôler plus facilement les paramètres et notamment le taux d'espèces oxygène présent. Nous avons pu prouver ce phénomène en employant une source laser excimer (KrF) et en caractérisant la surface par plusieurs méthodes, telles que l'AFM, l'XPS ou le FTIR. En fin de chapitre, nous avons réalisé, via cette technique, des patternings de SAM que nous avons révélés par fluorescence. Ce dernier point est extrêmement intéressant pour concevoir des biointerfaces sur des réseaux de capteurs multiplexés.

Enfin, le chapitre 5 est consacré aux tests du résonateur dans divers milieux et avec différents paramètres géométriques. Pour ces tests, nous avons utilisé soit un analyseur de réseau, pour les acquisitions d'impédance, soit un vibromètre optique à sonde

hétérodyne, pour l'analyse du déplacement des composantes hors plan. Nous avons comparé plusieurs types d'électrodes et mis en évidence que certaines peuvent confiner les modes dans la partie centrale de la membrane et donc d'éviter l'apparition de couplage parasite avec le matériau massif. Nous avons vu les impacts et limitations de la conductivité (et perméabilité) de l'environnement du capteur sur un support solide ou en contact avec un liquide. Dans les deux cas se produit une forte atténuation des performances du transducteur. Le modèle numérique établi dans le chapitre 2 a toutefois prédit la position des pics de résonance, l'impact de certaines géométries d'électrodes, la forte résistance motionnelle et la déviation en température du dispositif. Malgré les limitations du capteur observées dans ce chapitre, les perspectives par rapport à la sensibilité en masse estimée restent toutefois intéressantes.

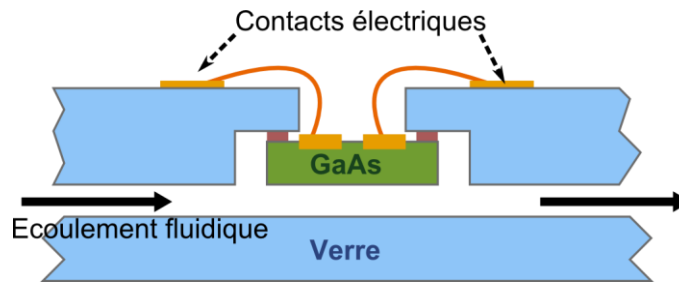
La poursuite de ces travaux passe tout d'abord par le test des transducteurs et de la biointerface combinés. Mais on peut voir clairement que les obstacles à l'utilisation du capteur, pour l'application visée, sont issus principalement des limitations du transducteur. Nous proposons ainsi différentes voies pour lever les verrous technologiques associés à ces limitations. Ces voies sont au nombre de trois :

- Poursuivre le travail sur l'architecture de capteur étudié dans ce rapport mais en réalisant quelques améliorations.

Nous avons vu que le gap entre les électrodes est important pour limiter la pénétration du champ électrique dans le milieu jouxtant le dispositif. Néanmoins, en réduisant le gap, la résistance motionnelle augmente ce qui abaissera la sensibilité du capteur. Il faudra donc trouver, via des simulations numériques, le bon rapport gap et épaisseur de membrane afin de maximiser la sensibilité du dispositif sans que celle-ci ne soit affectée par les paramètres électriques de l'environnement extérieur. De plus, l'ajout de l'interface biochimique pourrait avoir un effet positif sur l'atténuation du champ électrique à l'interface solide/liquide dû à la densité de celle-ci et à ses propriétés diélectriques. L'utilisation des phénomènes de couplage entre différents modes de résonance pourrait conduire à la génération de résonances locales et à terme augmenter la sensibilité du transducteur. D'un point de vue microfabrication, la stratégie est de continuer le développement des techniques par gravures plasma afin de réaliser des structures membranaires planes, sans rugosité ou défaut de surface.

- Utiliser une nouvelle structure, non membranaire, et sans encastrement.

Dans cette optique, nous pouvons imaginer un échantillon de GaAs, non structuré, simplement fixé à une cellule fluïdique, fonctionnant sans contrainte mécanique latérale. La figure ci-dessous montre un schéma de principe de cette perspective. La fabrication du résonateur serait extrêmement simple et nécessiterait seulement la découpe d'un échantillon de GaAs et son report sur une cellule fluïdique adaptée. Pour la structure vibrante, on pourrait facilement obtenir l'épaisseur choisie par polissage.



- Utiliser un autre matériau piézoélectrique caractérisé par un coefficient de perte mécanique plus faible et un facteur de qualité, pour les modes de cisaillement, plus élevé.

Enfin, nous avons vu dans l'état de l'art que l'arséniure de gallium, bien qu'ayant de nombreux autres avantages, ne bénéficie pas de propriétés piézoélectriques et mécaniques remarquables. Nous pouvons conserver l'arséniure de gallium pour la partie du capteur en contact avec le liquide, permettant sa fonctionnalisation, sa capacité à être régénéré et usiné par les techniques « conventionnelles » de microfabrication. Nous pourrions combiner le GaAs avec un autre matériau ayant des propriétés piézoélectriques et mécaniques plus intéressantes tel que le niobate de lithium (LiNbO_3), le dioxyde de titane (TiO_2) ou l'oxyde de zinc (ZnO).

Si ces trois voies ne permettent pas l'amélioration significative de la détection en milieu liquide, il sera nécessaire de réaliser la mesure en air. Pour ce faire, il faudra immobiliser les éléments biologiques sur la surface en milieu liquide puis procéder à une purge du liquide pour la mesure. Il ne sera plus possible de réaliser une analyse en temps réel cependant les bactéries pourront être immobilisées à différent temps d'exposition et sur plusieurs transducteurs en parallèle afin de reconstruire, autant que possible, une cinétique de greffage.

ANNEXE A – Etat de l’art des temps d’analyse et gammes de mesure pour différentes méthodes de détection de bactéries

L’ensemble des données indiquées dans ce tableau ont été regroupées à partir de plusieurs *review*^{3,4,330} ou papiers^{37,270,331,332}

Detection Technique	Category	Bacteria	Time of analysis (h)		Detection range (CFU/mL)		Ref
Colony count	Culture	Legionella pneumophila	120	336	1	994	Villari et al. 1998
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli	0.5		100	600	Abdel-Hamid et al. 1999a
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli, Salmonellae	0.58		50		Abdel-Hamid et al. 1999b
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Salmonellae	1	2	5.00E+04		Brewster et al. 1996
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Salmonellae	6		1	5	Brooks et al. 1992
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Salmonella Typhimurium	2		5.00E+03		Che et al. 1999
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Campylobacter jejuni	2	3	2.10E+04	1.00E+07	Che et al. 2001
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli	0.5		50		Chemburu et al. 2005
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni	0.5		10		Chemburu et al. 2005

Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli	0.17		78		Muhammad-Tahir and Alocilja. 2003b
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli	0.1		81	1.00E+06	Muhammad-Tahir and Alocilja. 2004
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli	2		6.00E+02		Ruan et al. 2002
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli	0.25		1.60E+01	7.20E+07	Varshney et al. 2005
Amperometric	Biosensor - Electrochemical	Salmonella Typhimurium	2.5		1.09E+03		Yang et al. 2001
Conductometric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli, Salmonella spp.	0.17		79	1.00E+05	Muhammad-Tahir and Alocilja. 2003a
Conductometric	Biosensor - Electrochemical	Bacillus cereus	0.1		35	88	Pal et al. 2008
Cyclic voltametry	Biosensor - Electrochemical	Vibrio parahaemolyticus	-		7.37E+04		Zhao et al. 2007
Impedimetric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli	-		3.00E+01	3.00E+04	dos Santos et al. 2013
Impedimetric	Biosensor - Electrochemical	Listeria monocytogenes	3		1.00E+03		Kanayeva et al. 2012
Impedimetric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli	-		10	1.00E+07	Munoz-Berbel et al. 2008
Impedimetric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli	0.17		1.00E+07		Radke and Alocilja 2005
Impedimetric	Biosensor - Electrochemical				6.00E+02	6.00E+06	Wang et al. 2016
Impedimetric	Biosensor - Electrochemical	Salmonella Typhimurium	9.3		4.8		Yang et al. 2004

Impedimetric	Biosensor - Electrochemical	Salmonella Typhimurium	2.2		5.40E+05		Yang et al. 2004
Potentiometric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli	1.5		10		Ercole et al. 2003a
Potentiometric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli heat-killed	0.75		7.10E+02		Gehring et al. 1998
Potentiometric	Biosensor - Electrochemical	Escherichia coli live	0.5		2.50E+04		Gehring et al. 1998
Magnetoelastic	Biosensor - Mass-sensitive	Escherichia coli	0.83		1.00E+02		Ong et al. 2006
Magnetoelastic	Biosensor - Mass-sensitive	Bacillus anthracis	0.5		1.00E+02		Xie et al. 2009
QCM	Biosensor - Mass-sensitive	Escherichia coli	2.83		1.00E+03	1.00E+08	Brooks et al. 2004
QCM	Biosensor - Mass-sensitive				1.00E+02	1.00E+04	Ozalp et al. 2015
QCM	Biosensor - Mass-sensitive	Escherichia coli	4		23	53	Shen et al. 2011
QCM	Biosensor - Mass-sensitive	Salmonella Typhimurium	-		1.00E+05	1.00E+06	Su and Li 2005
QCM	Biosensor - Mass-sensitive	Escherichia coli	0.5	0.83	1.00E+03	1.00E+08	Su et al. 2004
QCM	Biosensor - Mass-sensitive	Listeria monocytogenes	0.42		1.00E+07		Vaughan et al. 2001
QCM	Biosensor - Mass-sensitive	Salmonellae	1		1.00E+04	5.00E+08	Wong et al. 2002
QCM-D	Biosensor - Mass-sensitive	Escherichia coli	1		3.00E+05	1.00E+09	Poitras et al. 2009

SH-SAW	Biosensor - Mass-sensitive	Escherichia coli	2.5		1.00E+06		Berkenpas et al. 2006
LW	Biosensor - Mass-sensitive	Escherichia coli	1		1.00E+06		Moll et al. 2006
Bacteriophage-based bioluminescence	Biosensor - Optical	Escherichia coli, Salmonellae	4		1.00E+01		Brigati et al. 2007
Bacteriophage-based bioluminescence	Biosensor - Optical	Escherichia coli, Salmonellae	1	3	1.00E+08		Chen and Griffiths. 1996
Chemiluminescence	Biosensor - Optical				5.00E+02	5.00E+05	Li et al. 2015
Chemiluminescence	Biosensor - Optical	Escherichia coli	0.5		1.00E+02	1.00E+05	Mathew et al. 2004
Chemiluminescent immunoassay	Biosensor - Optical	Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes	-		1.00E+04	1.00E+05	Magliulo et al. 2007
Colorimetric	Biosensor - Optical				1.00E+02	1.00E+06	Qiu et al. 2016
Diffuse reflectance spectroscopy	Biosensor - Optical	Escherichia coli	0.75		5.00E+05	5.00E+08	Rahman et al. 2006
Dual-channel SPR	Biosensor - Optical	Campylobacter jejuni	0.75		1.00E+03		Wei et al. 2007
Evanescence wave	Biosensor - Optical	Escherichia coli	4		3.00E+00	3.00E+01	Varkey et al. 2002
Fiber optic immunosensor	Biosensor - Optical	Escherichia coli	10		2.90E+03	6.50E+04	Tims and Lim 2003
Flow cytometry	Biosensor - Optical				1.00E+05	1.00E+09	Piñero-Lambea et al. 2015
Fluorescence microscopy	Biosensor - Optical	Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Yersinia enterocolitica, Legionella pneumophila	-		1.00E+02		Choi and Oh 2008

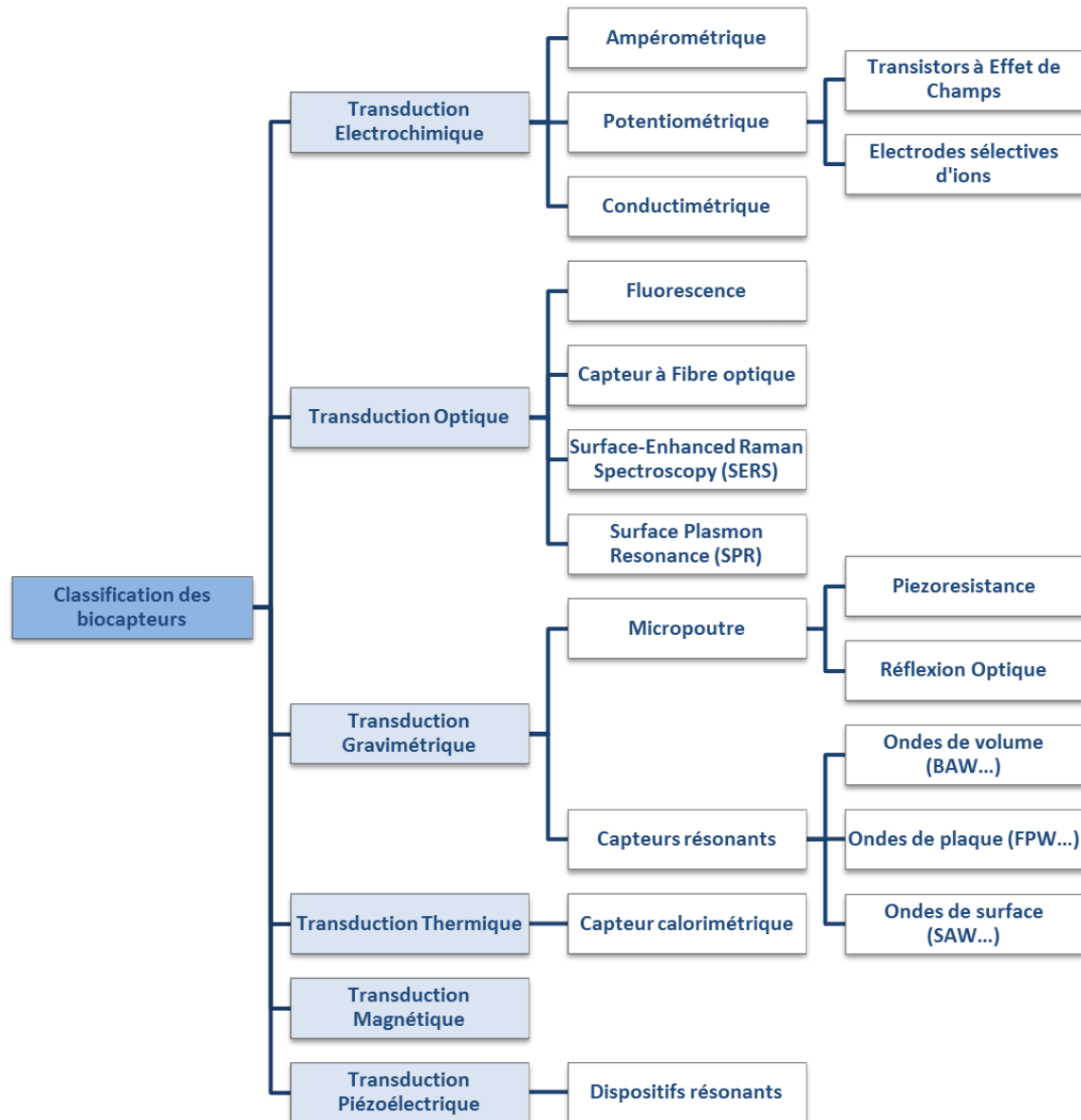
Imaging ellipsometry	Biosensor - Optical	Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Yersinia enterocolitica, Legionella pneumophila	-		1.00E+03	1.00E+07	Choi and Oh 2008
Optic interferometer	Biosensor - Optical	Salmonella Typhimurium	12		1.00E+05		Seo et al. 1999
Photoluminescence	Biosensor - Optical	Escherichia coli	1	2	1.00E+03	1.00E+05	Nazemi et al. 2015
Photoluminescence	Biosensor - Optical	Legionella pneumophila	0.5	1.5	1.00E+04	1.00E+06	Aziziyani et al. 2016
Quantum dots	Biosensor - Optical	Escherichia coli	-		1.00E+06		Hahn et al. 2008
SPR	Biosensor - Optical				2.00E+01	1.00E+02	Bulard et al. 2015
SPR	Biosensor - Optical	Legionella pneumophila	2.33		1.00E+02	1.00E+09	Oh et al. 2003
SPR	Biosensor - Optical	Escherichia coli	-		1.00E+02	1.00E+09	Oh et al. 2005b
SPR	Biosensor - Optical	Escherichia coli	0.17	0.5	1.00E+04	1.00E+08	Taylor et al. 2005
SPR	Biosensor - Optical	Escherichia coli	-		3.00E+03		Wang et al. 2013b
SPR-ATR	Biosensor - Optical	Salmonella choleraesuis	-		4.40E+04		Taylor et al. 2006
SPR-ATR	Biosensor - Optical	Listeria monocytogenes	-		3.50E+03		Taylor et al. 2006
SPR-ATR	Biosensor - Optical	Campylobacter jejuni	-		1.10E+05		Taylor et al. 2006
SPR-ATR	Biosensor - Optical	Escherichia coli	-		1.40E+04		Taylor et al. 2006

Total internal reflection fluorescent biosensor	Biosensor - Optical	Campylobacter jejuni	2		1.00E+03		Sapsford et al. 2004
ELISA	Immunological	Escherichia coli	24		1.20E+03	1.00E+04	Blais et al. 2004
ELISA	Immunological	Campylobacter jejuni	120		1.00E+05	1.00E+07	Brooks et al. 2004
ELISA	Immunological	Escherichia coli	3		68	6.80E+03	Shen et al. 2014
Immunomagnetic separation-ELISA	Immunological	Salmonellae	24		1.00E+06	1.00E+09	Mansfield et al. 2001
Immunomagnetic separation-plating	Immunological	Salmonellae	24		1	10	Mansfield et al. 2001
Lateral Flow Immunoassay	Immunological	Salmonella Typhimurium	10		1.00E+04	1.00E+05	Kumar et al. 2008
LAMP	Nucleic acid	Salmonella spp., Shigella spp.	20		5.00E-01		Shao et al. 2011
Multiplex PCR	Nucleic acid	Salmonellae	24		1.00E+03		Silva et al. 2011
Multiplex PCR	Nucleic acid	Escherichia coli	-		1.00E+03		Verstraete et al. 2012
NASBA	Nucleic acid	Escherichia coli	4		4.00E+01		Min and Baeumner. 2002
NASBA	Nucleic acid	Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium	1.5		1.00E+01		Mollasalehi and Yazdanparast. 2013
NASBA	Nucleic acid	Listeria monocytogenes	72		4.00E+02		Nadal et al. 2007
PCR-electrophoresis	Nucleic acid	Escherichia coli	2		1000	1.00E+04	Daly et al. 2002

Real-time PCR	Nucleic acid	Escherichia coli	5.33		5	5.00E+04	Fu et al. 2005
Real-time PCR	Nucleic acid	Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Salmonella	24		2.00E+02		Kawasaki et al. 2010
Real-time PCR coupled to fluorescence	Nucleic acid	Escherichia coli	0.5		1.00E+02	1.00E+06	Higgins et al. 2003
Real-time PCR-Immunomagnetic separation	Nucleic acid	Campylobacter jejuni	4		100	150	Lund et al. 2004
Sandwich hybridization assay (SHA)	Nucleic acid	Legionella pneumophila	1	2	1.80E+03		Leskelä et al. 2005
PCR-ELISA	Nucleic acid / Immunological	Escherichia coli	5		100	1.00E+04	Daly et al. 2002
PCR-ELISA	Nucleic acid / Immunological	Salmonellae	24		1.00E+03	1.00E+08	Perelle et al. 2004

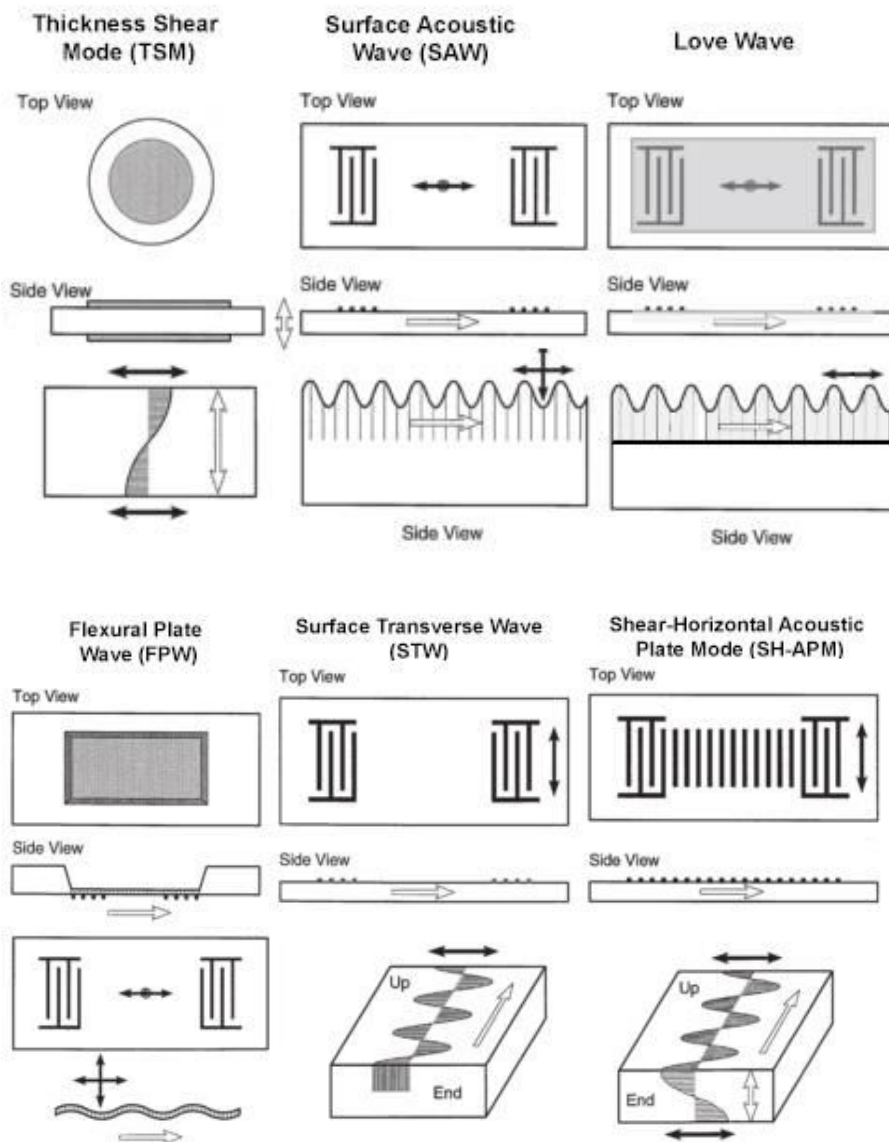
ANNEXE B – Classification des transducteurs

La figure suivante montre une classification des différents types de transduction, la liste n'est pas exhaustive mais comporte la majorité des transducteurs.



ANNEXE C – Transducteurs à ondes acoustiques

Les transducteurs acoustiques peuvent générer différents types d'ondes, selon leur géométrie, les caractéristiques du matériau ou la fréquence d'opération. Les dispositifs les plus utilisés sont présentés sur la figure suivante, où la direction de propagation est indiquée par une flèche blanche et la (ou les) direction(s) de vibration sont représentées par des flèches noires³³³.



ANNEXE D – Procédé de microfabrication des dispositifs à membrane en gravure humide

Etape	Description	Equipement/Solution	Programme / Paramètre(s)	Cible	Face
0	PREPARATION DU WAFER				
0	Nettoyage standard	Acétone	10min + ultrasons		-
		Ethanol	10min + ultrasons		
1	GRAVURE DES MEMBRANES (face supérieure) ET DES INDICATEURS DE GRAVURE (face inférieure)				
1.1	Spincoating	S1828	30s; V=2500r/min; A=4000r/min/s	Ep.=~3.8µm	Supérieure
1.2	1er Recuit	Plaque chauffante	2min; 120°C		-
1.3	Spincoating	S1828	30s; V=2500r/min; A=4000r/min/s	Ep.=~3.8µm	Inférieure
1.4	2ème Recuit	Etuve	5min; 120°C		-
1.5	Repos	-	2min		-
1.6	Exposition UV	EVG 620	Masque 1; dose=130mJ/cm ²		Supérieure
1.7	Exposition UV	EVG 620	Masque 2; dose=130mJ/cm ²		Inférieure
1.8	Développement	MF26A	2-3min		-
1.9	Rinçage	H2O DI			-

1.10	Gravure	1 H3PO4 : 9 H2O2 : 1 H2O	t = prof. / rate (V_grav = 1µm/min) + agitation (500tr/min); T=0°C	Prof.= 50 à 100µm	Double face
1.11	Rinçage	H2O DI			-
1.12	Nettoyage de la résine	Acétone	10min + ultrasons		-
		Ethanol	10min + ultrasons		
2	DEPOT DES ELECTRODES (face supérieure)				
2.1	Spraycoating	AZ9260	P=1bar; T=80°C	[6±1]µm	Supérieure
2.2	Recuit	Plaque chauffante	3min; 100°C		-
2.3	Exposition UV	EVG 620	Masque 3; dose=700mJ/cm ²		Supérieure
2.4	Développement	AZ 400K	dilué 1:4; 2-3min		-
2.5	Dépôt Cr	Plassys MP500 (Pulvérisation)	10s; P=7e-6bar; I=0.5A	quelques nm	Supérieure
2.6	Dépôt Au	Plassys MP500 (Pulvérisation)	1min20s; P=9e-6bar; I=0.3A	[162±12]nm	Supérieure
2.7	Lift-off (soulèvement)	Remover 1165	20min + ultrasons; T=60°C		-
2.8	Nettoyage	Ethanol	10min + ultrasons		-
3	GRAVURE DES MEMBRANE (face inférieure)				
3.1	Spraycoating	S1813	P=1bar; T=80°C	[5±1]µm	Supérieure
3.2	1er Recuit	Plaque chauffante	2min; 120°C		-
3.3	Spraycoating	S1813	P=1bar; T=80°C	[5±1]µm	Inférieure
3.4	2ème Recuit	Etuve	5min; 120°C		-

3.5	Exposition UV	EVG 620	Masque 1; dose=180mJ/cm ²		Inférieure
3.6	Développement	MF26A	3-4min		-
3.7	Gravure	1 H3PO4 : 9 H2O2 : 1 H2O	t = prof. / rate (V_grav = 1µm/min) + agitation (500tr/min); T=0°C	Prof.= 300 à 400µm	Inférieure
3.8	Rinçage	H2O DI			-
3.9	Nettoyage de la résine	Acétone	10min + plateau tournant (40tr/min)		-
		Ethanol	10min + plateau tournant (40tr/min)		

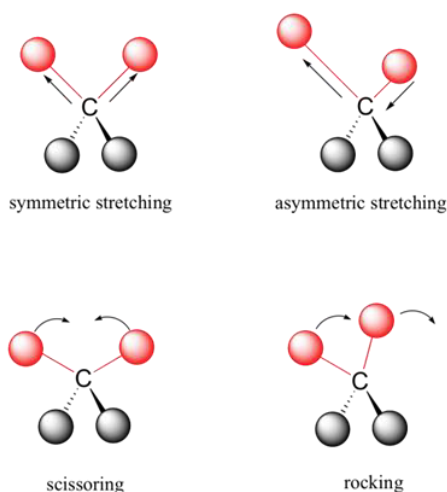
ANNEXE E – Procédé de microfabrication des cellules fluidiques par film sec

Etape	Description	Equipement/Solution	Programme / Paramètre(s)	Cible	Face
0	PREPARATION DU WAFER				
0	Nettoyage standard	Acétone	10min + ultrasons		-
		Ethanol	10min + ultrasons		
1	USINAGE DES OUVERTURES PAR ULTRASONS				
1,1	Usinage ultrasonore	-	sonotrode=1mm; débouchant	débouchant (500µm)	-
1,2	Rinçage	H2O DI			-
1,3	Nettoyage	Ethanol	10min + ultrasons		-
2	DEPOT DE LA COUCHE D'ALUMINIUM DE PROTECTION				
2,1	Dépôt Al	Plassys MP500 (Pulvérisation)	>1min; P=7e-6bar; I=1.5	>100nm	Supérieure
2,2	Spincoating	S1813	30s; V=4000r/min; A=4000r/min/s	~1,3µm	Supérieure
2,3	Exposition UV	EVG 620	Masque 4; dose=60mJ/cm²		Supérieure
2,4	Développement	MF26A	1-2min		-
2,5	Gravure de l'Al	Al etch	quelques min		-
2,6	Rinçage	H2O DI			-

2,7	Nettoyage de la résine	Acétone	10min + ultrasons		-
		Ethanol	10min + ultrasons		
3	REALISATION DE LA CELLULE FLUIDIQUE				
3,1	Application du film	Ordyl SY300	55µm (film)		Supérieure
3,2	Laminage	Laminoir	100°C; V=0.5m/min; P=1bar		Supérieure
3,3	Exposition UV	EVG 620	Masque 4; dose=285mJ/cm ²		Supérieure
3,4	Recuit post-exposition	Plaque chauffante	5min; 85°C		-
3,5	Développement	BMR developer	10min + agitation 100tr/min		-
3,6	Rinçage	BMR rinser	10min + agitation 100tr/min		-
3,7	Gravure du reste d'Al	Al etch	quelques min		-
4	DECOUPE				
4,1	Decoupe	Scie Disco			-
5	SCELLEMENT				
5,1	Application du film	Ordyl SY300	20µm (film)		Supérieure
5,2	Laminage	Manuel; Plaque chauffante	100°C		Supérieure
5,3	Scellement avec le dispo GaAs	Manuel; Plaque chauffante	100°C		-
5,4	Recuit de polymérisation	Plaque chauffante	2h; 150°C		-

ANNEXE F – Théorie sur la spectroscopie vibrationnelle

Les liaisons covalentes des molécules organiques ne sont pas rigides mais se comportent plutôt comme des ressorts. Ces liaisons, à température ambiante, peuvent s'étirer ou avoir des mouvements de cisaillement, bascule, agitation ou torsion selon leurs degrés de liberté. Le nombre de degrés vibrationnels est inhérent à la structure de la molécule et au nombre d'atomes N impliqués. Pour les molécules non-linéaires, il y a $3N-6$ modes de vibration tandis qu'il y en a $3N-5$ pour une molécule linéaire. A titre d'exemple, les modes de vibration des CH_2 sont illustrés sur la figure ci-dessous.



Exemples de vibrations moléculaires pour les méthylènes²²⁵

Chaque vibration moléculaire est produite lorsque la molécule absorbe un quantum d'énergie qui correspond à une fréquence donnée et obéit à la loi de Hooke²²⁴ :

$$V_{i_v} = h\nu_i \left(q_i + \frac{1}{2} \right) + h\nu_i x_i \left(q_i + \frac{1}{2} \right)^2$$

où h est la constante de Planck, ν_i est la fréquence fondamentale du mode, q_i est le nombre quantique (0, 1, 2...) et x_i est la constante anharmonique (sans dimension).

Si une molécule est exposée à une radiation électromagnétique qui correspond à la fréquence d'un mode de vibration alors une partie de l'énergie va être absorbée par la

liaison et celle-ci passera à un niveau d'énergie supérieur. La plupart des modes de vibration des molécules organiques correspondent à des énergies de radiation dans le spectre infrarouge, et même plus particulièrement milieu-infrarouge (400 à 4000 cm^{-1}). Les liaisons ayant absorbé l'énergie ne restent pas dans leur état excité mais libèrent cette énergie sous forme de chaleur et retournent à un état non-excité. Ces énergies sont déterminées par la masse des atomes, la forme des surfaces d'énergie potentielle, et leur couplage vibronique. Plus la force de liaison est importante, plus la fréquence de vibration sera élevée. De même, plus la masse des atomes impliqués dans la liaison est faible plus la fréquence sera élevée. La symétrie et le moment dipolaire de la molécule jouent un rôle dans l'intensité d'absorption des vibrations impliquées. Plus les liens intermoléculaires seront polarisés plus les bandes d'absorption seront intenses. A l'aide d'un instrument appelé spectro(photo)mètre, on peut observer ces vibrations. Une source radiative infrarouge est utilisée pour exciter les liaisons moléculaires, la plupart des fréquences (de 10^{13} à 10^{14} Hz) traversent l'échantillon à analyser puis sont mesurées par un détecteur. L'examen du spectre transmis indique la quantité d'énergie absorbée à chaque longueur d'onde.

ANNEXE G – Paramètres majeurs pour la configuration du FTIR

Paramètres	Description	Utilisation
Paramètres de l'instrument		
Ouverture	<p>Une source considérée comme idéale est infiniment petite, elle donnera un faisceau lumineux parfaitement collimaté. L'ouverture permet de compenser le fait d'utiliser une source non-idéale. La résolution spectrale en est améliorée. Mais évidemment avec une petite ouverture l'intensité du signal reçu par le détecteur en est diminuée. Dans la pratique, la plus grande ouverture possible avant saturation du détecteur est choisie avec une limite max correspondant à : $\frac{\text{Taille de l'échantillon}}{1.6}$. Où 1.6 correspond à facteur d'agrandissement du faisceau à la position de l'échantillon.</p>	Max 2.5mm
Paramètres d'acquisition		
Résolution spectrale ($\Delta\nu$)	<p>La résolution spectrale est inversement proportionnelle au retard de l'interféromètre Δx. Si l'on considère que l'interférogramme est constitué de N points discrets alors l'échantillonnage spectral est donné par : $\Delta\nu = \frac{1}{N \cdot \Delta x}$. La résolution doit être suffisamment élevée pour pouvoir résoudre des éléments d'intérêts proches (en fonction de la largeur des bandes/pics et de la théorie de Nyquist-Shannon) mais également assez faible pour minimiser le bruit et le temps d'acquisition.</p>	$\Delta\nu = 4\text{cm}^{-1}$
Nombre de scan	<p>Le signal/bruit (S/N) d'un spectre est proportionnel à la racine carrée du temps d'acquisition (ou nombre de scans). Il est nécessaire de multiplier par 4 le temps d'acquisition lorsque la résolution est doublée pour conserver le même signal/bruit.</p>	256, 512, 1024 ou 2048 scans dépendamment de l'expérience
Plage spectrale	<p>Plage de nombre d'ondes visualisable pour l'observation de l'ensemble des régions d'intérêt. L'échantillonnage x implique un plus grand nombre de points N et donc une taille de stockage plus élevée qui demande des temps de calcul plus longs.</p>	Généralement entre 5000cm^{-1} à 400cm^{-1}

Paramètres mathématiques		
Fenêtrage (Apodization)	<p>En théorie, les limites d'intégrale d'une transformée sont infinies mais dans l'instrument la différence de chemin optique est limitée. Donc en réalité, une troncature par une fonction rectangulaire est opérée sur le signal. L'interférogramme qui est la transformée de Fourier du signal donne alors une fonction sinc. Les lobes secondaires résultants de cette fonction provoquent des distorsions ou bruits sur le spectre reconstruit. Il faut donc appliquer un fenêtrage sur l'interférogramme pour atténuer ces lobes et rendre le lobe principal plus étroit. Une forte apodization permet de supprimer les lobes secondaires (et d'améliorer le S/N) mais rend le lobe principal plus large (et réduit la résolution).</p>	Blackman-Harris (3 termes)
Correction de phase	<p>La dernière opération effectuée durant la conversion d'un interférogramme en spectre est la correction de phase. Parce que la TF d'un interférogramme donne généralement un spectre complexe : $C(\nu) = S(\nu)\exp(i\phi(\nu))$. Le but de la correction de phase est d'extraire l'amplitude $S(\nu)$ du spectre complexe. Deux méthodes majeures sont possibles, soit en calculant la racine carrée du spectre de puissance (<i>Power spectrum</i>) : $P(\nu) = C(\nu) \cdot C^*(\nu)$ soit en prenant la partie réelle de la multiplication de $C(\nu)$ par l'inverse de la phase exponentielle (<i>Mertz</i>) : $S(\nu) = \text{Re}[C(\nu) \cdot \exp(-i\Phi(\nu))]$. Les deux méthodes auront un impact différent sur la contribution du bruit dans le signal, la première donnera du bruit toujours positif et dans le pire des cas, supérieur d'un facteur $\sqrt{2}$ du bruit (signé) obtenu avec la seconde méthode.</p>	Correction Mertz la plupart du temps
Facteur de remplissage (Zero Filling Factor)	<p>L'application de la transformée de Fourier sur l'interférogramme peut produire un effet appelé « <i>pecket-fence effect</i> ». Cet effet devient évident lorsque l'interférogramme contient des fréquences qui ne coïncident pas avec l'échantillonnage. Il est possible de résoudre ce problème par l'ajout de zéros à la fin de l'interférogramme avant d'effectuer la DFT. Cette opération a pour effet d'obtenir une interpolation du spectre. Par défaut, il faut au moins doubler la taille de l'interférogramme par un remplissage de zéros. Lorsque la taille des bandes et pics est très petite ou proche de la résolution spectrale (par exemple pour des spectres en phase gazeuse) un ZFF de 8 est plus approprié. L'augmentation du facteur n'introduit pas d'erreurs dans la résolution de la DFT mais simplement donne une meilleure interpolation polynomiale dans le domaine spectral.</p>	ZFF = 4 (au minimum)

Paramètres majeurs pour la configuration du FTIR^{226,334}

ANNEXE H – Tableau des assignements des vibrations d'intérêt en spectroscopie infrarouge

Vibrations ^a	MHDA – Nombre d'onde (cm ⁻¹)			MUDO – Nombre d'onde (cm ⁻¹)		
	SAM dans la littérature ^b	Poudre	SAM mesurée	SAM dans la littérature ^c	Poudre	SAM mesurée
OH str	3050	~3034		3425.3	3420.8	
ω-CH ₂ asym	2930	2931				
α-CH ₂ asym	2925	2925				
CH ₂ asym	2919	2911.5	2921	2919-2927	2915	2924
ω-CH ₂ sym FR	2900	2900				
α-CH ₂ sym FR	2890	2890				
CH ₂ sym FR	2890	-				
ω-CH ₂ sym	2860	-		2880		
α-CH ₂ sym	2862	2870				
CH ₂ sym	2850	2850	2850	2852-2855	2849	2852
C=O str, monomer	1741, 1767	1755				
C=O str, acycl dimer	1718, 1745	-				
C=O str cycl dimer	1699-1728	1695	1695			
COO- asym	1550-1555	-	1562			
COO- sym	1423-1430	-	1457			
C-OH str				1060-1082	1060	
CH ₂ def	1473	1473			1467	

^a Les liaisons methylene α- et ω- sont adjantes respectivement à l'atome de soufre et au groupe carboxylique, FR: Résonance de Fermi, asym: asymétrique, sym: symétrique, str: élancement. ^b Arnold et al.²⁴¹. ^c Frutos et al.³³⁵ and Morales Cruz et al.²⁴⁶

ANNEXE I – Module de conditionnement et d'extraction de bactéries issues des eaux industrielles

Principe :

Dans le but d'abaisser le seuil de detection d'un système pour pathogène ciblé, nous avons mis en place un module d'extraction et de filtrage permettant de conditionner et concentrer en bactéries, une eau potentiellement contaminée. Le système, facilement transportable sur site a pour objectif de faciliter la détection là où les seuils d'infection sont extrêmement critiques. L'unité, nommée « Water Sampling Module » (ou WSM), permet également d'atténuer l'impact négatif que des particules auraient sur le système de détection (effet de charge, absorption non-spécifique...). Plusieurs autres personnes du *laboratoire de semi-conducteurs quantiques et bio-nanotechnologies photoniques* (Sherbrooke, CA) ont également contribué à l'élaboration, le test ou l'amélioration de cette unité, je pense notamment à Khalid Moumanis, Lilian Sirbu et Walid Hassen.



Le système intégré dans une valise

Le WSM permet, par discrimination de taille, d'éliminer les particules de taille supérieures ou inférieures à la bactérie ciblée. Le module est constitué de trois étages de filtration dans lesquels peuvent être incluses des étapes de prétraitement. Les cellules ou particules collectées sur le dernier étage de filtrage sont re-suspendues par rétro-lavage (« backwash »). Celui-ci est opéré soit avec un liquide physiologique pour une analyse

directe, soit avec un milieu de culture, qui après plusieurs heures va permettre d'accroître la population de bactéries. Le volume de liquide utilisé pour le rétro-lavage et l'efficacité de décolmatage du filtre vont affecter directement le facteur de concentration de l'appareil. L'unité intègre une interface utilisateur avec affichage, mais peut être également contrôlée depuis un PC. De plus, elle est compacte et transportable, et peut fonctionner en total autonomie grâce à une surveillance des niveaux de liquide des réservoirs et un contrôle du débit de filtration.

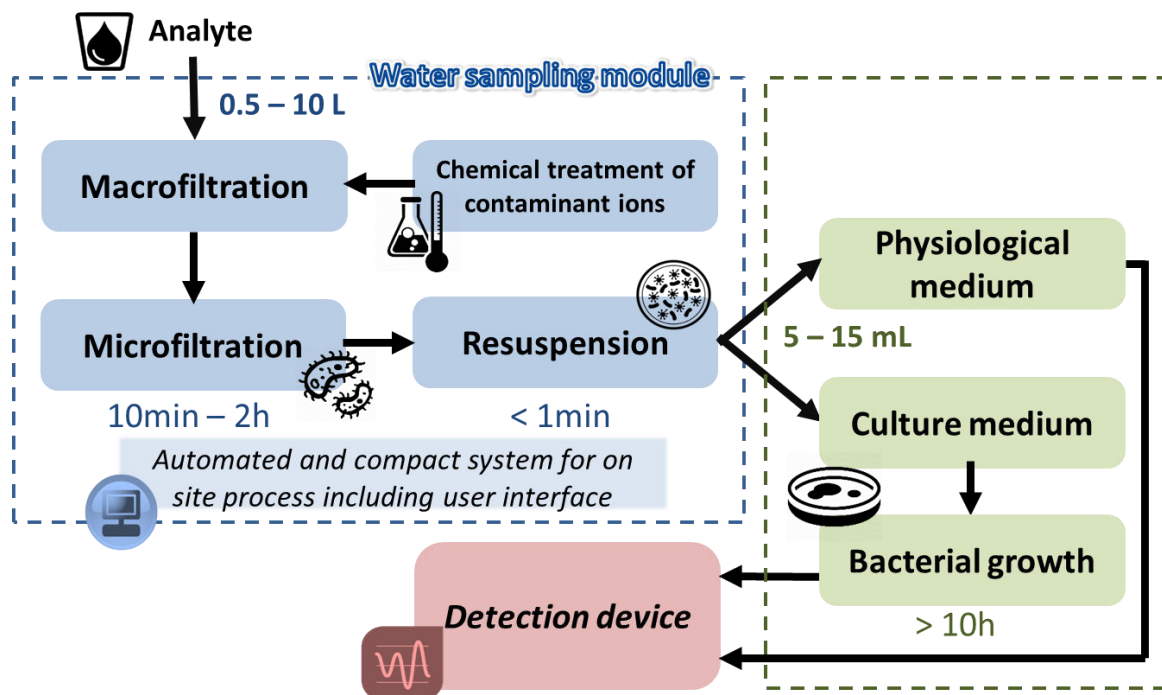
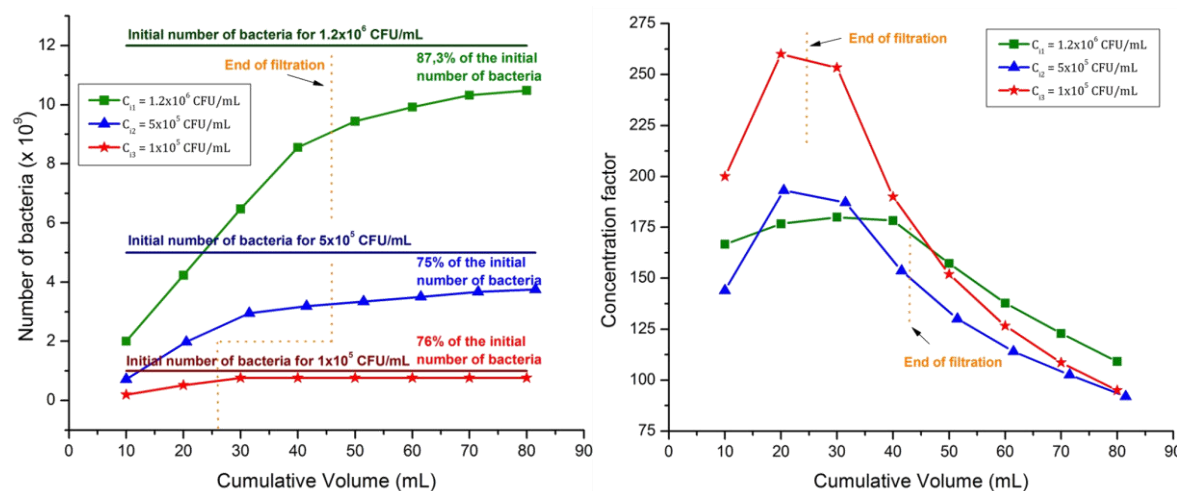


Schéma de principe

Quelques résultats :

Les expériences réalisées en conditions optimales (eau + sels + bactéries *E. coli*) à basse concentration (> 10 CFU/mL) ou à haute concentration ($> 10^5$ CFU/mL) ont permis de mettre en évidence des facteurs de concentration de l'ordre de 50x et de 200x respectivement. Les mesures sont effectuées soit par culture ou PCR pour les faibles concentrations ou soit par mesure de transmittance au spectrophotomètre pour les fortes concentrations. Le taux de recouvrement, pour un volume de récupération de 20mL, est quant à lui, proche de 100% pour les basses concentrations et de l'ordre de 75% en haute concentration. D'après les résultats préliminaires par mesure PCR, nous sommes parvenus à concentrer la bactérie *E. coli* 23 fois à partir d'échantillon d'eaux industrielles et en condition réelle de fonctionnement.



Nombre de bactéries collectées et facteur de concentration en fonction du volume cumulatif de “retro-lavage” obtenu pour des concentrations de bactéries supérieures à 10⁵ CFU/mL

Bactérie souche	et	Conditions expérimentales	Concentration initiale	Facteur de concentration	Méthode de vérification
<i>E. coli</i> K12		Condition de laboratoire (eau salée)	1 CFU/mL	50 ± 10	Culture
<i>L. pneumophila</i> ssp1		Eau industrielle	10 CFU/mL	Jusqu'à 20x	PCR et culture

LISTE DES RÉFÉRENCES

- (1) OMS. Flambée de syndrome hémolytique et urémique en Allemagne http://www.who.int/csr/don/2011_05_27/fr/ (accessed Oct 1, 2016).
- (2) Ricard-Châtelain, B. Légionellose à Québec: un an après, le risque persiste <http://www.lapresse.ca/le-soleil/actualites/sante/201307/17/01-4671785-legionellose-a-quebec-un-an-apres-le-risque-persiste.php> (accessed Oct 1, 2016).
- (3) Lazcka, O.; Campo, F. J. Del; Muñoz, F. X. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (7), 1205–1217.
- (4) Velusamy, V.; Arshak, K.; Korostynska, O.; Oliwa, K.; Adley, C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28* (2), 232–254.
- (5) Artault, S.; Blind, J.; Delaval, J.; Dureuil, Y.; Gaillard, N. Detecting *Listeria monocytogenes* in food. *Int. Food Hyg.* **2001**, *12*, 23.
- (6) Rasooly, A.; Herold, K. E. *Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols Vol.2 : Electrochemical and Mechanical Detectors, Lateral Flow and Ligands for Biosensors*; Humana Press, 2009.
- (7) Clark, L. C.; Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *102* (1), 29–45.
- (8) Palchetti, I.; Mascini, M. Biosensor Technology: A Brief History. In *Sensors and Microsystems*; Springer, 2010; Vol. 54, pp 15–23.
- (9) Guilbault, G. G.; Pravda, M.; Kreuzer, M.; O’Sullivan, C. K. Biosensors—42 Years and Counting. *Anal. Lett.* **2004**, *37* (8), 1481–1496.
- (10) Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, *4*, 299–304.
- (11) Guilbault, G. G. Determination of formaldehyde with an enzyme-coated piezoelectric crystal detector. *Anal. Chem.* **1983**, *55* (11), 1682–1684.
- (12) Muramatsu, H.; Kajiwara, K.; Tamiya, E.; Karube, I. Piezoelectric immuno sensor for the detection of candida albicans microbes. *Anal. Chim. Acta* **1986**, *188*, 257–261.
- (13) Eggins, B. R. *Chemical Sensors and Biosensors*; John Wiley & Sons, 2008; Vol. 28.
- (14) Lippa, P. B.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* **2001**, *314* (1–2), 1–26.
- (15) Kueng, A.; Kranz, C.; Mizaikoff, B. Amperometric ATP biosensor based on polymer entrapped enzymes. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19* (10), 1301–1307.
- (16) Ercole, C.; Gallo, M. D.; Pantalone, M.; Santucci, S.; Mosiello, L.; Laconi, C.; Lepidi, a. A biosensor for *Escherichia coli* based on a potentiometric alternating biosensing (PAB) transducer. *Sensors Actuators B Chem.* **2002**, *83* (1–3), 48–52.
- (17) Bakker, E.; Pretsch, E. Potentiometric sensors for trace-level analysis. *Trends Analyt. Chem.* **2005**, *24* (3), 199–207.
- (18) Lee, C.-S.; Kim, S. K.; Kim, M. Ion-sensitive field-effect transistor for biological sensing. *Sensors (Basel)*. **2009**, *9* (9), 7111–7131.

- (19) Starodub, N. F.; Ogorodnijchuk, J. O. Immune Biosensor Based on the ISFETs for Express Determination of Salmonella typhimurium. *Electroanalysis* **2012**, *24* (3), 600–606.
- (20) Yagiuda, K.; Hemmi, A.; Ito, S.; Asano, Y.; Fushinuki, Y.; Chen, C.-Y.; Karube, I. Development of a conductivity-based immunosensor for sensitive detection of methamphetamine (stimulant drug) in human urine. *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11* (8), 703–707.
- (21) Yang, L.; Li, Y.; Griffis, C. L.; Johnson, M. G. Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable Salmonella typhimurium. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19* (10), 1139–1147.
- (22) Mukundan, H.; Anderson, A. S.; Grace, W. K.; Grace, K. M.; Hartman, N.; Martinez, J. S.; Swanson, B. I. Waveguide-based biosensors for pathogen detection. *Sensors (Basel)*. **2009**, *9* (7), 5783–5809.
- (23) Golden, J. P.; Sapsford, K. E. Fluoroimmunoassays using the NRL array biosensor. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *503*, 273–292.
- (24) Hoa, X. D.; Kirk, A. G.; Tabrizian, M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23* (2), 151–160.
- (25) Harrison, D.; Kjellberg, H. Segmenting a market in the making: Industrial market segmentation as construction. *Ind. Mark. Manag.* **2010**, *39* (5), 784–792.
- (26) Siontorou, C. G.; Batzias, F. A. Innovation in biotechnology: moving from academic research to product development--the case of biosensors. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2010**, *30* (2), 79–98.
- (27) Cooper, M. a. Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (7), 515–528.
- (28) Bolt, B. A. *Earthquakes: a primer*; W.H. Freeman and Company: San Francisco, 1978.
- (29) Royer, D.; Dieulesaint, E. *Elastic Waves in Solids I: Free and Guided Propagation*, Springer.; 2000; Vol. 1.
- (30) Engan, H. Elastic surface waves in α -quartz: Observation of leaky surface waves. *Appl. Phys. Lett.* **1967**, *10* (11), 311.
- (31) Lewis, M. Acoustic wave devices employing surface skimming bulk waves. US Patent 4,159,435, June 26, 1979.
- (32) Bleustein, J. L. A new surface wave in piezoelectric materials. *Appl. Phys. Lett.* **1968**, *13* (12), 412.
- (33) Gulyaev, Y. V. Electroacoustic surface waves in solids. *Sov. Phys. JETP Lett.* **1969**, *9*, 37–38.
- (34) Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Phys.* **1959**, *155* (2), 206–222.
- (35) King, W. H. Piezoelectric Sorption Detector. *Anal. Chem.* **1964**, *36* (9), 1735–1739.
- (36) Q-Sense. Q-Sense E4 <http://www.q-sense.com/products/q-sense-e4>.
- (37) Poitras, C.; Tufenkji, N. A QCM-D-based biosensor for E. coli O157:H7 highlighting the relevance of the dissipation slope as a transduction signal. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (7), 2137–2142.

- (38) Abe, T.; Esashi, M. One-chip multichannel quartz crystal microbalance (QCM) fabricated by Deep RIE. *Sensors Actuators A Phys.* **2000**, *82* (1–3), 139–143.
- (39) Boeker, P.; Horner, G.; Rösler, S. Monolithic sensor array based on a quartz microbalance transducer with enhanced sensitivity for monitoring agricultural emissions. *Sensors Actuators B Chem.* **2000**, *70* (1–3), 37–42.
- (40) Evtugyn, G. *Biosensors: Essentials*; Lecture Notes in Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014; Vol. 84.
- (41) Keiji Kanazawa, K.; Gordon, J. G. The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid. *Anal. Chim. Acta* **1985**, *175*, 99–105.
- (42) Martin, S. J.; Frye, G. C.; Wessendorf, K. O. Sensing liquid properties with thickness-shear mode resonators. *Sensors Actuators A Phys.* **1994**, *44* (3), 209–218.
- (43) Hatch, E. R.; Ballato, A. Lateral-Field Excitation of Quartz Plates. In *1983 Ultrasonics Symposium*; IEEE, 1983; Vol. 1, pp 512–515.
- (44) Martin, S. J.; Frye, G. C.; Ricco, A. J.; Senturia, S. D. Effect of surface roughness on the response of thickness-shear mode resonators in liquids. *Anal. Chem.* **1993**, *65* (20), 2910–2922.
- (45) Wingqvist, G. AlN-based sputter-deposited shear mode thin film bulk acoustic resonator (FBAR) for biosensor applications — A review. *Surf. Coatings Technol.* **2010**, *205* (5), 1279–1286.
- (46) Weber, J.; Albers, W. M.; Tuppurainen, J.; Link, M.; Gabl, R.; Wersing, W.; Schreiter, M. Shear mode FBARs as highly sensitive liquid biosensors. *Sensors Actuators A Phys.* **2006**, *128* (1), 84–88.
- (47) Nieuwenhuizen, M. S.; Nederlof, A. J.; Vellekoop, M. J.; Venema, A. Preliminary results with a silicon-based surface acoustic wave chemical sensor for NO₂. *Sensors and Actuators* **1989**, *19* (4), 385–392.
- (48) Wohltjen, H.; Dessy, R. Surface acoustic wave probe for chemical analysis. I. Introduction and instrument description. *Anal. Chem.* **1979**, *51* (9), 1458–1464.
- (49) Ballantine, D. S.; Jr.; White, R. M.; Martin, S. J.; Ricco, A. J.; Zellers, E. T.; Frye, G. C.; Wohltjen, H. *Acoustic Wave Sensors: Theory, Design, & Physico-Chemical Applications*; 1996.
- (50) Baer, R. L.; Flory, C. A.; Tom-Moy, M.; Solomon, D. STW chemical sensors. In *IEEE 1992 Ultrasonics Symposium Proceedings*; IEEE, 1992; pp 293–298.
- (51) Kovacs, G.; Vellekoop, M. J.; Haueis, R.; Lubking, G. W.; Venema, A. A love wave sensor for (bio)chemical sensing in liquids. *Sensors Actuators A Phys.* **1994**, *43* (1–3), 38–43.
- (52) Du, J.; Harding, G. L.; Ogilvy, J. A.; Dencher, P. R.; Lake, M. A study of Love-wave acoustic sensors. *Sensors Actuators A Phys.* **1996**, *56* (3), 211–219.
- (53) Dejous, C. Contribution à l'étude de microcapteurs à ondes acoustiques visant la biodétection rapide sur site. Mémoire de HDR, Université Bordeaux 1: Bordeaux, France, 2005.
- (54) Martin, S. J.; Ricco, A. J.; Niemczyk, T. M.; Frye, G. C. Characterization of SH acoustic plate mode liquid sensors. *Sensors and Actuators* **1989**, *20* (3), 253–268.
- (55) Wenzel, S. W.; White, R. M. Analytic comparison of the sensitivities of bulk-wave, surface-wave, and flexural plate-wave ultrasonic gravimetric sensors. *Appl. Phys.*

- Lett.* **1989**, 54 (20), 1976.
- (56) Arnau-Vives, A. *Piezoelectric Transducers and Applications*; Springer, 2008.
- (57) Su, X.; Wu, Y.-J.; Knoll, W. Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance techniques for studying DNA assembly and hybridization. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21 (5), 719–726.
- (58) Wang, A. W.; Kiwan, R.; White, R. M.; Ceriani, R. L. A silicon-based ultrasonic immunoassay for detection of breast cancer antigens. *Sensors Actuators B Chem.* **1998**, 49 (1–2), 13–21.
- (59) Kalantar-Zadeh, K.; Wlodarski, W.; Chen, Y. Y.; Fry, B. N.; Galatsis, K. Novel Love mode surface acoustic wave based immunosensors. *Sensors Actuators B Chem.* **2003**, 91 (1–3), 143–147.
- (60) Ustinov, V. M.; Zhukov, A. E. GaAs-based long-wavelength lasers. *Semicond. Sci. Technol.* **2000**, 15 (8), 41–54.
- (61) Hjort, K. Gallium arsenide micromechanics. A comparison to silicon and quartz. In *Gallium Arsenide Applications Symposium*; 1994; pp 65–72.
- (62) Hjort, K.; Soderkvist, J.; Schweitz, J. Gallium arsenide as a mechanical material. *J. Micromechanics Microengineering* **1994**, 4 (1), 1–13.
- (63) Lee, K.; Nair, P. R.; Alam, M. A.; Janes, D. B.; Wampler, H. P.; Zemlyanov, D. Y.; Ivanisevic, A. Electrical detection of the biological interaction of a charged peptide via gallium arsenide junction-field-effect transistors. *J. Appl. Phys.* **2008**, 103 (11), 114510.
- (64) Capua, E.; Natan, A.; Kronik, L.; Naaman, R. The Molecularly Controlled Semiconductor Resistor: How does it work? *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, 1 (11), 2679–2683.
- (65) Wu, D. G.; Cahen, D.; Graf, P.; Naaman, R.; Nitzan, A.; Shvarts, D. Direct detection of low-concentration NO in physiological solutions by a new GaAs-based sensor. *Chemistry* **2001**, 7 (8), 1743–1749.
- (66) Sandhu, A.; Kumagai, Y.; Lapicki, A.; Sakamoto, S.; Abe, M.; Handa, H. High efficiency Hall effect micro-biosensor platform for detection of magnetically labeled biomolecules. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22 (9–10), 2115–2120.
- (67) Duplan, V.; Frost, E.; Dubowski, J. A photoluminescence-based quantum semiconductor biosensor for rapid in situ detection of *Escherichia coli*. *Sensors Actuators B Chem.* **2011**, 160 (1), 46–51.
- (68) O’Sullivan, T.; Munro, E. A.; Parashurama, N.; Conca, C.; Gambhir, S. S.; Harris, J. S.; Levi, O. Implantable semiconductor biosensor for continuous in vivo sensing of far-red fluorescent molecules. *Opt. Express* **2010**, 18 (12), 12513–12525.
- (69) Haupt, K.; Noworyta, K.; Kutner, W.; Takeuchi, T.; Haginaka, J.; Sellergren, B.; Haupt, K.; Mosbach, K.; Vlatakis, G.; Andersson, L. I.; et al. Imprinted polymer-based enantioselective acoustic sensor using a quartz crystal microbalance. *Anal. Commun.* **1999**, 36 (11–12), 391.
- (70) Moreau, C. J.; Dupuis, J. P.; Revilloud, J.; Arumugam, K.; Vivaudou, M. Coupling ion channels to receptors for biomolecule sensing. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3 (10), 620–625.
- (71) Wang, X.; Gu, H.; Yin, F.; Tu, Y. A glucose biosensor based on Prussian

- blue/chitosan hybrid film. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (5), 1527–1530.
- (72) Umar, A.; Rahman, M. M.; Vaseem, M.; Hahn, Y.-B. Ultra-sensitive cholesterol biosensor based on low-temperature grown ZnO nanoparticles. *Electrochem. commun.* **2009**, *11* (1), 118–121.
- (73) Marrakchi, M. Développement et optimisation de biocapteurs à base de biomolécules et de micro-organismes sur microélectrodes interdigitées. Thèse de doctorat, Ecole centrale de Lyon: Ecully, France, 2006.
- (74) Monošík, R.; Stred'anský, M.; Šturdík, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chim. Slovaca* **2012**, *5* (1), 109–120.
- (75) Palek, E.; Fojta, M. Peer Reviewed: Detecting DNA Hybridization and Damage. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (3), 74 A-83 A.
- (76) Hayworth, D. Antibody Labeling and Immobilization Sites <http://www.piercenet.com/method/antibody-labeling-immobilization-sites> (accessed Jun 15, 2016).
- (77) Reverberi, R.; Reverberi, L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus.* **2007**, *5* (4), 227–240.
- (78) Wu, T.-Z.; Su, C.-C.; Chen, L.-K.; Yang, H.-H.; Tai, D.-F.; Peng, K.-C. Piezoelectric immunochip for the detection of dengue fever in viremia phase. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21* (5), 689–695.
- (79) Campagnolo, C.; Meyers, K. J.; Ryan, T.; Atkinson, R. C.; Chen, Y.-T.; Scanlan, M. J.; Ritter, G.; Old, L. J.; Batt, C. A. Real-Time, label-free monitoring of tumor antigen and serum antibody interactions. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *61* (3), 283–298.
- (80) René, L. *Capteurs chimiques, biocapteurs et biopuces*, Lavoisier.; Lavoisier, 2012.
- (81) Nanduri, V.; Sorokulova, I. B.; Samoylov, A. M.; Simonian, A. L.; Petrenko, V. a; Vodyanoy, V. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (6), 986–992.
- (82) Pividori, M. I.; Alegret, S. DNA Adsorption on Carbonaceous Materials. In *Immobilisation of DNA on Chips I*; Wittmann, C., Ed.; Topics in Current Chemistry; Springer: Berlin, 2005; Vol. 260, pp 1–36.
- (83) Romero, M. R.; Garay, F.; Baruzzi, A. M. Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes. *Sensors Actuators B Chem.* **2008**, *131* (2), 590–595.
- (84) Gupta, R.; Chaudhury, N. K. Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: problems and future prospects. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (11), 2387–2399.
- (85) Leggett, G. J.; Roberts, C. J.; Williams, P. M.; Davies, M. C.; Jackson, D. E.; Tendler, S. J. B. Approaches to the immobilization of proteins at surfaces for analysis by scanning tunneling microscopy. *Langmuir* **1993**, *9* (9), 2356–2362.
- (86) Collings, A. F.; Caruso, F. Biosensors: recent advances. *Reports Prog. Phys.* **1997**, *60* (11), 1397–1445.
- (87) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1103–1169.

- (88) Lebec, V.; Boujday, S.; Poleunis, C.; Pradier, C.-M.; Delcorte, A. Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Investigation of the Orientation of Adsorbed Antibodies on SAMs Correlated to Biorecognition Tests. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (4), 2085–2092.
- (89) Hamoudi, H.; Dablemont, C.; Esaulov, V. a. Disorder, solvent effects and substitutional self-assembly of alkane dithiols from alkane thiol SAMs. *Surf. Sci.* **2011**, *605* (1–2), 116–120.
- (90) Huang, X.; Liu, N.; Moumanis, K.; Dubowski, J. J. Water-Mediated Self-Assembly of 16-Mercaptohexadecanoic Acid on GaAs (001). *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (29), 15090–15097.
- (91) Huang, X.; Dubowski, J. Solvent-mediated self-assembly of hexadecanethiol on GaAs (001). *Appl. Surf. Sci.* **2014**, 1–7.
- (92) Mekhalif, Z.; Laffineur, F.; Couturier, N.; Delhalle, J. Elaboration of Self-Assembled Monolayers of n -Alkanethiols on Nickel Polycrystalline Substrates: Time, Concentration, and Solvent Effects. *Langmuir* **2003**, *19* (3), 637–645.
- (93) Han, Y.; Uosaki, K. Effects of concentration and temperature on the formation process of decanethiol self-assembled monolayer on Au(111) followed by electrochemical reductive desorption. *Electrochim. Acta* **2008**, *53* (21), 6196–6201.
- (94) Mamun, a. H. a.; Hahn, J. R. Effects of Immersion Temperature on Self-Assembled Monolayers of Octanethiol on Au(111). *Surf. Sci.* **2012**, *606* (5–6), 664–669.
- (95) Yamada, R.; Wano, H.; Uosaki, K. Effect of Temperature on Structure of the Self-Assembled Monolayer of Decanethiol on Au(111) Surface. *Langmuir* **2000**, *16* (13), 5523–5525.
- (96) Silin, V.; Weetall, H.; Vanderah, D. SPR Studies of the Nonspecific Adsorption Kinetics of Human IgG and BSA on Gold Surfaces Modified by Self-Assembled Monolayers (SAMs). *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *185* (1), 94–103.
- (97) Lokanathan, A. R.; Zhang, S.; Regina, V. R.; Cole, M. a; Ogaki, R.; Dong, M.; Besenbacher, F.; Meyer, R. L.; Kingshott, P. Mixed poly (ethylene glycol) and oligo (ethylene glycol) layers on gold as nonfouling surfaces created by backfilling. *Biointerphases* **2011**, *6* (4), 180–188.
- (98) Kirchner, C.; George, M.; Stein, B.; Parak, W.; Gaub, H.; Seitz, M. Long-term Protection and Functionalization of Gallium Arsenide Surfaces in Aqueous Environment. *Bayreuth Polym. Symp. Int. Symp. Funct. Struct. Polym. Mater.* **2001**, No. 4, 266–276.
- (99) He, W.; Huang, Z.; Zhou, Q. Anti-corrosion effect of thiol self-assembled monolayers on Ag plate. **2013**, 555–559.
- (100) Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of n-Alkanethiolates on Copper are Barrier Films That Protect the Metal against Oxidation by Air. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9022–9028.
- (101) Stevens, M. J.; Grest, G. S. Simulations of water at the interface with hydrophilic self-assembled monolayers. *Biointerphases* **2008**, *3* (3), FC13-C22.
- (102) Youngnam, C.; Albena, I. In Vitro Assessment of the Biocompatibility of Chemically Modified GaAs Surfaces. *Nanobiotechnology* **2005**, *0* (2), 93–104.
- (103) Heimel, G.; Romaner, L.; Zojer, E.; Bre, J. Toward Control of the Metal – Organic Interfacial Electronic Structure in Molecular Electronics : A First-Principles Study

- on Self-Assembled Monolayers of π -Conjugated Molecules on Noble Metals. **2007**, 48 (c).
- (104) Dubowski, J. J.; Voznyy, O.; Marshall, G. M. Molecular self-assembly and passivation of GaAs (001) with alkanethiol monolayers: A view towards bio-functionalization. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, 256 (19), 5714–5721.
- (105) Sheen, C. W.; Shi, J. X.; Maartensson, J.; Parikh, A. N.; Allara, D. L. A new class of organized self-assembled monolayers: alkane thiols on gallium arsenide(100). *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (4), 1514–1515.
- (106) McGuinness, C. L.; Blasini, D.; Masejewski, J. P.; Uppili, S.; Cabarcos, O. M.; Smilgies, D.; Allara, D. L. Molecular self-assembly at bare semiconductor surfaces: characterization of a homologous series of n-alkanethiolate monolayers on GaAs(001). *ACS Nano* **2007**, 1 (1), 30–49.
- (107) Marshall, G. M.; Bensebaa, F.; Dubowski, J. J. Surface barrier analysis of semi-insulating and n+-type GaAs(001) following passivation with n-alkanethiol SAMs. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, 257 (9), 4543–4546.
- (108) Dorsten, J. F.; Dorsten, J. F.; Maslar, J. E.; Maslar, J. E.; Bohn, P. W.; Bohn, P. W. Near-surface electronic structure in GaAs (100) modified with self-assembled monolayers of octadecylthiol. *Appl. Phys. Lett.* **1995**, 66 (14), 1755–1757.
- (109) Traub, M. Chemical functionalization and electronic passivation of gallium arsenide surfaces. **2008**, 2008.
- (110) Arudra, P.; Marshall, G. M.; Liu, N.; Dubowski, J. J. Enhanced Photonic Stability of GaAs in Aqueous Electrolyte Using Alkanethiol Self-Assembled Monolayers and Postprocessing with Ammonium Sulfide. *J. Phys. Chem. C* **2012**, 116 (4), 2891–2895.
- (111) Thurmond, C. D. GaAs Oxidation and the Ga-As-O Equilibrium Phase Diagram. *J. Electrochem. Soc.* **1980**, 127 (6), 1366.
- (112) Voznyy, O.; Dubowski, J. J. Structure of thiol self-assembled monolayers commensurate with the GaAs (001) surface. *Langmuir* **2008**, 24 (23), 13299–13305.
- (113) Voznyy, O.; Dubowski, J. J. Adsorption Kinetics of Hydrogen Sulfide and Thiols on GaAs (001) Surfaces in a Vacuum. *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112 (10), 3726–3733.
- (114) McGuinness, C. L.; Diehl, G. A.; Blasini, D.; Smilgies, D.; Zhu, M.; Samarth, N.; Weidner, T.; Ballav, N.; Zharnikov, M.; Allara, D. L. Molecular self-assembly at bare semiconductor surfaces: cooperative substrate-molecule effects in octadecanethiolate monolayer assemblies on GaAs(111), (110), and (100). *ACS Nano* **2010**, 4 (6), 3447–3465.
- (115) Baca, A. G.; Ashby, C. I. H. *Fabrication of GaAs Devices*; Institution of Engineering and Technology: London, 2005.
- (116) Chang, C. C. Chemical preparation of GaAs surfaces and their characterization by Auger electron and x-ray photoemission spectroscopies. *J. Vac. Sci. Technol.* **1977**, 14 (4), 943.
- (117) Lebedev, M. V.; Mankel, E.; Mayer, T.; Jaegermann, W. Etching of GaAs(100) with Aqueous Ammonia Solution: A Synchrotron-Photoemission Spectroscopy Study. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114 (49), 21385–21389.
- (118) Reth, M. Matching cellular dimensions with molecular sizes. *Nat. Immunol.* **2013**, 14 (8), 765–767.

- (119) Voznyy, O.; Dubowski, J. J. Structure, bonding nature, and binding energy of alkanethiolate on As-rich GaAs (001) surface: a density functional theory study. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (47), 23619–23622.
- (120) Bonroy, K.; Frederix, F.; Reekmans, G.; Dewolf, E.; De Palma, R.; Borghs, G.; Declerck, P.; Goddeeris, B. Comparison of random and oriented immobilisation of antibody fragments on mixed self-assembled monolayers. *J. Immunol. Methods* **2006**, *312* (1–2), 167–181.
- (121) Briand, E.; Salmain, M.; Herry, J.-M.; Perrot, H.; Compère, C.; Pradier, C.-M. Building of an immunosensor: how can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency? *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22* (3), 440–448.
- (122) Rickert, J.; Göpel, W.; Beck, W.; Jung, G.; Heiduschka, P. A “mixed” self-assembled monolayer for an impedimetric immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11* (8), 757–768.
- (123) Huang, L.; Reekmans, G.; Saerens, D.; Friedt, J. M.; Frederix, F.; Francis, L.; Muyltermans, S.; Campitelli, A.; Van Hoof, C. Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21* (3), 483–490.
- (124) Frederix, F.; Bonroy, K.; Laureyn, W.; Reekmans, G.; Campitelli, A.; Dehaen, W.; Maes, G. Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold. *Langmuir* **2003**, *19* (10), 4351–4357.
- (125) Ren, J.; Ding, X.; Greer, J. J.; Shankar, K. Increased detection of human cardiac troponin I by a decrease of nonspecific adsorption in diluted self-assembled monolayers. *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258* (13), 5230–5237.
- (126) Jung, L. S.; Nelson, K. E.; Stayton, P. S.; Campbell, C. T. Binding and dissociation kinetics of wild-type and mutant streptavidins on mixed biotin-containing alkythiolate monolayers. *Langmuir* **2000**, *16* (24), 9421–9432.
- (127) Bienaime, A.; Leblois, T.; Lucchi, G.; Blondeau-Patissier, V.; Ducoroy, P.; Boireau, W.; Elie-Caille, C. Reconstitution of a protein monolayer on thiolates functionalized GaAs surface. *Int. J. Nanosci.* **2012**, *11* (4), 1240018.
- (128) Bienaime, A.; Leblois, T.; Gremaud, N.; Chaudon, M.-J.; Osta, M.; Pecqueur, D.; Ducoroy, P.; Elie-Caille, C. Influence of a Thiolate Chemical Layer on GaAs (100) Biofunctionalization: An Original Approach Coupling Atomic Force Microscopy and Mass Spectrometry Methods. *Materials (Basel)*. **2013**, *6* (11), 4946–4966.
- (129) Laibinis, P. E.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Structure of monolayers formed by coadsorption of two n-alkanethiols of different chain lengths on gold and its relation to wetting. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96* (12), 5097–5105.
- (130) Folkers, J. P.; Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M. Self-assembled monolayers of alkanethiols on gold: comparisons of monolayers containing mixtures of short- and long-chain constituents with methyl and hydroxymethyl terminal groups. *Langmuir* **1992**, *8* (5), 1330–1341.
- (131) Silin, V.; Weetall, H.; Vanderah, D. SPR Studies of the Nonspecific Adsorption Kinetics of Human IgG and BSA on Gold Surfaces Modified by Self-Assembled Monolayers (SAMs). *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *185* (1), 94–103.

- (132) Mrksich, M.; Whitesides, G. M. Using Self-Assembled Monolayers to Understand the Interactions of Man-made Surfaces with Proteins and Cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *25*, 55–78.
- (133) Marttila, A. T.; Laitinen, O. H.; Airenne, K. J.; Kulik, T.; Bayer, E. a.; Wilchek, M.; Kulomaa, M. S. Recombinant Neutral Avidin: a non-glycosylated, acidic mutant of chicken avidin that exhibits high affinity for biotin and low non-specific binding properties. *FEBS Lett.* **2000**, *467* (1), 31–36.
- (134) Green, N. Avidin. The Use of [¹⁴C]Biotin For Kinetic Studies and for Assay. *Biochem. J.* **1963**, *89* (3), 585–591.
- (135) Thermo Fisher Scientific. Carbodiimide Crosslinker Chemistry <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html> (accessed May 1, 2016).
- (136) Fischer, M. J. E. Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *627*, 55–73.
- (137) Pedone, E.; Li, X.; Koseva, N.; Alpar, O.; Brocchini, S. An information rich biomedical polymer library. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2825–2837.
- (138) Kim, D. J.; Pitchimani, R.; Snow, D. E.; Hope-Weeks, L. J. A simple method for the removal of thiols on gold surfaces using an NH₄OH-H₂O₂-H₂O solution. *Scanning* **2008**, *30* (2), 118–122.
- (139) Johnson, B. N.; Mutharasan, R. Regeneration of Gold Surfaces Covered by Adsorbed Thiols and Proteins Using Liquid-Phase Hydrogen Peroxide-Mediated UV-Photooxidation. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (3), 1335–1341.
- (140) Nishida, N.; Hara, M.; Sasabe, H.; Knoll, W. Thermal Desorption Spectroscopy of Alkanethiol Self-Assembled Monolayer on Au (111). *Jpn. J. Appl. Phys.* **1996**, *35*, 5866.
- (141) Raiber, K.; Terfort, A.; Benndorf, C.; Krings, N.; Strehblow, H.-H. Removal of self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold by plasma cleaning. *Surf. Sci.* **2005**, *595* (1–3), 56–63.
- (142) Widrig, C. A.; Chung, C.; Porter, M. D. The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1991**, *310* (1–2), 335–359.
- (143) Lewis, M.; Tarlov, M.; Carron, K. Study of the Photooxidation Process of Self-Assembled Alkanethiol Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (37), 9574–9575.
- (144) Chenakin, S. P.; Heinz, B.; Morgner, H. Angular and energy effects in sputtering of hexadecanethiol monolayers self-assembled on Ag(111). *Surf. Sci.* **1999**, *436* (1), 131–140.
- (145) Lim, H.; Carraro, C.; Maboudian, R.; Pruessner, M. W.; Ghodssi, R. Chemical and thermal stability of alkanethiol and sulfur passivated InP(100). *Langmuir* **2004**, *20* (3), 743–747.
- (146) Huang, T. P.; Lin, T. H.; Teng, T. F.; Lai, Y. H.; Hung, W. H. Adsorption and thermal reaction of short-chain alkanethiols on GaAs(100). *Surf. Sci.* **2009**, *603* (9), 1244–1252.
- (147) Zhou, C.; Jones, J. C.; Trionfi, A.; Hsu, J. W. P.; Walker, A. V. Electron beam-induced damage of alkanethiolate self-assembled monolayers adsorbed on GaAs

- (001): A static sims investigation. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (1), 5400–5409.
- (148) Zhou, C.; Trionfi, A.; Jones, J. C.; Hsu, J. W. P.; Walker, A. V. Comparison of chemical lithography using alkanethiolate self-assembled monolayers on GaAs (001) and Au. *Langmuir* **2010**, *26* (6), 4523–4528.
- (149) Zhou, C.; Walker, A. V. UV Photooxidation of a Homologous Series of n-Alkanethiolate Monolayers on GaAs(001): A Static SIMS Investigation. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (3), 797–805.
- (150) Zhou, C.; Walker, A. V. UV photooxidation and photopatterning of alkanethiolate self-assembled monolayers (SAMs) on GaAs (001). *Langmuir* **2007**, *23* (17), 8876–8881.
- (151) Jobbins, M. M.; Agostino, C. J.; Michel, J. D.; Caponigri-Guerra, G.; Nees, S. B.; Alex Kandel, S. Flash sample heating for scanning tunneling microscopy: Desorption of 1-octanethiolate self-assembled monolayers in air. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **2013**, *31* (1), 13201.
- (152) Shadnam, M. R.; Amirfazli, A. Kinetics of alkanethiol monolayer desorption from gold in air. *Chem. Commun.* **2005**, No. 38, 4869.
- (153) Stettner, J.; Winkler, A. Characterization of alkanethiol self-assembled monolayers on gold by thermal desorption spectroscopy. *Langmuir* **2010**, *26* (12), 9659–9665.
- (154) Bensebaa, F.; Ellis, T. H.; Badia, a.; Lennox, R. B. Thermal Treatment of n - Alkanethiolate Monolayers on Gold, As Observed by Infrared Spectroscopy. *Langmuir* **1998**, *14* (9), 2361–2367.
- (155) Chang, W.; Choi, M.; Kim, J.; Cho, S.; Whang, K. Sub-micron scale patterning using femtosecond laser and self-assembled monolayers interaction. *Appl. Surf. Sci.* **2005**, *240* (1–4), 296–304.
- (156) Iversen, L.; Younes-Metzler, O.; Martinez, K. L.; Stamou, D. Chemically Specific Laser-Induced Patterning of Alkanethiol SAMs: Characterization by SEM and AFM. *Langmuir* **2009**, *25* (21), 12819–12824.
- (157) Mathieu, M.; Franzka, S.; Koch, J.; Chichkov, B. N.; Hartmann, N. Self-assembled organic monolayers as high-resolution resists in rapid nonlinear processing with single femtosecond laser pulses. *Appl. Phys. A* **2010**, *101* (3), 461–466.
- (158) Shadnam, M. R.; Kirkwood, S. E.; Fedosejevs, R.; Amirfazli, A. Thermo-Kinetics Study of Laser-Induced Desorption of Self-Assembled Monolayers from Gold: Case of Laser Micropatterning. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (24), 11996–12002.
- (159) Zhang, M. Y.; Shadnam, M. R.; Amirfazli, a. Direct laser patterning of self-assembled monolayer using elliptical laser beams: A theoretical parametric study. *Opt. Laser Technol.* **2011**, *43* (8), 1377–1384.
- (160) Elms, F. M.; George, G. a. Plasma reactions of self-assembled monolayers to model oxygen atom effects on polymers. *Polym. Adv. Technol.* **1998**, *9* (1), 31–37.
- (161) Brewer, N. J.; Janusz, S.; Critchley, K.; Evans, S. D.; Leggett, G. J. Photooxidation of Self-Assembled Monolayers by Exposure to Light of Wavelength 254 nm: A Static SIMS Study. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (22), 11247–11256.
- (162) Cooper, E.; Leggett, G. J. Static Secondary Ion Mass Spectrometry Studies of Self-Assembled Monolayers: Influence of Adsorbate Chain Length and Terminal Functional Group on Rates of Photooxidation of Alkanethiols on Gold. *Langmuir* **1998**, *14* (22), 4795–4801.

- (163) Huang, J.; Hemminger, J. C. Photooxidation of thiols in self-assembled monolayers on gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3342–3343.
- (164) Hutt, D. a.; Leggett, G. J. Influence of Adsorbate Ordering on Rates of UV Photooxidation of Self-Assembled Monolayers. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (16), 6657–6662.
- (165) McGuinness, C. L.; Shaporenko, A.; Mars, C. K.; Uppili, S.; Zharnikov, M.; Allara, D. L. Molecular self-assembly at bare semiconductor surfaces: preparation and characterization of highly organized octadecanethiolate monolayers on GaAs(001). *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (15), 5231–5243.
- (166) Choi, S.; Chae, J. A regenerative biosensing surface in microfluidics using electrochemical desorption of short-chain self-assembled monolayer. *Microfluid. Nanofluidics* **2009**, *7* (6), 819–827.
- (167) Shepherd, J. L.; Kell, A.; Chung, E.; Sinclair, C. W.; Workentin, M. S.; Bizzotto, D. Selective reductive desorption of a SAM-coated gold electrode revealed using fluorescence microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (26), 8329–8335.
- (168) Yang, D.-F.; Wilde, C. P.; Morin, M. Studies of the Electrochemical Removal and Efficient Re-formation of a Monolayer of Hexadecanethiol Self-Assembled at an Au(111) Single Crystal in Aqueous Solutions. *Langmuir* **1997**, *13* (23), 243–249.
- (169) Kang, J.; Rowntree, P. A. Gold Film Surface Preparation for Self-Assembled Monolayer Studies. *Langmuir* **2007**, *23* (2), 509–516.
- (170) Mauriz, E.; Calle, a; Manclús, J. J.; Montoya, a; Hildebrandt, a; Barceló, D.; Lechuga, L. M. Optical immunosensor for fast and sensitive detection of DDT and related compounds in river water samples. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (7), 1410–1418.
- (171) Pak-Leong, L. Isolation of specific IgM monoclonal antibodies by affinity chromatography using alkaline buffers. *Mol. Immunol.* **1987**, *24* (1), 11–15.
- (172) Andersson, K.; Hämäläinen, M.; Malmqvist, M. Identification and optimization of regeneration conditions for affinity- based biosensor assays. A multivariate cocktail approach. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (13), 2475–2481.
- (173) Albrecht, C.; Kaepfel, N.; Gauglitz, G. Two immunoassay formats for fully automated CRP detection in human serum. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391* (5), 1845–1852.
- (174) Bandyopadhyay, K.; Patil, V.; Sastry, M.; Vijayamohan, K. Effect of Geometric Constraints on the Self-Assembled Monolayer Formation of Aromatic Disulfides on Polycrystalline Gold. *Langmuir* **1998**, *14* (14), 3808–3814.
- (175) Zhang, B.; Mao, Q.; Zhang, X.; Jiang, T.; Chen, M.; Yu, F.; Fu, W. A novel piezoelectric quartz micro-array immunosensor based on self-assembled monolayer for determination of human chorionic gonadotropin. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19* (7), 711–720.
- (176) Tedeschi, L.; Domenici, C.; Ahluwalia, A.; Baldini, F.; Mencaglia, A. Antibody immobilisation on fibre optic TIRF sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19* (2), 85–93.
- (177) Yao, C.; Qi, Y.; Zhao, Y.; Xiang, Y.; Chen, Q.; Fu, W. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (8), 2499–2503.

- (178) Drake, A. W.; Klakamp, S. L. A strategic and systematic approach for the determination of biosensor regeneration conditions. *J. Immunol. Methods* **2011**, *371* (1–2), 165–169.
- (179) Delport, F.; Pollet, J.; Janssen, K.; Verbruggen, B.; Knez, K.; Spasic, D.; Lammertyn, J. Real-time monitoring of DNA hybridization and melting processes using a fiber optic sensor. *Nanotechnology* **2012**, *23* (6), 65503.
- (180) Liron, Z.; Tender, L. M.; Golden, J. P.; Ligler, F. S. Voltage-induced inhibition of antigen-antibody binding at conducting optical waveguides. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17* (6–7), 489–494.
- (181) Pritchard, D. J.; Morgan, H.; Cooper, J. M. Patterning and regeneration of surfaces with antibodies. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (19), 3605–3607.
- (182) Holmberg, A.; Blomstergren, A.; Nord, O.; Lukacs, M.; Lundeberg, J.; Uhlén, M. The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* **2005**, *26* (3), 501–510.
- (183) Yoon, H. C.; Hong, M. Y.; Kim, H. S. Reversible association/dissociation reaction of avidin on the dendrimer monolayer functionalized with a biotin analogue for a regenerable affinity-sensing surface. *Langmuir* **2001**, *17* (4), 1234–1239.
- (184) Burenkov, Y. A.; Burdakov, Y. M.; Davidov, S. Y.; Nikanorov, S. P. Temperature dependence of the elastic constants of GaAs. *Sov. Physics-Solid State* **1973**, *15* (6), 1175–1177.
- (185) Hickernell, F. S.; Adler, E. L. Theoretical and experimental characterization of SAW propagation for zinc oxide on gallium arsenide including viscosity constants. *Ultrason. Symp. 1997. Proceedings., 1997 IEEE* **1997**, *1*, 211–215 vol.1.
- (186) Wang, W.; Zhang, C.; Zhang, Z.; Ma, T.; Feng, G. Energy-trapping mode in lateral-field-excited acoustic wave devices. *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *94* (19), 192901.
- (187) Dickherber, A.; Corso, C. D.; Hunt, W. Lateral Field Excitation (LFE) of Thickness Shear Mode (TSM) acoustic waves in thin Film Bulk Acoustic Resonators (FBAR) as a potential biosensor. *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. - Proc.* **2006**, 4590–4593.
- (188) McCann, D. F.; Vetelino, J. F.; Wark, M. S.; French, L. A. Novel transducer configurations for bulk acoustic wave sensors. In *Proceedings of IEEE Sensors; 2008*; pp 1448–1451.
- (189) Bienaime, A.; Liu, L.; Elie-Caille, C.; Leblois, T. Design and microfabrication of a lateral excited gallium arsenide biosensor. *Eur. Phys. J. - Appl. Phys.* **2012**, *57* (2).
- (190) Soderkvist, J.; Hjort, K. The piezoelectric effect of GaAs used for resonators and resonant sensors. *J. Micromechanics Microengineering* **1994**, *4* (1), 28–34.
- (191) Ballato, A. Extended Christoffel-Bechmann elastic wave formalism for piezoelectric, dielectric media. In *Proceedings of the Annual IEEE International Frequency Control Symposium; 2000*; pp 340–344.
- (192) Rayleigh, L. On Waves Propagated along the Plane Surface of an Elastic Solid. *Proc. London Math. Soc.* **1885**, *s1-17* (1), 4–11.
- (193) Rosenbaum, J. F. *Bulk Acoustic Wave Theory and Devices*; Artech House: Boston, 1988.
- (194) Wang, W.; Zhang, C.; Liu, Y.; Ding, T. Impedance analysis for lateral field excited

- acoustic wave sensors. *Sensors Actuators B Chem.* **2011**, *156* (2), 969–975.
- (195) Kanazawa, K.; Gordon, J. Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Anal. Chem.* **1985**, *1771* (9), 1770–1771.
- (196) Hu, Y.; French, L. A.; Radecsky, K.; Pereira da Cunha, M.; Millard, P.; Vetelino, J. F. A lateral field excited liquid acoustic wave sensor. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2004**, *51* (11), 1373–1380.
- (197) Bienaime, A. Microcapteur en arséniure de gallium pour la détection de molécules dans un fluide. Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté: Besançon, France, 2012.
- (198) Hu, Y.; Pinkham, W.; French, L. a.; Frankel, D.; Vetelino, J. F. Pesticide detection using a lateral field excited acoustic wave sensor. *Sensors Actuators B Chem.* **2005**, *108* (1–2), 910–916.
- (199) York, C.; French, L. A.; Millard, P.; Vetelino, J. F. A lateral field excited acoustic wave biosensor. In *IEEE Ultrasonics Symposium, 2005.*; IEEE, 2005; Vol. 1, pp 44–49.
- (200) Bienaime, A.; Elie-Caille, C.; Leblois, T. Micro structuration of GaAs surface by wet etching: towards a specific surface behavior. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, *12* (8), 6855–6863.
- (201) Song, J. S.; Choi, Y. C.; Seo, S. H.; Oh, D. C.; Cho, M. W.; Yao, T.; Oh, M. H. Wet chemical cleaning process of GaAs substrate for ready-to-use. *J. Cryst. Growth* **2004**, *264* (1–3), 98–103.
- (202) Tellier, C. R.; Huve, G.; Leblois, T. G. Micromachining of GaAs structures with an acidic hydrogen peroxide solution: Experimental and theoretical 3D etching shapes. *Sensors Actuators A Phys.* **2006**, *127* (1), 179–193.
- (203) Tellier, C. R.; Huve, G.; Leblois, T. G. Anisotropic Chemical Etching of III–V Crystals Dissolution Slowness Surface and Application to GaAs. *Act. Passiv. Electron. Components* **2004**, *27* (3), 133–154.
- (204) Chen, E. *Introduction to Nanofabrication*; 2004.
- (205) Madou, M. J. *Fundamentals of Microfabrication: Manufacturing Techniques for Microfabrication and Nanotechnology*; CRC Press, 2002; Vol. 2.
- (206) Bhardwaj, J.; Ashraf, H.; McQuarrie, A. Dry Silicon Etching for MEMS. *Int. Symp. Microstruct. Microfabr. Syst.* **1997**, 118–130.
- (207) Lee, J. W.; Hong, J.; Lambers, E. S.; Abernathy, C. R.; Pearton, S. J.; Hobson, W. S.; Ren, F. Plasma etching of III–V semiconductors in BCl₃ chemistries: Part II: InP and related compounds. *Plasma Chem. Plasma Process.* **1997**, *17* (2), 169–179.
- (208) Volatier, M.; Duchesne, D.; Morandotti, R.; Arès, R.; Aimez, V. Extremely high aspect ratio GaAs and GaAs/AlGaAs nanowaveguides fabricated using chlorine ICP etching with N₂-promoted passivation. *Nanotechnology* **2010**, *21* (13), 134014.
- (209) Franz, G. High-rate etching of GaAs using chlorine atmospheres doped with a Lewis acid. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **1998**, *16* (3), 1542.
- (210) Rawal, D.; Agarwal, V.; Sharma, H.; Sehgal, B.; Muralidharan, R. Dry Etching of GaAs to Fabricate Via-Hole Grounds in Monolithic Microwave Integrated Circuits. *Def. Sci. J.* **2009**, *59* (4), 363–370.
- (211) Agarwala, S.; Horst, S.; King, O. High-density inductively coupled plasma etching

- of GaAs/AlGaAs in BCl₃/Cl₂/Ar: A study using a mixture design experiment. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **1998**, 511–514.
- (212) Wang, H.; Guo, X.; Shen, G. GaAs backside via-hole etching using ICP system. *Sci. China Ser. E Technol. Sci.* **2007**, 50 (6), 749–754.
- (213) Rawal, D. S.; Agarwal, V. R.; Sharma, H. S.; Sehgal, B. K.; Muralidharan, R.; Malik, H. K. Study of inductively coupled Cl₂/BCl₃ plasma process for high etch rate selective etching of via-holes in GaAs. *Vacuum* **2010**, 85 (3), 452–457.
- (214) Lee, J. W.; Devre, M. W.; Reelfs, B. H.; Johnson, D.; Sasserath, J. N.; Clayton, F.; Hays, D.; Pearton, S. J. Advanced selective dry etching of GaAs/AlGaAs in high density inductively coupled plasmas. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **2000**, 18 (4), 1220.
- (215) Lim, W. T.; Baek, I. K.; Lee, J. W.; Lee, E. S.; Jeon, M. H.; Cho, G. S.; Pearton, S. J. BCl₃/Ne etching of III-V semiconductors in a planar inductively coupled plasma reactor. *Appl. Surf. Sci.* **2004**, 222 (1–4), 74–81.
- (216) Reif, A.; Streubel, P.; Meisel, A.; Zeissig, D. Characterization of the Diffusion and Reaction Behaviour of Ti/Pt/Au Layer Contacts on GaAs by Means of Auger Electron Spectroscopy and Ion Sputtering Technique. *Phys. Status Solidi* **1990**, 122 (1), 331–340.
- (217) Miller, D. C. The Alloying of Gold and Gold Alloy Ohmic Contact Metallizations with Gallium Arsenide. *J. Electrochem. Soc.* **1980**, 127 (2), 467.
- (218) Billot, M. Microcapteur fluïdique à ondes de Lamb. Mémoire de master, Université de Franche-Comté: Besançon, France, 2012.
- (219) Azzopardi, C.-L. Amélioration de l'écoulement dans une puce microfluidique. Mémoire de master, Université de Franche-Comté: Besançon, France, 2014.
- (220) Vulto, P.; Huesgen, T.; Albrecht, B.; Urban, G. a. A full-wafer fabrication process for glass microfluidic chips with integrated electroplated electrodes by direct bonding of dry film resist. *J. Micromechanics Microengineering* **2009**, 19 (7), 77001.
- (221) Vulto, P.; Glade, N.; Altomare, L.; Bablet, J.; Tin, L. Del; Medoro, G.; Chartier, I.; Manaresi, N.; Tartagni, M.; Guerrieri, R. Microfluidic channel fabrication in dry film resist for production and prototyping of hybrid chips. *Lab Chip* **2005**, 5 (2), 158.
- (222) Vulto, P.; Podszun, S.; Meyer, P.; Hermann, C.; Manz, A.; Urban, G. a. Phaseguides: a paradigm shift in microfluidic priming and emptying. *Lab Chip* **2011**, 11 (9), 1596.
- (223) Vulto, P. A Lab-on-a-Chip for automated RNA extraction from bacteria. Thèse de Doctorat, University of Freiburg: Freiburg, Allemagne, 2008.
- (224) Griffiths, P. R.; de Haseth, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*; John Wiley & Sons, 2007.
- (225) Soderberg, T. *Organic Chemistry with a Biological Emphasis*; University of Minnesota, 2010; Vol. 2.
- (226) Werner, H.; Gronholz, J. Understanding FT-IR Data Processing. Part 1: Data Acquisition and Fourier Transformation. *Comput. Appl. Lab.* **1984**, 2, 216–220.
- (227) Pike Technologies. *ATR - Theory and Applications - Application Note*; 2011.

- (228) Ding, X.; Moumanis, K.; Dubowski, J. J.; Tay, L.; Rowell, N. L. Fourier-transform infrared and photoluminescence spectroscopies of self-assembled monolayers of long-chain thiols on (001) GaAs. *J. Appl. Phys.* **2006**, *99* (5), 54701.
- (229) Buffeteau, T.; Desbat, B.; Turlet, J. M. Polarization Modulation FT-IR Spectroscopy of Surfaces and Ultra-thin Films: Experimental Procedure and Quantitative Analysis. *Appl. Spectrosc.* **1991**, *45* (3), 380–389.
- (230) Saccani, J.; Buffeteau, T.; Desbat, B.; Blaudez, D. Increasing detectivity of polarization modulation infrared reflection–absorption spectroscopy for the study of ultrathin films deposited on various substrates. *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57* (10), 1260–1265.
- (231) Hatta, A.; Wadayama, T.; Suëtaka, W. A Polarization Modulation Infrared Reflection Applied to Study of Thin Films on Metal and Semiconductor Surfaces. *Anal. Sci.* **1985**, *1* (5), 403–408.
- (232) Marshall, G. M. Electro-optic investigation of the n-alkanethiol GaAs(001) interface: surface phenomena and applications to photoluminescence-based biosensing. Thèse de Doctorat, Université de Sherbrooke: Sherbrooke, Canada, 2011.
- (233) II-VI Infrared. Gallium Arsenide (GaAs) <http://www.iiviiinfrared.com/Optical-Materials/gaas.html> (accessed May 1, 2016).
- (234) Parikh, A. N.; Allara, D. L. Quantitative determination of molecular structure in multilayered thin films of biaxial and lower symmetry from photon spectroscopies. I. Reflection infrared vibrational spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96* (2), 927.
- (235) Jun, Y.; Zhu, X.-Y.; Hsu, J. W. P. Formation of alkanethiol and alkanedithiol monolayers on GaAs(001). *Langmuir* **2006**, *22* (8), 3627–3632.
- (236) Zavadil, K. R. Ultraviolet photosulfidation of III–V compound semiconductors for electronic passivation. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **1994**, *12* (4), 1045.
- (237) Marshall, G. M.; Bensebaa, F.; Dubowski, J. J. Observation of surface enhanced IR absorption coefficient in alkanethiol based self-assembled monolayers on GaAs(001). *J. Appl. Phys.* **2009**, *105* (9), 94310.
- (238) Kim, C.-K.; Marshall, G. M.; Martin, M.; Bisson-Viens, M.; Wasilewski, Z.; Dubowski, J. J. Formation dynamics of hexadecanethiol self-assembled monolayers on (001) GaAs observed with photoluminescence and Fourier transform infrared spectroscopies. *J. Appl. Phys.* **2009**, *106* (8), 83518.
- (239) Stalder, A. F.; Kulik, G.; Sage, D.; Barbieri, L.; Hoffmann, P. A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *286* (1–3), 92–103.
- (240) Ye, S.; Li, G.; Noda, H.; Uosaki, K.; Osawa, M. Characterization of self-assembled monolayers of alkanethiol on GaAs surface by contact angle and angle-resolved XPS measurements. *Surf. Sci.* **2003**, *529* (1–2), 163–170.
- (241) Arnold, R.; Azzam, W.; Terfort, A.; Wöll, C. Preparation, Modification, and Crystallinity of Aliphatic and Aromatic Carboxylic Acid Terminated Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2002**, *18* (10), 3980–3992.
- (242) Mahapatro, A.; Johnson, D. M.; Patel, D. N.; Feldman, M. D.; Ayon, A. a; Agrawal, C. M. The use of alkanethiol self-assembled monolayers on 316L stainless steel for

- coronary artery stent nanomedicine applications: an oxidative and in vitro stability study. *Nanomedicine* **2006**, 2 (3), 182–190.
- (243) Rei Vilar, M.; El Beghdadi, J.; Debontridder, F.; Artzi, R.; Naaman, R.; Ferraria, a. M.; Botelho do Rego, a. M. Characterization of wet-etched GaAs (100) surfaces. *Surf. Interface Anal.* **2005**, 37 (8), 673–682.
- (244) Lenczycki, C. ; Burrows, V. . Real-time studies of gallium arsenide anodic oxidation. *Thin Solid Films* **1990**, 193–194, 610–618.
- (245) Schweiss, R.; Werner, C.; Knoll, W. Impedance spectroscopy studies of interfacial acid Á base reactions of self-assembled monolayers. **2003**, 540, 145–151.
- (246) Morales-Cruz, A. L.; Tremont, R.; Martínez, R.; Romañach, R.; Cabrera, C. R. Atomic force measurements of 16-mercaptohexadecanoic acid and its salt with CH₃, OH, and CONHCH₃ functionalized self-assembled monolayers. *Appl. Surf. Sci.* **2005**, 241 (3–4), 371–383.
- (247) Méthivier, C.; Beccard, B.; Pradier, C. M. In Situ Analysis of a Mercaptoundecanoic Acid Layer on Gold in Liquid Phase, by PM-IRAS. Evidence for Chemical Changes with the Solvent. *Langmuir* **2003**, 19 (21), 8807–8812.
- (248) Mistry, B. D. *A Handbook of Spectroscopic Data Chemistry : UV, IR, PMR, CNMR and Mass Spectroscopy*; Oxford Book Company, 2009.
- (249) Young, A. G.; McQuillan, A. J.; Green, D. P. In situ IR spectroscopic studies of the avidin-biotin bioconjugation reaction on CdS particle films. *Langmuir* **2009**, 25 (13), 7416–7423.
- (250) de Oliveira, R. M.; Ferreira, J.; Santos, M. J. L.; Faria, R. M.; Oliveira, O. N. Probing the functionalization of gold surfaces and protein adsorption by PM-IRRAS. *Chemphyschem* **2011**, 12 (9), 1736–1740.
- (251) Nuzzo, R. G.; Dubois, L. H.; Allara, D. L. Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 1. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112 (2), 558–569.
- (252) GE Healthcare. *Biacore: Sensor Surface Handbook*; 2008.
- (253) Sam, S.; Touahir, L.; Salvador Andresa, J.; Allongue, P.; Chazalviel, J. N.; Gouget-Laemmel, a. C.; De Villeneuve, C. H.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Gabouze, N.; et al. Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. *Langmuir* **2010**, 26 (2), 809–814.
- (254) Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111 (1), 321–335.
- (255) Bensebaa, F.; Voicu, R.; Huron, L.; Ellis, T.; Kruus, E. Kinetics of formation of long-chain n-alkanethiolate monolayers on polycrystalline gold. *Langmuir* **1997**, 13 (9), 5335–5340.
- (256) Damos, F. S.; Luz, R. C. S.; Kubota, L. T. Determination of thickness, dielectric constant of thiol films, and kinetics of adsorption using surface plasmon resonance. *Langmuir* **2005**, 21 (2), 602–609.
- (257) Kye, J.; Hwang, S. In situ real time monitoring of kinetics of thiol adsorption on gold based on electrochemical steady-state current. *Electrochem. commun.* **2011**, 13 (11), 1209–1212.

- (258) Kim, Y.-K.; Koo, J. P.; Ha, J. S. Replacement of adsorbed alkanethiolate on Au with carboxyl-terminated thiol in solution: effect of alkyl chain length. *Appl. Surf. Sci.* **2005**, *249* (1–4), 7–11.
- (259) Baralia, G. G.; Duwez, A.-S.; Nysten, B.; Jonas, A. M. Kinetics of exchange of alkanethiol monolayers self-assembled on polycrystalline gold. *Langmuir* **2005**, *21* (15), 6825–6829.
- (260) Dai, J.; Li, Z.; Jin, J.; Cheng, J.; Kong, J.; Bi, S. Study of the solvent effect on the quality of dodecanethiol self-assembled monolayers on polycrystalline gold. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *624* (1–2), 315–322.
- (261) Palazon, F.; Benavides, C. M.; Léonard, D.; Souteyrand, É.; Chevolut, Y.; Cloarec, J.-P. Carbodiimide/NHS derivatization of COOH-terminated SAMs: activation or byproduct formation? *Langmuir* **2014**, *30* (16), 4545–4550.
- (262) Wu, J.; Prausnitz, J. M. Pairwise-additive hydrophobic effect for alkanes in water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (28), 9512–9515.
- (263) Zhang, Y.; Zhou, J.; Zhang, X.; Hu, J.; Gao, H. Solvent polarity effect on quality of n-octadecanethiol self-assembled monolayers on copper and oxidized copper. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *320*, 200–206.
- (264) Li, J.; Liang, K. S.; Scoles, G.; Ulman, A. Counterion Overlayers at the Interface between an Electrolyte and an omega-Functionalized Monolayer Self-Assembled on Gold. An X-ray Reflectivity Study. *Langmuir* **1995**, *11* (11), 4418–4427.
- (265) Bent, S. F. Heads or tails: Which is more important in molecular self-assembly? *ACS Nano* **2007**, *1* (1), 10–12.
- (266) Ives, N. a.; Stupian, G. W.; Leung, M. S. Unpinning of the Fermi level on GaAs by flowing water. *Appl. Phys. Lett.* **1987**, *50* (5), 256–258.
- (267) Bandekar, J. Amide modes and protein conformation. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1992**, *1120* (2), 123–143.
- (268) Nelis, T.; Pallosi, J. Glow Discharge as a Tool for Surface and Interface Analysis. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2006**, *41* (3), 227–258.
- (269) Shimizu, K.; Payling, R.; Habazaki, H. Rf-GDOES depth profiling analysis of a monolayer of thiourea adsorbed on copper. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19* (5), 692–695.
- (270) Nazemi, E.; Aithal, S.; Hassen, W. M.; Frost, E. H.; Dubowski, J. J. GaAs/AlGaAs heterostructure based photonic biosensor for rapid detection of Escherichia coli in phosphate buffered saline solution. *Sensors Actuators B Chem.* **2015**, *207*, 556–562.
- (271) Budz, H. A.; Ali, M. M.; Li, Y.; Lapierre, R. R. Photoluminescence model for a hybrid aptamer-GaAs optical biosensor. *J. Appl. Phys.* **2010**, *107* (10).
- (272) Duplan, V.; Miron, Y.; Frost, E.; Grandbois, M.; Dubowski, J. J. Specific immobilization of influenza A virus on GaAs (001) surface. *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14* (5), 54042.
- (273) Janegitz, B. C.; Cancino, J.; Zucolotto, V. Disposable Biosensors for Clinical Diagnosis. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 378–389.
- (274) Marasso, S. L.; Giuri, E.; Canavese, G.; Castagna, R.; Quaglio, M.; Ferrante, I.; Perrone, D.; Cocuzza, M. A multilevel Lab on chip platform for DNA analysis. *Biomed. Microdevices* **2011**, *13* (1), 19–27.

- (275) Costa, M. N.; Veigas, B.; Jacob, J. M.; Santos, D. S.; Gomes, J.; Baptista, P. V.; Martins, R.; Inácio, J.; Fortunato, E. A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper. *Nanotechnology* **2014**, *25* (9), 94006.
- (276) Taleat, Z.; Khoshroo, A.; Mazloum-Ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). *Microchim. Acta* **2014**, *181* (9–10), 865–891.
- (277) Roda, A.; Mirasoli, M.; Roda, B.; Bonvicini, F.; Colliva, C.; Reschiglian, P. Recent developments in rapid multiplexed bioanalytical methods for foodborne pathogenic bacteria detection. *Microchim. Acta* **2012**, *178* (1–2), 7–28.
- (278) Pedrero, M.; Campuzano, S.; Pingarrón, J. M. Electroanalytical Sensors and Devices for Multiplexed Detection of Foodborne Pathogen Microorganisms. *Sensors* **2009**, *9* (7), 5503–5520.
- (279) Li, J.; Yu, Y.; Wang, Y.; Qian, J.; Zhi, J. The benzoquinone-mediated electrochemical microbial biosensor for water biotoxicity assay. *Electrochim. Acta* **2013**, *97*, 52–57.
- (280) Aziziyan, M. R.; Hassen, W. M.; Morris, D.; Frost, E. H.; Dubowski, J. J. Photonic biosensor based on photocorrosion of GaAs/AlGaAs quantum heterostructures for detection of *Legionella pneumophila*. *Biointerphases* **2016**, *11* (1), 19301.
- (281) Rusling, J. F. Multiplexed electrochemical protein detection and translation to personalized cancer diagnosis. *Anal. Chem.* **2014**, *85* (11), 5304–5310.
- (282) Mousa, S. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2010**, *4* (1), 1–10.
- (283) Lacour, V.; Elie-Caille, C.; Leblois, T.; Dubowski, J. J. Regeneration of a thiolated and antibody functionalized GaAs (001) surface using wet chemical processes. *Biointerphases* **2016**, *11* (1), 19302.
- (284) Simpson, G. J.; Sedin, D. L.; Rowlen, K. L. Surface Roughness by Contact versus Tapping Mode Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **1999**, *15* (4), 1429–1434.
- (285) McArthur, S. L.; Mishra, G.; Easton, C. D. *Surface Analysis and Techniques in Biology*; Springer, 2014.
- (286) Marshall, G. M.; Lopinski, G. P.; Bensebaa, F.; Dubowski, J. J. Surface dipole layer potential induced ir absorption enhancement in n-alkanethiol SAMs on GaAs(001). *Langmuir* **2009**, *25* (23), 13561–13568.
- (287) Liu, N.; Poulin, S.; Dubowski, J. J. Enhanced photoluminescence emission from bandgap shifted InGaAs/InGaAsP/InP microstructures processed with UV laser quantum well intermixing. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2013**, *46* (44), 445103.
- (288) Ma, H. Y.; Yang, C.; Yin, B. S.; Li, G. Y.; Chen, S. H.; Luo, J. L. Electrochemical characterization of copper surface modified by n-alkanethiols in chloride-containing solutions. *Appl. Surf. Sci.* **2003**, *218* (1–4), 144–154.
- (289) Love, J. C.; Wolfe, D. B.; Chabynyc, M. L.; Paul, K. E.; Whitesides, G. M. Self-assembled monolayers of alkanethiolates on palladium are good etch resists. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (8), 1576–1577.
- (290) Tiberio, R. C.; Craighead, H. G.; Lercel, M.; Lau, T.; Sheen, C. W.; Allara, D. L. Self-assembled monolayer electron beam resist on GaAs. *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *62* (5), 476–478.

- (291) Bain, C. D.; Evall, J.; Whitesides, G. M. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (18), 7155–7164.
- (292) Thornton, J. A.; Penfold, A. S.; Vossen, J. L.; Kern, W. *Thin film processes*, Academic P.; New York, 1978.
- (293) Bryce, C.; Berk, D. Kinetics of GaAs Dissolution in H₂O₂–NH₄OH–H₂O Solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1996**, *35* (12), 4464–4470.
- (294) Frey, B. L.; Corn, R. M. Covalent Attachment and Derivatization of Poly(L-lysine) Monolayers on Gold Surfaces As Characterized by Polarization–Modulation FT-IR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (18), 3187–3193.
- (295) Ohno, H.; Nagahara, L. A.; Mizutani, W.; Takagi, J.; Tokumoto, H. Preparation of Self-Assembled Mercaptoalkanoic Acid Multilayers on GaAs (110) Surfaces. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1999**, *38* (Part 1, No. 1A), 180–185.
- (296) Tarlov, M. J.; Burgess, D. R. F.; Gillen, G. UV photopatterning of alkanethiolate monolayers self-assembled on gold and silver. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (12), 5305–5306.
- (297) Gillen, G.; Bennett, J.; Tarlov, M. J.; Burgess, D. R. F. Molecular Imaging Secondary Ion Mass Spectrometry for the Characterization of Patterned Self-Assembled Monolayers on Silver and Gold. *Anal. Chem.* **1994**, *66* (13), 2170–2174.
- (298) Norrod, K. L.; Rowlen, K. L. Ozone-induced oxidation of self-assembled decanethiol: Contributing mechanism for “photooxidation”? *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (11), 2656–2657.
- (299) Zhou, C.; Walker, A. V. Dependence of patterned binary alkanethiolate self-assembled monolayers on “UV-photopatterning” conditions and evolution with time, terminal group, and methylene chain length. *Langmuir* **2006**, *22* (26), 11420–11425.
- (300) Zhang, Y.; Terrill, R. H.; Bohn, P. W. Ultraviolet Photochemistry and ex Situ Ozonolysis of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold. *Chem. Mater.* **1999**, *11* (8), 2191–2198.
- (301) Zhang, Y.; Terrill, R. H.; Tanzer, T. a.; Bohn, P. W. Ozonolysis is the primary cause of UV photooxidation of alkanethiolate monolayers at low irradiance. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (11), 2654–2655.
- (302) Ding, X.; Dubowski, J. J. Stability of biofunctionalized GaAs surface; 2007; p 64581.
- (303) Sanz, M.; Rebollar, E.; Ganeev, R. a.; Castillejo, M. Nanosecond laser-induced periodic surface structures on wide band-gap semiconductors. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *278*, 325–329.
- (304) Brewer, P. D.; Zinck, J. J. Excimer laser ablation method and apparatus for microcircuit fabrication. US5018164 A, 1991.
- (305) Craciun, V.; Craciun, D. Thermal mechanisms in laser ablation of GaAs. *Appl. Surf. Sci.* **1997**, *109–110* (June 1996), 312–316.
- (306) Kasap, S.; Capper, P. *Springer Handbook of Electronic and Photonic Materials*; Springer: Boston, 2007; Vol. 10.
- (307) Casey, H. C.; Sell, D. D.; Wecht, K. W. Concentration dependence of the absorption

- coefficient for n- and p-type GaAs between 1.3 and 1.6 eV. *J. Appl. Phys.* **1975**, *46* (1), 250–257.
- (308) Jellison, G. E. Optical functions of GaAs, GaP, and Ge determined by two-channel polarization modulation ellipsometry. *Opt. Mater. (Amst)*. **1992**, *1* (3), 151–160.
- (309) Genest, J. Quantum Well Intermixing Controlled by Excimer Laser for Photonic Device Integration. Thèse de Doctorat, Université de Sherbrooke: Sherbrooke, 2008.
- (310) Perez, D.; Lewis, L. J. Ablation of solids under femtosecond laser pulses. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89* (25), 255504.
- (311) Luke, F. Ellipsometric Studies of Natural Films on GaAs. *Phys. status solidi* **1988**, *107*, 239–251.
- (312) Oblidal, I.; Libezny, M. Ellipsometric Analysis of Gallium Arsenide Surfaces Rp ap. *Surf. Interface Anal.* **1991**, *17* (July 1990), 171–176.
- (313) Wieliczka, D. M.; Ding, X.; Dubowski, J. J. X-ray photoelectron spectroscopy study of self-assembled monolayers of alkanethiols on (001) GaAs. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **2006**, *24* (5), 1756.
- (314) Shaporenko, A.; Adlkofer, K.; Johansson, L. S. O.; Ulman, A.; Grunze, M.; Tanaka, M.; Zharnikov, M. Spectroscopic Characterization of 4'-Substituted Aromatic Self-Assembled Monolayers on GaAs(100) Surface. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (46), 17964–17972.
- (315) Abbott, N. L.; Rolison, D. R.; Whitesides, G. M. Combining Micromachining and Molecular Self-Assembly To Fabricate Microelectrodes. *Langmuir* **1994**, *10* (8), 2672–2682.
- (316) Lercel, M. J.; Redinbo, G. F.; Craighead, H. G.; Sheen, C. W.; Allara, D. L. Scanning tunneling microscopy based lithography of octadecanethiol on Au and GaAs. *Appl. Phys. Lett.* **1994**, *65* (8), 974–976.
- (317) Lopez, G. P.; Biebuyck, H. A.; Whitesides, G. M. Scanning electron microscopy can form images of patterns in self-assembled monolayers. *Langmuir* **1993**, *9* (6), 1513–1516.
- (318) Götzhäuser, a.; Geyer, W.; Stadler, V.; Eck, W.; Grunze, M.; Edinger, K.; Weimann, T.; Hinze, P. Nanoscale patterning of self-assembled monolayers with electrons. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **2000**, *18* (6), 3414.
- (319) Azzopardi, B. Caractérisation d'un résonateur en arséniure de galium en fonction de la température. Mémoire de master, Université de Franche-Comté: Besançon, France, 2013.
- (320) Manceau, J.; Robert, L.; Bastien, F.; Oytana, C.; Biwersi, S. Measurement of Residual Stresses in a Plate Using a Vibrational Technique-Application to Electrolytic Nickel Coatings. **1996**, *5* (4).
- (321) Wang, J.; Yang, J.; Li, J. Energy trapping of thickness-shear vibration modes of elastic plates with functionally graded materials. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2007**, *54* (3), 687–690.
- (322) Kardous, F.; Rouleau, a; Simon, B.; Yahiaoui, R.; Manceau, J. F.; Boireau, W. Improving immunosensor performances using an acoustic mixer on droplet microarray. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26* (4), 1666–1671.
- (323) Chopard, T.; Bienaime, A.; Elie-Caille, C.; Leblois, T. High Sensitive Mass

- Detection using Piezoelectric Coupled Microcantilevers. *Procedia Eng.* **2012**, *47*, 350–353.
- (324) Gavish, N.; Promislow, K. Dependence of the dielectric constant of electrolyte solutions on ionic concentration: A microfield approach. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2016**, *94* (1), 1–14.
- (325) Hasted, J. B.; Ritson, D. M.; Collie, C. H. Dielectric Properties of Aqueous Ionic Solutions. Parts I and II. *J. Chem. Phys.* **1948**, *16* (1), 1–21.
- (326) Hermansson, M. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **1999**, *14* (1–4), 105–119.
- (327) Hori, K.; Matsumoto, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *48* (3), 424–434.
- (328) An, Y. H.; Friedman, R. J. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*; Humana Press, 2010.
- (329) Neidhardt, F.; Curtiss, R. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*; ASM press, Ed.; Washington DC, 1999; Vol. 1.
- (330) Law, J. W.-F.; Ab Mutalib, N.-S.; Chan, K.-G.; Lee, L.-H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front. Microbiol.* **2015**, *5* (1), 770.
- (331) Qiu, T.; Wang, Y.; Yu, J.; Liu, S.; Wang, H.; Guo, Y.; Huang, J.; Wen, C. Y.; Hu, J.; Zhang, Z. L.; et al. Label-free, homogeneous, and ultrasensitive detection of pathogenic bacteria based on target-triggered isothermally exponential amplification. *RSC Adv.* **2016**, *6* (66), 62031–62037.
- (332) Moll, N.; Pascal, E.; Dinh, D. H.; Pillot, J.-P.; Bennetau, B.; Rebière, D.; Moynet, D.; Mas, Y.; Mossalayi, D.; Pistré, J.; et al. A Love wave immunosensor for whole E. coli bacteria detection using an innovative two-step immobilisation approach. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (9), 2145–2150.
- (333) Kaspar, M.; Stadler, H.; Weiss, T.; Ziegler, C. Thickness shear mode resonators (“mass-sensitive devices”) in bioanalysis. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **2000**, *366* (6–7), 602–610.
- (334) Werner, H.; Gronholz, J. Understanding FT-IR Data Processing. Part 2: Details of the Spectrum Calculation. *Comput. Appl. Lab.* **1984**, *2*, 221–227.
- (335) Frutos, A. G.; Brockman, J. M.; Corn, R. M. Reversible protection and reactive patterning of amine- and hydroxyl-terminated self-assembled monolayers on gold surfaces for the fabrication of biopolymer arrays. *Langmuir* **2000**, *16* (5), 2192–2197.

Résumé :

Cette thèse porte sur l'élaboration d'un biocapteur, à bas coût, pour la détection de pathogènes dans les secteurs de l'agroalimentaire et de l'environnement. Le modèle visé est la bactérie *Escherichia coli*, dont les souches pathogènes sont responsables, chaque année, de plusieurs crises sanitaires. L'utilisation de biocapteurs pour une détection rapide, sensible et sélective de pathogènes répond ainsi aux inquiétudes quant aux risques d'infection pour la population. Le capteur est constitué d'une fine membrane en arséniure de gallium (GaAs) vibrant sur des modes de cisaillement d'épaisseur générés par champ électrique latéral via ses propriétés piézoélectriques. Nous montrons dans ce travail que le GaAs offre des possibilités de microfabrication, de biofonctionnalisation et de régénération intéressantes pour la conception d'un dispositif à bas coût. Nous avons mis en parallèle deux méthodes d'usinage de membranes minces : par voie chimique et par plasma, avec pour objectif, l'obtention de structures planes et lisse. Nous nous sommes intéressés à la réalisation d'une interface de biorecognition. La caractérisation de celle-ci, par les techniques de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, nous a fait progresser sur la compréhension du phénomène d'auto-assemblage de molécules sur GaAs et nous a permis de développer des interfaces à haute densité. Nous avons étudié sa régénération et la photo-oxydation par UV a démontré un fort potentiel pour des applications de capteurs réutilisables. Enfin à travers des caractérisations électriques du transducteur, nous avons mis en avant l'impact de différents paramètres de l'environnement sur la réponse du dispositif.

Mots-clés :

Biocapteurs, Ondes acoustiques de volume, Arséniure de gallium, Microfabrication, Biointerface, FTIR

Abstract :

This thesis addresses the development of a potentially low cost sensor dedicated for detection of pathogens in food industry processing and environment sectors. Such a sensor could serve detection of *Escherichia coli* bacteria whose pathogenic strains are the source of foodborne illnesses encountered worldwide every year. Hence, biosensor devices are needed for a rapid, sensitive and selective detection of pathogens to prevent outbreak risks. The design of the sensor consists of a resonant membrane fabricated in gallium arsenide (GaAs) crystal that operates at shear modes of bulk acoustic waves generated by lateral field excitation. In addition to its piezoelectric properties, as shown in this work, fabrication of a GaAs-based biosensor benefits from a well-developed technology of microfabrication and biofunctionalization and the possibility of regeneration that should result in cost savings of used devices. The transducer was fabricated by using typical clean room fabrication techniques. Plasma and wet etching were investigated and compared for achieving thin membranes with high quality surface morphology. Extensive research was carried out by Fourier transform infrared spectroscopy to determine optimum conditions for biofunctionalization of the GaAs surface. This activity allowed to advance the fundamental knowledge of self-assembly formation and, consequently, fabrication of high density biointerfaces. Among different biochip regeneration methods, it has been demonstrated that liquid UV photooxidation has a great potential for re-usable devices. Finally, operation of the transducer device was evaluated in various medium, simulating real conditions for detection.

Keywords :

Biosensors, Bulk acoustic waves, Gallium arsenide, Microfabrication, Biointerface, FTIR

The logo for the SPIM (École doctorale SPIM) features a stylized white 'S' on a green horizontal bar, followed by the letters 'PIM' in a large, white, sans-serif font.

■ École doctorale SPIM 1 rue Claude Goudimel F - 25030 Besançon cedex

■ tél. +33 (0)3 81 66 66 02 ■ ed-spim@univ-fcomte.fr ■ www.ed-spim.univ-fcomte.fr

The logo for the University of Franche-Comté (UFC) features a stylized 'U' and 'FC' in black, with a vertical bar containing the letters 'UFC' in white. Below the logo, the text 'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ' is written in a smaller, black, sans-serif font.