



HAL
open science

Fonctionnalisation de guides d'onde chalcogénures pour la détection de spores phytopathogènes

Bruno Robert

► **To cite this version:**

Bruno Robert. Fonctionnalisation de guides d'onde chalcogénures pour la détection de spores phytopathogènes. Matériaux. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONT089 . tel-03765656

HAL Id: tel-03765656

<https://theses.hal.science/tel-03765656v1>

Submitted on 31 Aug 2022

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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie et Physico-Chimie des Matériaux

École doctorale Science Chimique Balard

Unité de recherche UMR 5253 – Institut Charles Gerhardt de Montpellier

Fonctionnalisation de guides d'onde chalcogénures
pour la détection de spores phytopathogènes

Présentée par Bruno ROBERT

Le 22 novembre 2021

Sous la direction de Caroline VIGREUX et Csilla GERGELY

Devant le jury composé de

Jocelyne BRENDLE	Professeur	ENSCMu	Rapporteuse
Frédéric LEROUGE	Maitre de Conférences	ENS Lyon	Rapporteur
Annie PRADEL	Directrice de Recherche	ICGM	Examinatrice
Lionel PRESMANES	Maitre de Conférences	CIRIMAT	Examineur
Caroline VIGREUX	Maitre de Conférences	ICGM	Directrice de thèse
Csilla GERGELY	Professeur	L2C	Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie et Physico-Chimie des Matériaux

École doctorale Science Chimique Balard

Unité de recherche UMR 5253 – Institut Charles Gerhardt de Montpellier

Fonctionnalisation de guides d'onde chalcogénures pour la détection de spores phytopathogènes

Présentée par Bruno ROBERT

Le 22 novembre 2021

Sous la direction de Caroline VIGREUX et Csilla GERGELY

Devant le jury composé de

Jocelyne BRENDLE	Professeur	ENSCMu	Rapporteuse
Frédéric LEROUGE	Maitre de Conférences	ENS Lyon	Rapporteur
Annie PRADEL	Directrice de Recherche	ICGM	Examinatrice
Lionel PRESMANES	Maitre de Conférences	CIRIMAT	Examineur
Caroline VIGREUX	Maitre de Conférences	ICGM	Directrice de thèse
Csilla GERGELY	Professeur	L2C	Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Résumé

Les maladies fongiques des plantes sont causées par des champignons dont la présence sur les exploitations agricoles nécessite des traitements fongicides préventifs. En effet, ces parasites se propagent rapidement, et les signes visibles sur les exploitations - comme la présence de tâches sur les feuilles - n'apparaissent que plusieurs jours après l'infection. La réduction de l'utilisation de ces produits phytosanitaires passe donc par une détection plus précoce des maladies. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse, dont l'objectif est d'étudier la faisabilité de micro-capteurs optiques pour détecter les spores des champignons phytopathogènes. Les spores sont en effet responsables de l'infection primaire et de la propagation des maladies, et constituent donc naturellement la cible privilégiée.

Les briques de base des micro-capteurs optiques envisagés sont des guides d'onde rubans de structure RIB à base de couches minces chalcogénures Ge-Se-Te. Le principe de détection repose sur l'interaction entre les spores immobilisées sur les guides et l'onde évanescente qui se propage à leur surface. Cette interaction est en effet susceptible de modifier la transmission du signal infrarouge à travers les guides, notamment via des phénomènes d'absorption ou de diffusion. La difficulté de cette stratégie réside dans la sélectivité de la mesure. Quelle chimie de surface peut permettre l'immobilisation sélective des spores d'un champignon à risque ? Comment distinguer les spores d'un pathogène du reste de l'aérosol ?

Pour répondre à la première question, la fonctionnalisation des couches Ge-Se-Te a été étudiée. Deux familles de précurseurs ont été identifiées : (i) les peptides, qui s'accrochent aux chalcogénures via de multiples interactions faibles, et (ii) les organosilanes, qui s'accrochent de façon covalente, vraisemblablement via la formation de groupements Te-O-Si. D'après la littérature, les spores des maladies fongiques s'immobilisent préférentiellement sur les surfaces hydrophobes : nous avons donc ensuite modifié le caractère hydrophile-hydrophobe des couches minces Ge-Se-Te via les précurseurs organosilanes. Les tests d'immobilisation ont, comme attendu, démontré une plus forte affinité des spores pour les couches rendues plus hydrophobes. Nous avons alors élaboré deux protocoles permettant de rendre les guides d'onde plus hydrophobes d'une part, et les zones situées entre deux guides d'onde voisins plus hydrophiles d'autre part. Les tests d'immobilisation des spores ont montré

que ces deux protocoles permettaient bien d'augmenter le taux de spores immobilisées sur les guides d'onde.

Pour répondre à la deuxième question, nous nous sommes ensuite intéressés à l'analyse spectrale des spores de *Magnaporthe oryzae* (responsable de la pyriculariose du riz). En espace libre, l'étude dans la gamme du proche infrarouge (1-2,5 μm) a mis en évidence un phénomène de diffusion de Mie très important. Il sera donc difficile d'obtenir des capteurs sélectifs à partir de l'exploitation de ces seuls spectres de diffusion. Le domaine de moyen-infrarouge (2,5-15 μm) s'est avéré plus intéressant, révélant de nombreuses absorptions spécifiques.

Nous avons conclu ce travail par l'étude de la réponse optique des guides d'onde vis-à-vis du dépôt de spores de *Magnaporthe oryzae* sur leur surface, dans la gamme de longueurs d'onde 1-2,5 μm . Il a été démontré que le dépôt de ces spores perturbait le spectre en transmission. Cette perturbation de faible intensité - expliquant 0,015 % des variations observées - a été mise en évidence grâce à une analyse en composantes principales. Ce résultat est certes encourageant, mais il sera nécessaire d'augmenter la sensibilité des micro-capteurs : en optimisant le caractère hydrophile/hydrophobe de leur surface, leur géométrie, et en stabilisant l'injection de la lumière en face d'entrée. L'utilisation du moyen infrarouge permettra ensuite d'aller vers des micro-capteurs sélectifs.

Abstract

The spreading of phytosanitary inputs in fields comprises a significant part of preventive treatment. Indeed, the symptomatic dead spot on plant leaves only appears one or two weeks after primary infection. In order to reduce unnecessary use of hazardous chemistry, efforts for early detection of plant diseases are demanded. Scientific research can challenge the design of fungi spores micro-sensors, detecting the apparition of phytopathogens and monitoring the epidemic development of the disease. The sensor we propose is constructed of Ge-Se-Te chalcogenide RIB waveguide: the analytes falling on the detector surface interact with the evanescent field of the propagating light, and therefore alter it. The main difficulty of such a detection strategy is to provide selectivity. How could we immobilize pathogenic spores on the chalcogenide waveguides? How to detect spores among all particles from aerosol?

To provide selectivity to the sensing system, we aimed to functionalize the Ge-Se-Te waveguides with a new surface chemistry providing high affinity towards fungi spores. We identified two routes of functionalization: with peptides and with organosilane precursors. Peptides bond the surface thanks to several weak interactions, while organosilane bind the Ge-Te-Se by forming a Te-O-Si covalent group. We demonstrated specific capture of the analyte thank to the biotin-streptavidin complex.

The literature search indicates, the wettability as a key parameter for spores immobilization on artificial surfaces. Hydrophobic spores rather immobilize onto hydrophobic surfaces, such as plants leaves. Therefore, in a mimetic approach we used the silanization route to modify the surfaces, with two new precursors. Tetraethoxysilane provide hydrophilic behavior to the chalcogenide, whereas Octyl-trimethoxysilane provides hydrophobic behavior to the chalcogenide. We were able to demonstrate a higher rate of spores immobilization on the hydrophobic chalcogenide, as expected.

To go further and increase sensitivity, we also propose a new strategy for selective functionalization of the waveguide surfaces. Indeed, not all of the spores are immobilized inside the evanescent field. We achieved a selective functionalization of the sensor components, between active and non-active areas. We have rendered more hydrophobic the waveguides than the surrounding non active area. The spores test immobilization

demonstrates higher concentration near the waveguide, where the evanescent field is located, suggesting higher sensitivity.

We conclude our study by the optical investigation of spores of *Magnaporthe oryzae*, also known as the rice blast fungus. The difficulty is that in free space, such micrometric fungi cells cause intense scattering in the near-infrared region (1-2.5 μm). This phenomenon, well explained by the Mie theory, could hinder the spore detection. Nevertheless, we still could demonstrate the spores detection with the chalcogenide waveguide and the optical set-up build for the near-infrared region (1-2.5 μm), although, the optical signature of spores is not yet optimized. We further propose to work in the mid-infrared spectrum region (2.5-15 μm), where numerous specific absorption events occur. Detection with such wavelengths should provide information enough for bio-particles identification.

Table des matières

<i>Introduction Générale</i>	1
<i>CHAPITRE A - Bibliographie & Positionnement du travail de thèse</i>	5
A.I. La détection des maladies fongiques.....	7
A.I.1. Les maladies fongiques.....	7
A.I.2. Les moyens actuels de détection des maladies fongiques.....	11
A.I.2.a. Imageries et Spectroscopies.....	13
A.I.2.b. Détection de composés organiques volatils.....	15
A.I.2.c. Identification de l'aérosol biologique.....	17
A.II. Les guides d'onde infrarouges pour la détection.....	25
A.II.1. Le domaine infrarouge.....	25
A.II.2. Les guides d'onde infrarouges.....	25
A.II.3. Les guides d'onde pour la détection.....	28
A.II.3.a. La transduction.....	29
A.II.3.b. La fonctionnalisation des guides d'onde.....	33
A.III. La fonctionnalisation des chalcogénures.....	36
A.III.1. Généralités.....	36
A.III.2. Etat de l'art sur la fonctionnalisation des chalcogénures.....	37
A.III.2.a. Greffage covalent des surfaces chalcogénures.....	38
A.III.2.b. Dépôt de couche mince.....	39
A.III.2.c. Fonctionnalisation des matériaux riches en sélénium.....	40
A.III.3. La silanisation.....	41
A.III.3.a. Généralités.....	41
A.III.3.b. Mécanisme d'interaction.....	42
A.III.3.c. La silanisation des Ge-Se-Te.....	43
A.III.4. La voie peptidique.....	44
A.III.4.a. Introduction.....	44
A.III.4.b. Mécanisme d'interaction.....	46
A.III.4.c. Les peptides LLA & SVS.....	47
A.IV. Positionnement du projet et objectifs de la thèse.....	47
<i>CHAPITRE B - Fonctionnalisation des couches minces du ternaire Ge-Se-Te</i>	51
B.I. Fonctionnalisation des couches Ge-Se-Te : Capture de la Streptavidine.....	53
B.I.1. Introduction.....	53
B.I.2. Protocoles de fonctionnalisation.....	55
B.I.3. Suivi par analyse des images AFM.....	56
B.I.3.a. AFM et paramètres de mesure.....	56

B.I.3.b. Topographies, rugosités et tailles des particules.....	57
B.I.4. Suivi par analyse de l'angle de contact.....	64
B.I.4.a. Mesure de l'angle de contact.....	64
B.I.4.b. Résultats	65
B.I.4.c. Pour aller plus loin : mécanisme d'interaction des peptides.....	66
B.I.5. Suivi par analyse de spectres FT-IR.....	68
B.I.5.a. Spectroscopie FT-IR	68
B.I.5.b. Comparaison des spectres.....	68
B.I.5.c. Analyse de la bande Amide-1.....	70
B.I.6. Bilan	73
B.II. Silanisation des couches Ge-Se-Te : modification de la mouillabilité.....	74
B.II.1. Protocoles & méthodes	74
B.II.2. Angle de contact	76
B.II.3. Caractérisation AFM	77
B.III. Pour aller plus loin : étude XPS	79
B.III.1. XPS.....	79
B.III.2. Des organosilanes à la surface des couches Ge-Se-Te ?.....	80
B.III.3. Analyse des liaisons formées.....	84
B.IV. Conclusion	90
<i>CHAPITRE C - Fonctionnalisation sélective des guides d'onde</i>	<i>91</i>
C.I. Protocole de fabrication des guides d'onde	94
C.II. Vers une fonctionnalisation sélective	96
C.II.1. Fonctionnalisation entre les guides d'onde	97
C.II.1.a. Protocole.....	97
C.II.1.b. Caractérisation	99
C.II.2. Fonctionnalisation des guides d'onde	109
C.II.3.a. Protocole.....	110
C.II.3.b. Caractérisation	112
C.III. Conclusion.....	115
<i>CHAPITRE D - Vers la détection des spores</i>	<i>117</i>
D.I. Immobilisation des spores sur les surfaces chalcogénures Ge-Se-Te	119
D.I.1. Protocole.....	120
D.I.2. Pulvérisation des spores sur les couches minces Ge-Se-Te.....	122
D.I.3. Pulvérisation des spores sur les guides d'onde fonctionnalisés sélectivement	123
D.I.4. Pulvérisation des spores sur des guides intégralement fonctionnalisés.....	128
D.I.5. Bilan	131
D.II. Vers la détection optique des spores.....	132
D.II.1. Spectres d'absorption des spores dans l'infrarouge	133
D.II.1.a. Gamme de longueurs d'onde 1 – 2,5 µm.....	133

D.II.1.b. Gamme de longueurs d'onde 2,5 – 15 μm	138
D.II.1.c. Bilan	139
D.II.2. Détection des spores avec nos guides d'onde	139
D.II.2.a. Banc de mesure utilisé	140
D.II.2.b. Protocole de dépôt des spores sur les guides d'onde	141
D.II.2.c. Réponse des guides d'onde vis-à-vis du dépôt des spores	141
B.II.3. Bilan.....	146
D.III. Conclusion	148
<i>Conclusion générale & Perspectives</i>	<i>151</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>157</i>
<i>Liste des tables</i>	<i>163</i>
<i>Bibliographie</i>	<i>165</i>
<i>Annexes.....</i>	<i>187</i>

Introduction Générale

Les produits phytosanitaires sont des produits chimiques destinés à protéger les espèces végétales cultivées, et assurer le rendement de la production agricole. Les cultures sont effectivement soumises à de nombreux stress biotiques : champignons, insectes, bactéries, nématodes, etc, qui nécessitent l'utilisation de fongicides, insecticides, bactéricides, nématicides... Mais le traitement des cultures par ces produits phytosanitaires s'accompagne d'impacts préjudiciables à la fois sur l'environnement (l'eau, l'air, le sol, la faune, la flore) et sur l'homme (lors de l'épandage et par le biais de l'alimentation). La réduction de ces impacts fait partie des préoccupations sociétales majeures, et s'inscrit dans le développement durable de nos sociétés. L'une des stratégies privilégiées permettant la réduction de ces impacts est une détection plus précoce des pathogènes. En effet, les parasites, une fois installés sur site, se propagent rapidement au grès du vent et des intempéries, garantissant le développement épidémique de la maladie. Mais malheureusement, les signes visibles sur les exploitations, comme la présence de tâches symptomatiques sur les feuilles, n'apparaissent que plusieurs jours voire plusieurs semaines suivant l'infection. Afin d'assurer le rendement de leur production, les agriculteurs préfèrent alors pulvériser les traitements sans attendre l'apparition des signes symptomatiques de la maladie. Une détection plus précoce des pathogènes permettrait d'éviter les traitements préventifs systématiques et de répandre au bon moment, au bon endroit.

Aujourd'hui, des outils d'aide à la décision évaluent la potentialité de la présence des pathogènes, grâce à des modèles mathématiques et des prévisions météorologiques. Cependant, ces outils sont loin d'être suffisants. Pour détecter localement les maladies des plantes le plus tôt possible, il convient de s'intéresser à la détection des spores des champignons phytopathogènes. Les spores sont des capsules micrométriques responsables de la reproduction et de la dissémination des champignons, à l'instar des graines pour les plantes. Dû à leur grande dispersion dans l'espace, elles sont responsables de la propagation des maladies. Détecter les spores, c'est détecter l'arrivée des pathogènes : c'est donc la méthode la plus précoce de détection des maladies des plantes. En épidémiologie végétale, les capteurs aériens visant à comptabiliser la présence des champignons phytopathogènes,

couplés à des techniques qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) ou plus récemment LAMP PCR (Loop mediated isothermal amplification), rendent possible la quantification de la sporée aérienne. Mais ces méthodes présentent quelques limitations pour l'identification des risques épidémiques précoces, car en général elles ne visent qu'un pathogène à la fois et/ou demandent une étape d'identification dans des laboratoires spécialisés, impliquant un délai d'analyse de quelques jours incompatible avec la gestion d'une épidémie. De nouveaux outils sont donc nécessaires et c'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse. Il a pour objectif de montrer la faisabilité de micro-capteurs optiques pour la détection des spores. Le diagnostic des stress biotiques et abiotiques des plantes par méthodes optiques n'est pas nouveau. L'intérêt de ces méthodes réside dans le caractère non invasif de la lumière, mais aussi dans leur capacité à fournir des analyses en temps réel. Dans le cadre de ce travail, les micro-capteurs optiques envisagés sont des guides d'onde à base de couches minces chalcogénures du système ternaire Ge-Se-Te. Le choix de ces matériaux est justifié par leur domaine de transparence qui s'étend de 1 à 16 μm environ. Ce domaine spectral est particulièrement attractif puisqu'il inclut les longueurs d'onde des télécommunications, mais également le moyen infrarouge où se situent les bandes d'absorption de nombreuses molécules.

Les guides d'onde étudiés dans ce travail sont des guides d'onde rectilignes de structure RIB. Ils sont composés d'un substrat en silicium, d'une couche tampon de composition $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{65}\text{Te}_{10}$ et d'une couche de cœur $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$ d'indice de réfraction plus élevé. La couche de cœur est gravée partiellement, assurant un confinement bidimensionnel de la lumière. Le principe de détection est quant à lui basé sur l'interaction entre les spores immobilisées sur les guides d'onde, et l'onde évanescente qui se propage à leur surface. Les modes guidés s'accompagnent en effet d'ondes planes de surface dont l'intensité « s'évanouit » exponentiellement perpendiculairement aux deux interfaces qui entourent la couche de cœur. Ces ondes, dites évanescentes, sont susceptibles d'interagir avec les analytes présents sur la surface des guides. La présence de spores fongiques sur les guides peut donc provoquer de l'absorption, de la diffusion, et plus globalement perturber les conditions de propagation de la lumière guidée.

La difficulté de cette stratégie de détection réside dans la sensibilité des micro-capteurs et surtout dans la sélectivité de la mesure. Différentes questions sont effet sous-jacentes. Les

micro-capteurs seront-ils à même de détecter une faible quantité de spores ? Comment seront-ils capables de distinguer les spores de différentes souches de champignons ? Plus généralement, comment identifier les spores d'un champignon phytopathogène réellement préoccupant parmi tout l'aérosol (pollens, bactéries, poussières inorganiques) ? Différents leviers ont été envisagés pour répondre à ces questions et essayer d'apporter de la sensibilité et de la sélectivité. La fonctionnalisation de la couche de cœur a été étudiée en vue d'une captation sélective des spores et la modification du caractère hydrophile/hydrophobe de la couche de cœur a été envisagée pour améliorer le taux d'immobilisation des spores sur les guides d'onde. Enfin, la spectroscopie infrarouge couplée à de l'analyse multivariée a été envisagée pour gagner en sélectivité de la mesure. Spores, pollens et poussières inorganiques ne sont pas faits de la même chimie et absorbent à différentes fréquences. Une discrimination spectrale est donc a priori possible.

Les principaux résultats obtenus sont présentés dans ce manuscrit. Le chapitre A est entièrement bibliographique et se divise en trois axes : (i) la détection des maladies fongiques, (ii) les guides d'ondes infrarouges pour la détection et enfin (iii) la fonctionnalisation des matériaux en général et des chalcogénures en particulier. Le chapitre B est consacré à la fonctionnalisation des couches minces de composition $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$. Il s'agit de valider deux voies de fonctionnalisation différentes : la voie peptidique d'une part et la silanisation d'autre part. La bibliographie ayant mis en évidence que les spores s'accrochent préférentiellement sur les surfaces hydrophobes, la silanisation a ensuite été étudiée pour modifier le caractère hydrophile/hydrophobe des couches. Le chapitre C porte quant à lui sur la fonctionnalisation sélective des composants constitués de plusieurs séries de guides d'onde. Il s'agit de rendre les guides d'onde plus hydrophobes, ou alors les zones situées entre les guides plus hydrophiles, de sorte à augmenter le taux d'immobilisation des spores sur les guides d'onde. Enfin, le chapitre D est dédié à la détection des spores du champignon responsable de la Pyriculariose du riz : *Magnaporthe oryzae*. Une première section est consacrée à l'immobilisation de ces spores sur les couches fonctionnalisées. La seconde section est dédiée à l'étude des réponses des guides d'onde vis-à-vis du dépôt de spores sur leur surface.

CHAPITRE A

-

Bibliographie & Positionnement du travail de thèse

A.I. La détection des maladies fongiques

Les maladies fongiques sont causées par des champignons ou pseudo-champignons dont la présence sur des exploitations agricoles nécessite des traitements fongicides préventifs. En effet, ces parasites, une fois installés sur site, se propagent rapidement au grès du vent et des intempéries. Malheureusement, les signes visibles sur les exploitations, comme la présence de tâches symptomatiques sur les feuilles, n'apparaissent souvent que la semaine suivant l'infection. La réduction de l'utilisation de ces produits phytosanitaires passe donc par une détection précoce des phytopathogènes.

Dans ce paragraphe, nous allons tout d'abord introduire la notion de maladies fongiques et donner le cycle de ces maladies, avant de nous intéresser aux méthodes existantes pour les détecter.

A.I.1. Les maladies fongiques

Les maladies fongiques sont nombreuses. Parmi les plus courantes, on peut citer le mildiou, l'oïdium, la pyriculariose, la fusariose, la pourriture grise (appelée aussi Botrytis), la rouille, etc [Dean2012]. Toutes les maladies fongiques sont caractérisées par des symptômes différents et assez caractéristiques. Par exemple le mildiou [Lebeda1994], qui s'attaque à la vigne, mais également aux tomates, aux oignons, aux pommes de terre, etc., se caractérise par l'apparition de taches brunes et d'auréoles jaunâtres sur la face supérieure des feuilles.

Les maladies « fongiques » sont causées par certaines espèces du règne « Fungi », aussi appelées « mycètes » et plus communément dénommées champignons. Les levures utilisées en fermentation et les champignons à chapeaux comestibles font également partie de ce règne. En toute rigueur, certaines maladies fongiques sont causées par des oomycètes, longtemps classées au sein des Fungi, et qualifiées aujourd'hui de « pseudo-champignons ».

Parmi les Fungi phytopathogènes, les ascomycètes sont les plus représentés (Magnaporthe, Botrytis, Fusarium, Blumeria, ...). Ils sont responsables des maladies fongiques telles que l'antracnose, la pourriture grise, la fusariose, l'oïdium, la pyriculariose ou encore la septoriose. Parmi les Fungi phytopathogènes se trouvent également quelques basidiomycètes (Puccinia, Melampsora, Ustilago, ...) dont font partie certains champignons à chapeau : ils

sont à l'origine des maladies telles que les rouilles et les charbons. Enfin, les genres *Plasmopara* et *Phytophthora*, responsables des mildious de vigne, de la tomate ou encore de la pomme de terre font partie de la classe des oomycètes.

Il existe donc une grande variété de champignons phytopathogènes, dont la nomenclature est très complexe. C'est pourquoi nous utiliserons par la suite des termes assez génériques pour faciliter la lecture et la compréhension. En revanche, il est nécessaire d'explicitier brièvement le processus d'infection d'une plante par un champignon phytopathogène.

L'infection d'une plante par un champignon phytopathogène commence par l'infection primaire depuis les structures d'hibernation du pathogène (sclérotés, ascospores, oospores). Ce cycle d'hibernation permet également une reproduction sexuée du champignon. Au printemps, dès que les conditions de température et d'humidité le permettent, le pathogène « se réveille » et réalise cette infection primaire. Ensuite se répète un cycle d'infection secondaire, asexué, appelé cycle de la maladie. Ce processus diverge selon les pathogènes, mais les grandes lignes sont exposées ci-dessous et résumées sur la Figure A.1.

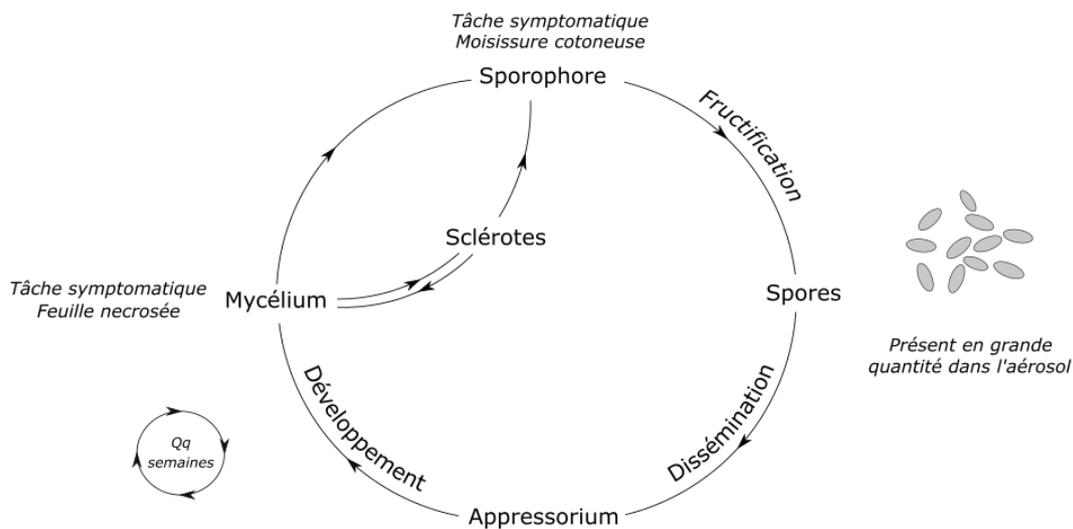


Figure A.1. Cycle de vie du phytopathogène.

La forme végétative du champignon est appelée mycélium. Celui-ci est constitué d'un réseau filamenteux d'hyphes de quelques micromètres de diamètre qui se développent à l'intérieur de l'organisme hôte. Le pathogène détourne le métabolisme de la plante à ses fins (parasite biotrophe) ou en provoque la nécrose pour s'alimenter (parasite nécrotrophe).

La réponse immunitaire de la plante s'élabore avec l'activation de la transduction de signal, la production de métabolites secondaires, de mycotoxines, d'un renforcement des membranes cellulaires ou encore de l'activation de la réponse hypersensible. Les premiers stades de la réponse immunitaire se traduisent par la production et l'émission de composés organiques volatils (COVs) symptomatiques (dont certaines structures sont données dans la Figure A.2), ou par une variation subtile dans la composition chimique de la feuille.

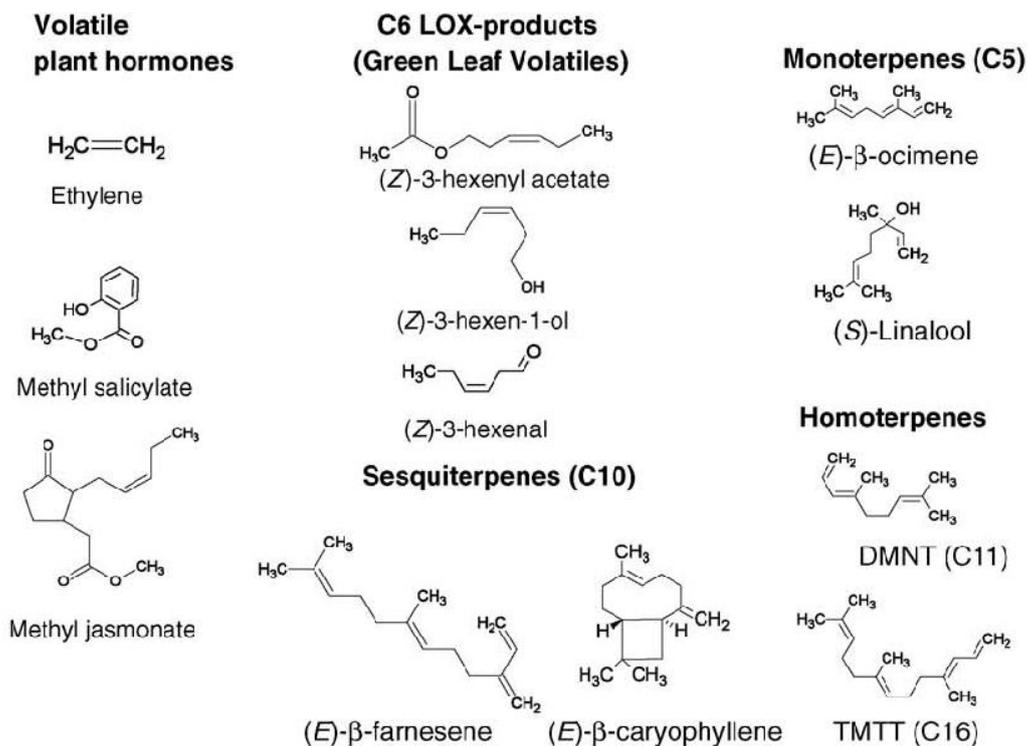


Figure A.2. Structures chimiques de quelques COVs émis par les plantes sous stress biotique ou non biotique [Holopainen2010].

Pour se propager à travers l'espace et infecter d'autres feuilles ou plantes, des hyphes aériennes, appelées sporophores, apparaissent à la surface des feuilles. Ces structures à ramifications arborescentes portent les spores, fruits de la reproduction asexuée. Ces sporophores ainsi que leurs spores, très nombreuses, sont visibles à l'œil nu sous forme de moisissure cotonneuse ou de pustules. C'est de l'aspect de ces moisissures que sont souvent tirés les noms communs des maladies (pourriture grise, pourriture blanche, charbons...). Les surfaces nécrosées et recouvertes de spores apparaissent plusieurs jours après l'infection.

Elles constituent les tâches symptomatiques, comme on peut en voir à titre d'exemple sur la Figure A.3.



Figure A.3. Photographie de feuilles de riz atteintes de la Pyriculariose, maladie provoquée par le champignon phytopathogène appelé Magnaporthe oryzae [Groth].

Les spores libérées permettent au matériel génétique de voyager dans l'espace. Pour la plupart, ces spores ne sont pas pourvues de motilité et sont détachées et disséminées au grès de la pluie et du vent. La nature a donc privilégié la quantité à la qualité, et ce sont des millions de spores qui se retrouveront opportunément sur la surface d'une autre feuille [Money2016]. Ces capsules d'une dizaine de micromètres, illustrées sur la Figure A.4, permettent alors au champignon d'infecter la feuille voisine, mais aussi de parcourir plusieurs kilomètres, à l'image du pollen [Money2016].

Lorsque qu'une spore est ensuite déposée à la surface d'une feuille, elle s'adhère via la libération d'un mucilage et d'une matrice extracellulaire. Ces mécanismes d'adhésion sont en partie non-spécifiques et sont amorcés par la présence d'eau libre. Cette adhésion empêche un décrochage provoqué par la pluie ou le vent. Fixée sur la cuticule de la feuille, la spore germe : un tube germinatif croît, formant ainsi le premier hyphe, puis l'appressarium. Cette structure en dôme exerce une pression osmotique de turgescence perforant la cuticule de la feuille. La matrice extracellulaire fixe l'ensemble de la structure, et équilibre ainsi les forces mécaniques. Une fois l'hyphe à l'intérieur de l'organisme hôte, le mycélium peut se développer aux dépens de l'hôte.

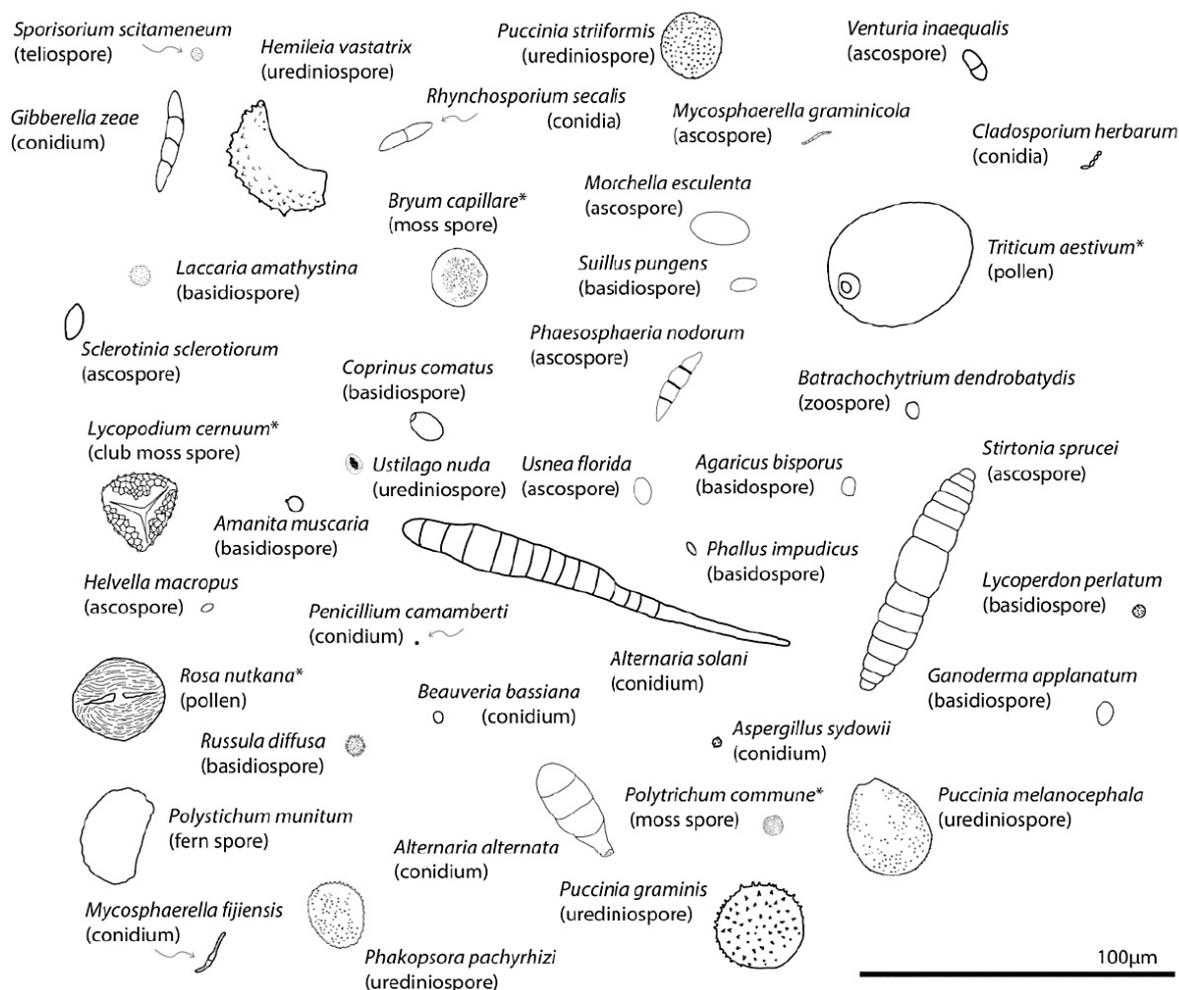


Figure A.4. Représentation schématique de différentes spores fongiques et autres bio-particules communément présentes dans l'aérosol. A titre indicatif, les genres nommés *Alternata*, *Aspergillus* et *Puccinia* sont responsables de maladies fongiques : alternarioses, rouilles et moisissures, respectivement [Golan2017].

A.1.2. Les moyens actuels de détection des maladies fongiques

Aujourd'hui, les exploitants agricoles ont à leur disposition quelques techniques de diagnostic, mais peu de technologies sont pour l'instant capables d'une détection précoce ou automatisée sur site. Il existe néanmoins des outils d'aide à la décision, qui à partir des données météorologiques et épidémiologiques, jugent l'apparition de pathogène probable ou non. D'autres techniques, d'échantillonnage et d'analyses sérologiques (ELISA) ou génétiques (PCR), permettent de capter et d'identifier un pathogène sans ambiguïté. Mais ces analyses restent cantonnées au laboratoire, et réservées à des personnels qualifiés.

La recherche s'intéresse donc à de nouveaux outils de détection pour le management des produits phytosanitaires. De nombreux travaux récents s'articulent autour des méthodes optiques [Khaled2018][Zhang2019][Ali2019] : imageries RGB, multispectrale, hyperspectrale, fluorescente, thermique et spectroscopies visible, infrarouge et de fluorescence. Ces analyses d'imagerie et spectroscopiques sont effectuées directement sur site, éventuellement par l'utilisateur, et apportent une réponse rapide. Certaines des techniques d'imagerie offrent notamment une cartographie de la propagation de la maladie sur l'ensemble de l'exploitation [Mahlein2016]. Le tableau A.1 résume les différentes méthodes utilisées pour détecter les maladies fongiques sur site. En particulier il donne pour chacune des technologies, l'objet sondé, la maturité de la méthode, ses avantages et ses limites.

Technologie	Objet sondé	Maturité	Performance	Limite
ELISA & PCR	Protéine & ADN	Mature	Robustesse	Portabilité
Imagerie & Spectroscopie	Surface de la feuille	Utilisé sur site & Recherche	Cartographie Portabilité	Traitement du signal
Détection de spore	Conidie	Recherche en laboratoire	Précocité	Sélectivité
Détection de gaz	Composé organique volatil	Recherche sur site	Versatilité	Sélectivité

Tableau A.1. Méthodes de détection de maladie sur site.

D'autres travaux démontrent les performances des nez électroniques [Falasconi2005] [Ghaffari2011] ou de la chromatographie en phase gazeuse [Huang2003][Jansen2011] : la présence de certains composés organiques volatils (COVs) est en effet significative de la présence de pathogènes ou de l'activation de la réponse immunitaire de la plante.

Enfin, une dernière approche consiste à détecter les pathogènes via leurs spores. Comme il l'a été spécifié dans le paragraphe précédent, les spores sont des cellules fongiques, que les phytopathogènes produisent et dispersent dans l'aérosol pour assurer leur dissémination. Détecter les spores est donc le moyen le plus efficace pour détecter les

maladies de façon la plus précoce possible. Les paragraphes suivants détaillent chacune de ces techniques utilisées à l'heure actuelle.

A.I.2.a. Imageries et Spectroscopies

Le développement du champignon et l'activation de la réponse immunitaire de la plante provoquent d'abord des modifications de la teneur en eau, de la composition chimique, de la couleur ou de la forme de la feuille. Après plusieurs jours, le pathogène et/ou la réponse hypersensible de la plante provoquent la nécrose de la feuille. La présence d'un phytopathogène perturbe ainsi les phénomènes de réflexion de la lumière visible-infrarouge sur le limbe foliaire. Les propriétés de diffusion et d'absorption de la feuille sont altérées par la présence de nouvelles microstructures fongiques (hyphes, spores...) ou du changement dans sa composition chimique (chlorophylle, carbohydrates, protéines, mycotoxines).

Les méthodes d'imagerie dans la gamme visible et proche infrarouge ouvrent de nouveaux horizons dans le phénotypage des plantes. Les plus simples peuvent être conduites avec les couleurs RGB et un smartphone, qui vont remplacer l'œil et l'expertise humaine. Mais imaginons un « œil » avec 250 couleurs, du visible à l'infrarouge, qui sillonne depuis un drone l'ensemble du champ : la quantité d'informations qui peut être obtenue est colossale et l'analyse des données permet d'extraire les renseignements très utiles pour l'épandage des intrants. En effet, on peut remonter à la distribution hétérogène du stress et en suivre l'occurrence, la nature et la sévérité. Il est par exemple possible de cartographier la présence du phytopathogène *Blumeria graminis* sur une exploitation de blé avec une caméra hyperspectrale embarquée sur un avion [Mewes2011]. Ces techniques offrent une dimension spatiale au diagnostic et permettent de pratiquer de l'agriculture de précision [Mahlein2016]. Toutefois, beaucoup de ces dispositifs d'imagerie ne permettent pas une détection précoce. Au stade de la recherche, la détection pré-symptomatique ne s'effectue souvent que sur un spot de 1mm² [Buerling2012]. Même si les techniques spectroscopiques infrarouges permettent de déceler la maladie quelques jours avant l'apparition de tâches symptomatiques manifestes [Khaled2018][Ali2019], les différences spectrales sont extrêmement subtiles et font l'objet d'une étude par analyse multivariée très approfondie. Aucune étude ne parvient à clairement expliquer la causalité entre la présence d'un pathogène, et les subtiles modifications spectrales constatées pendant le stade pré-symptomatique. Plusieurs études

montrent toutefois que l'absorption de l'eau vers 1450, 1900 et 2500 nm porte l'information utile [Liaghat2014][Delalieux2007], comme illustré sur la Figure A.5.

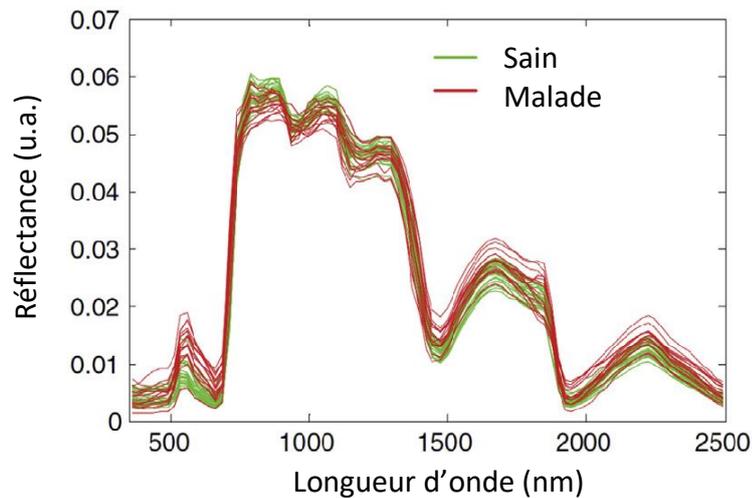


Figure A.5. Spectres de réflexion visible-proche-infrarouge de feuilles de citron saines (en vert), et infectées par la maladie du dragon jaune (en rouge). Les spectres sont marqués par l'absorption de l'eau (à 1,5 μm et 1,9 μm) mais les différences entre les spectres sont minimales [Farber219].

Les techniques de spectroscopie de fluorescence permettent une meilleure détection pré-symptomatique [Khaled2018][Zhang2019]. Les feuilles ont des propriétés d'auto-fluorescence (via notamment les chlorophylles), mais les techniques les plus performantes reposent sur la fluorescence induite par UV ou lumière bleue. Les émissions induites par UV sont la fluorescence Bleu-Vert (440-520 nm) et la fluorescence chlorophylle (650-800 nm). Plusieurs études ont notamment démontré que le ratio Fluorescence Bleue (451 nm) versus Fluorescence Verte (522), notée (FB/FG), permet une détection pré-symptomatique [Buerling2012][Belanger2008].

Non destructives et effectuées à distance, ces techniques font face à quelques difficultés. La quantité d'informations à traiter est souvent colossale, et nécessite l'utilisation de méthodes d'analyse de données multivariées robustes. Également très empiriques, ces méthodes n'établissent pas le lien entre infectiologie et spectroscopie. Pour être opérationnels, les dispositifs doivent préalablement apprendre à reconnaître les patterns « sains » et « malades ».

A.1.2.b. Détection de composés organiques volatils

En 1989, Williams et Pembroke constatèrent que des patients atteints de mélanome peuvent être diagnostiqués par des chiens, sensibles au subtil changement d'odeurs dégagées par le malade [Williams1989]. La volatolomique devient alors la science et l'étude des composés volatils et de leur capacité à traduire le métabolisme d'un système biologique.

De nombreux composés organiques volatils (COVs) sont constamment émis par la plante : terpénoïdes, phénylpropanoïdes, dérivés d'acide gras et d'acides aminés non aromatiques. Ces COVs participent à la communication inter-individus et inter-espèces, et le cas échéant à la défense des plantes contre l'agent pathogène. Les champignons eux-mêmes produisent des COVs, notamment l'octénol (plus précisément l'oct-1-èn-3-ol). La Figure A.6 illustre l'évolution de la concentration de certains composés organiques volatils émis par le maïs, après inoculation avec le champignon phytopathogène responsable de la maladie appelée fusariose : le *Fusarium graminearum*.

On peut voir que quelques jours après l'inoculation, de nombreux COVs voient leur concentration augmenter. Les stress biotiques et abiotiques induisent en effet des changements dans l'émission des COVs. La libération de lipoxydase est par exemple symptomatique de la dégradation de la membrane cellulaire [Wildt2003]. Certains terpènes stockés dans les trichomes sont libérés par la plante lors de l'infection et participent à la prévention inter-plantes [Jansen2009][Jansen2010]. Le méthyl salicylate révèle l'activation du système immunitaire de la plante et participe également à la communication inter-espèces [Shulaev1997]. De nombreux sesquiterpénoïdes sont également symptomatiques de l'infection fongique [Becker2014][Alberto2015]. On rapporte également fréquemment l'émission de (Z)-3-hexenol, (E)- β -ocimene, linalool, (E)- β -farnesene, (E)-4,8-diméthylnona-1,3,7-triene (DMNT), et de (E,E)-4,8,12-triméthyl-1,3,7,11-tridecatetraene (TMTT) [Jansen2011]. Cependant, aucune substance chimique n'a été exclusivement associée à une seule maladie fongique.

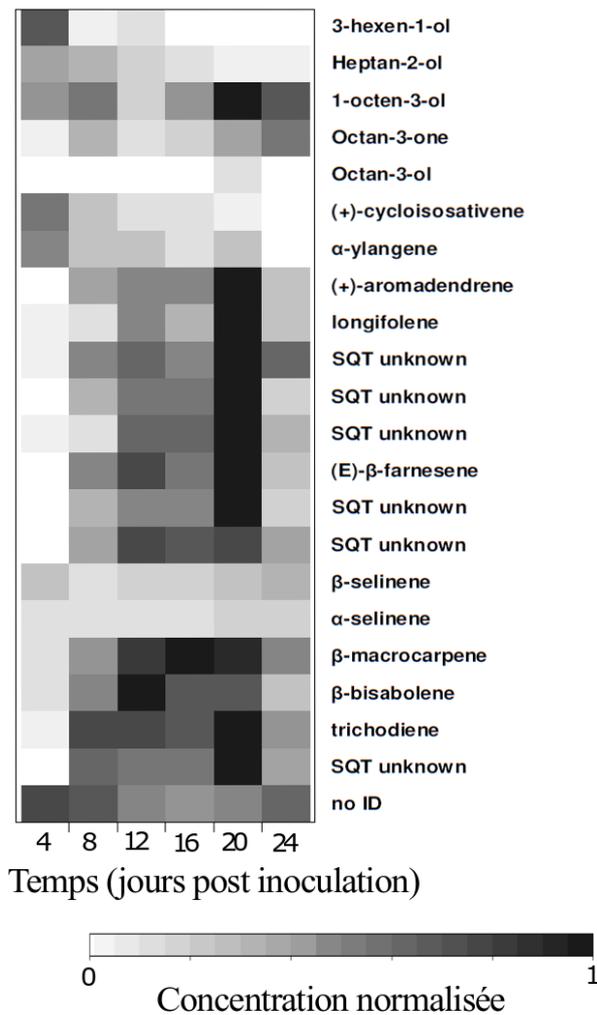


Figure A.6. Evolution de la concentration de COVs émis par le maïs, après inoculation avec le *Fusarium graminearum* (fusariose) [Becker2014].

La présence d’une maladie fongique (ou cryptogamique) peut donc être révélée par l’analyse des composés organiques volatils dans l’atmosphère environnante. En laboratoire, la spectrométrie de masse, la chromatographie et la RMN permettent d’identifier et de suivre l’émission de chaque terpénoïde en fonction du développement de la maladie [Becker2014]. Quant à la détection sur site, la recherche s’est inspirée du nez biologique [Kauer2009].

Il existe des outils de laboratoire miniaturisés [Zhang2011], mais sont surtout utilisés les nez électroniques portatifs [Jansen2011][Markom2009][Ray2017][CamardoLeggieri2020]. Sur site, ces capteurs de COVs ne sont pas capables de reconnaître une structure terpénoïque en particulier, mais un « recognition pattern » (RP) associé à un stress. Ces appareils sont constitués d’une série de capteurs de gaz et d’un système de traitement du signal. La partie

active des capteurs est constituée de couches d'oxydes métalliques ou de polymère dont la conductivité varie en fonction de la concentration de certains COVs [Arshak2004]. Les différentes couches ayant des sensibilités différentes pour les COVs, une série de capteurs finit par apporter une information suffisamment discriminante. Une unité de traitement de signal permet d'analyser l'évolution des réponses de tous les capteurs, et fournit une information lisible par l'utilisateur : mildiou, insecte ravageur, sain...

En agriculture, quelques capteurs de gaz se sont montrés capables d'identifier un stress fongique à partir des COVs émis par les plantes. L'Oïdium de la tomate (*Oidium neolycopersici*) est détecté en serre à partir de 6 jours grâce au Bloodhound ST214 TM [Ghaffari2011]; la maladie « pourridié rouge » (*Ganoderma boninense*) est identifiée directement sur site chez l'huile de palme grâce au Cyranose320 TM [Markom2009]. Enfin ces capteurs sont également capables de discriminer le stress fongique (*Oidium neolycopersici*) parmi d'autres stress (Bloodhound ST214 TM) [Laothawornkitkul2008].

Ces systèmes de détection manquent toutefois de robustesse. Si des applications en cultures sous serre paraissent envisageables, les cultures plein champ ne pourront que difficilement profiter de ces technologies. En effet, les concentrations sont extrêmement faibles et la plupart de ces COVs sont très répandus à l'échelle du vivant. A ce titre, l'étymologie même de terpènes renvoie aux arbustes résineux térébinthes, et finalement l'ensemble des conifères émettent de ces COVs en grande quantité.

A.I.2.c. Identification de l'aérosol biologique

Comme explicité précédemment, les spores sont des capsules d'une dizaine de micromètres qui permettent au matériel génétique de voyager à travers le temps et l'espace. Elles sont les vecteurs de l'infection primaire et de la dispersion de la maladie. Leur détection peut donc prévenir l'apparition et la dispersion du pathogène sur site.

Cette détection est couramment réalisée par prélèvement sur site, prélèvement suivi d'une analyse en laboratoire telle que le génotypage (PCR) ou phénotypage à l'aide d'un microscope. L'estimation de la concentration est réalisée par le comptage d'unités formant colonie (ou CFU, colony-forming unit) ou par simple comptage au microscope. Plus récemment, les phénomènes de fluorescences induites sont utilisés en imagerie [Tahir2017], en cytométrie en flux avec marqueurs [Liang2013][Vanhauteghem2017], ou en détection à

distance [Farsund2012]. Ces techniques permettent un comptage ou une identification des spores plus rapide et potentiellement automatisable, mais toutes ne paraissent pas adaptées à une détection sur site. Contrairement aux technologies optiques et aux nez électroniques, aucun dispositif de détection de spores phytopathogènes autonome et miniaturisé n'a encore été développé.

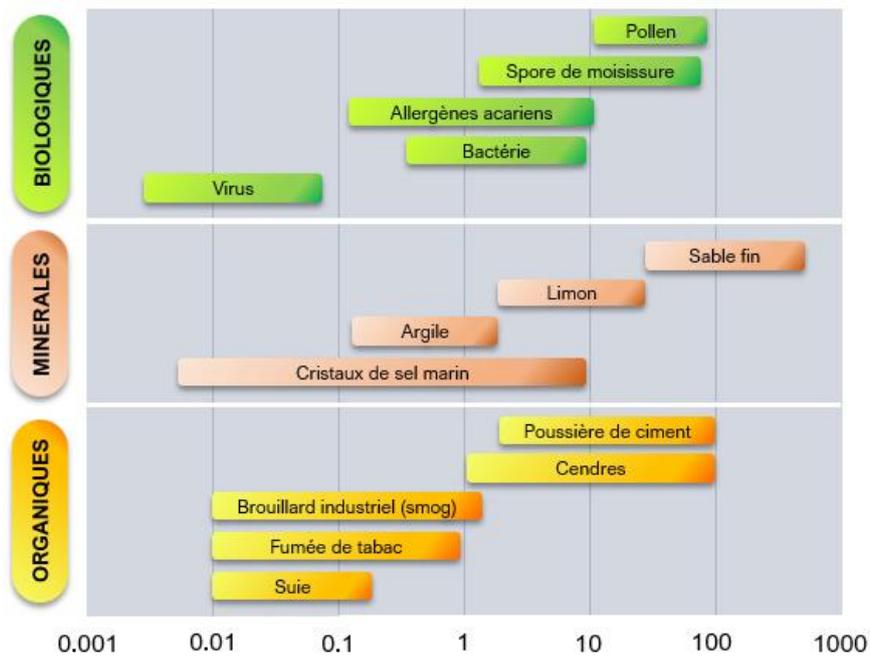


Figure A.7. Tailles en micromètre des particules communément présentes dans l'aérosol [Schnitzler2020].

Néanmoins, dans la littérature scientifique, quelques travaux de recherche s'intéressent au développement de ces dispositifs. Les procédés de stérilisation [Arreola2019] [Oberlander2018], la prévention en matière de guerres biologiques [Farsund2012] ou d'allergies [Li2018][Liang2013] motivent de nombreux travaux dans la détection des aérosols. Mais une difficulté se confirme : la sélectivité. Comment, par exemple, ne détecter que les spores de *Magnaporthe oryzae* près d'une rizière ? Détecter une microparticule, c'est tout à fait anodin. Mais détecter les spores dans l'ensemble de l'aérosol nécessite une sélection difficile à opérer. Une discrimination par la taille ou la morphologie est largement incomplète (Figure A.7). La discrimination entre spores fongiques, spores bactériennes et pollen est elle-même un sujet de recherche depuis de très nombreuses années [Mariey2001]. Dans cette

problématique, deux axes sont identifiés pour poursuivre notre étude : l'immobilisation sélective sur un substrat actif, et la spectroscopie infrarouge.

(i) Immobilisation des spores

Une récente étude propose d'utiliser les propriétés de fluorescence des quantum dots en carbone pour détecter le dépôt de spores d'*Aspergillus Niger* [Gaikwad2019]. D'autres proposent des électrodes interdigitées, dont la mesure de l'impédance renseigne sur la présence et viabilité de spores de bactéries déposées [Arreola2019]. Dès 2007, une équipe démontre la fonctionnalisation de cantilever en silicium avec les anticorps spécifiques polyclonaux d'*Aspergillus Niger* [Nugaeva2007]. A l'évidence, la spécificité de l'immobilisation n'a pas été démontrée. Finalement, une seule méthode véritablement spécifique de détection de spores sur site a été identifiée dans la littérature : les spores du mildiou de la vigne sont piégées, puis déposées sur une feuille de vigne témoin [Kast1994].

Comment rendre l'immobilisation sélective ? La première interaction spore-surface est d'abord entièrement non-spécifique et passive : la spore s'attache, de façon réversible.

Toutefois, les études sur l'accrochage des spores phytopathogènes ont démontré une affinité plus grande pour les surfaces hydrophobes, telles que la surface des feuilles (Figure A.8). En effet, la cuticule des plantes est hydrophobe. Ce caractère est notamment conféré par la cire épicutulaire, présente sous la forme de microstructures lipophiles [Joyard2017]. Les trichomes, fines excroissances présentes à la surface des plantes, permettent également de réduire la mouillabilité.



Figure A.8. Le caractère hydrophobe des feuilles [Joyard2017].

La nature a donc privilégié des spores hydrophobes ayant ainsi une plus forte affinité pour les feuilles des plantes hôtes. Le décrochage, provoqué par le vent et la pluie, est ainsi limité sur ces surfaces. La littérature expose cette même tendance pour des surfaces artificielles : les spores sont plus facilement immobilisées sur du Téflon ou du Parafilm® que sur des surfaces hydrophiles (verre, acétate de cellulose) [Hamer1988] [Clement1993] [Doss1993] [Schumacher2008] [Yamaoka1999]. Il est à noter que cette tendance est moins répandue chez les bactéries [Arreola2016][Aerrola2017][Zmantar2011], et chez certains Fungi non phytopathogènes [Holder2005][Buck1999][Sammonds2015].

Cela permet donc d'envisager les surfaces hydrophobes comme un premier moyen de discrimination des spores fongiques phytopathogènes dans l'ensemble de l'aérosol biologique. La silanisation avec des organosilanes est une des voies envisageables pour rendre une surface inorganique plus hydrophobe : elle a déjà été éprouvée pour favoriser l'immobilisation des spores fongiques phytopathogènes [Terhune1993][Doss1993] [Mercure1994][Wright2002] (Figure A.9).

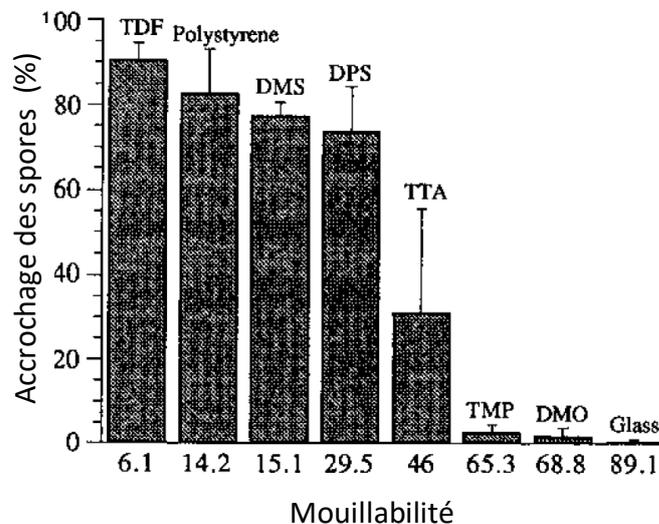


Figure A.9. Pourcentage de spores fixées sur différentes surfaces en fonction de leur mouillabilité. Le taux de spores fixées est beaucoup plus important sur les surfaces hydrophobes (c'est-à-dire de faible mouillabilité), comme le TDF (un silane fluoré), le Polystyrène, le DMS (diméthylchlorosilane) ou encore le DPS (diphényldichlorosilane) [Terhune1993].

Une deuxième tendance est démontrée par l'étude de l'accrochage des spores phytosanitaires. Les spores et la plupart des surfaces inorganiques ont toutes deux un potentiel de surface négatif. La réduction de la répulsion électrostatique permet d'augmenter

l'affinité spores-surface. Ainsi, une fonctionnalisation avec des polycations, tels que le Polyéthylèneimine (PEI), le polyacrylamide (PAA) ou le poly-L-ornithine (PLO), rend l'interaction spores-surface attractive et augmente ainsi l'efficacité de l'immobilisation des spores [Kulkarni1998][Yamaoka1999][Gerin1995] (Figure A.10).

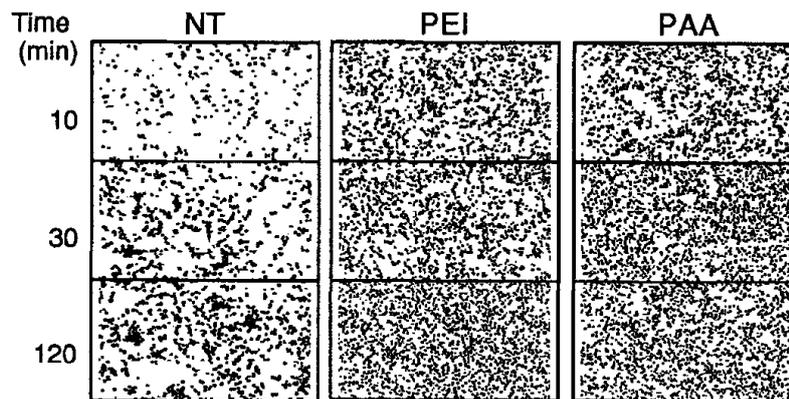


Figure A.10. Images optiques ($295 \mu\text{m} \times 225 \mu\text{m}$) de spores de *Phanerochaete chrysosporium* sur une surface en polycarbonate non traitée (NT), et fonctionnalisée avec des polycations (PEI ou PAA) [Gerrin1995].

Dans la littérature, ces deux phénomènes sont discutés sous le terme d'attachement ou d'accrochage initial (« attachement ») et non pas d'adhésion. Cette dernière, déclenchée par la présence d'eau libre, met en jeu des adhésifs et accompagne la germination. La fixation de la spore devient alors active. En présence d'eau libre, certaines spores libèrent un matériel adhésif stocké dans l'espace périplasmique : le Spore tip mucilage ou Spore Tip Glue [Epstein2016]. Cette libération est concomitante aux premières étapes de la germination et se fait souvent indépendamment d'un éventuel contact avec une surface. Si la spore (ou le germe) est déjà déposée sur une surface, quelle qu'elle soit, cette colle vient sceller la spore définitivement. Plus répandue chez les Fungi, l'adhésion est également opérée durant toute la germination, jusqu'à la perforation de la cuticule, grâce à une matrice extracellulaire adhérente (« extracellular matrix » ou « fungal sheath ») qui permet à toutes les nouvelles structures du pathogène (tube germinatif, hyphes et appressarium) de rester fixées à la surface [Epstein2016]. Cette matrice extracellulaire suggère l'activation du métabolisme de la plante, mais cette forme d'adhésion reste en grande partie non spécifique chez la plupart des Fungi.

La détection de cette matrice extracellulaire pourrait permettre d'identifier une spore. Ces matériels adhérents sont principalement constitués de protéines et de carbohydrates, et également d'une faible proportion de lipides [ClaverieMartin1986][Gerin1993][Doss1995][Doss1999][Howard1993]. La présence de cutinase et d'estérase est également démontrée chez plusieurs phytopathogènes [Gindro1997][Schnee2013], tout comme l'hydrophobine [Wessels1996]. Plus récemment les chercheurs s'accordent enfin sur la présence répandue au sein des Fungi de glycoprotéines [Schumacher2008][Epstein2016][Sammonds2015].

(ii) Spectroscopie des spores

Les spectroscopies Infrarouge et Raman ou la fluorescence UV-visible permettent une discrimination des bio-particules en suspension dans l'air : spores fongiques (conidies), spores bactériennes (endospores) et pollen [Lecellier2013][Farber2019].

La spectroscopie infrarouge, en transmission ou en réflexion totale atténuée (mode ATR), nous intéresse tout particulièrement dans le cadre de ce travail de thèse. Elle se focalise sur l'absorption dans le moyen infrarouge, et presque exclusivement sur la gamme 2000 cm^{-1} - 800 cm^{-1} ($5\text{ }\mu\text{m}$ - $12,5\text{ }\mu\text{m}$). Cette gamme de longueurs d'onde est appelée l'empreinte digitale du taxon, « fingerprint of taxon » en anglais, car elle est très riche en informations. Elle comprend notamment les carbonyles (lipides), les amides I & II (protéines, peptides & acides aminées), les acides nucléiques, les phospholipides et les carbohydrates. Les carbohydrates et protéines se révèlent également vers 3000 cm^{-1} ($3,3\text{ }\mu\text{m}$), mais cette bande d'absorption est rarement utilisée car éclipsée par l'absorption des groupes hydroxyles O-H. Enfin, quelques études portent sur le proche infrarouge, c'est-à-dire sur la gamme $4000 - 12000\text{ cm}^{-1}$ ($0,8\text{ }\mu\text{m}$ - $2,5\text{ }\mu\text{m}$). La mesure est alors réalisée en plaçant quelques spores fongiques dans une sphère intégrante [Zhao2015][Zhao2019][Li2014].

Pollens, spores bactériennes et spores fongiques sont les trois types de bio-particules de dimension similaire qui sont largement présents dans l'aérosol. Ils sont tous constitués avec les mêmes briques répandues dans le vivant : carbohydrates, lipides et protéines. Néanmoins, les Fungi présentent quelques singularités moléculaires, comme la présence de chitine et la forte teneur en glycoprotéines ou en glucane [Nie2007][Bombalska2011][Mohacek-Grosev2001]. Mais même s'il en résulte des différences spectrales (Figure A.11) elles ne sont

pas toujours facilement exploitables. Pour pallier cette difficulté, des travaux de recherche se consacrent à l'optimisation et l'uniformisation des méthodes d'échantillonnage [Fischer2006][Tralamazza2013]. D'autres se focalisent entièrement sur l'optimisation des méthodes d'analyse des données : analyse en composantes principales (ACP), regroupement hiérarchique, régression des moindres carrés partiels (méthode PLSR) par exemple [Filho2019][Zhao2015][Zhao2019].

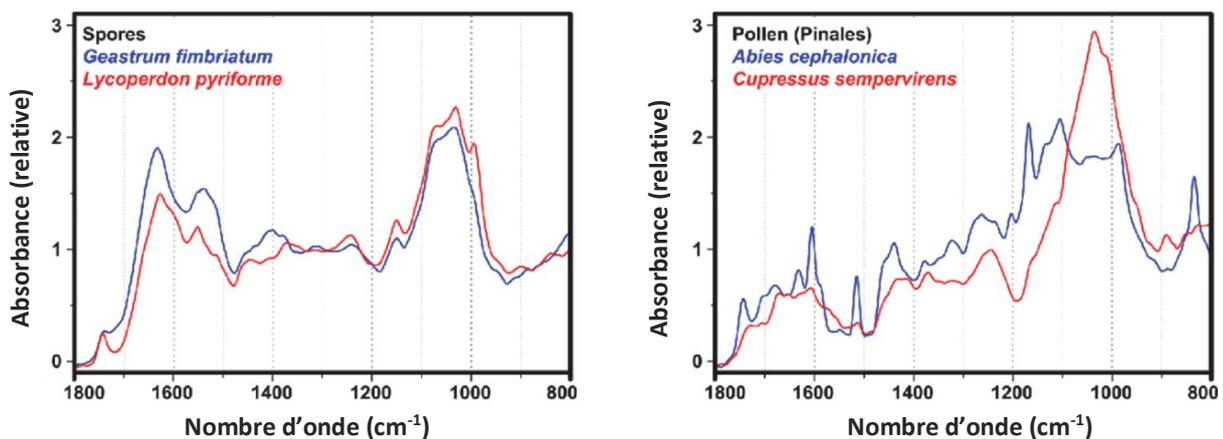


Figure A.11. Spectres d'absorption infrarouge d'aérosols biologiques. Les spectres des spores (à gauche) sont différents des spectres des pollens (à droite) [Zimmermann2015].

Finalement, plusieurs études parviennent à démontrer l'efficacité de la spectroscopie infrarouge dans l'identification et la classification de ces particules biologiques [Bombalska2011][Mularczyk-Oliwa2012][Zimmerman2015]. La Figure A.12 présente, à titre d'exemple, les résultats d'une analyse multivariée de type ACP (analyse en composantes principales). Sans entrer dans les détails, cette analyse permet de mettre en évidence des groupements de points, chaque groupement étant caractéristique d'un aérosol différent.

Au sein même des Fungi, la spectroscopie infrarouge s'est également montrée efficace pour différencier les spores de plusieurs ascomycètes ou basidiomycètes [Bastert1999][Fisher2006][Tralamazza2013][Ergin2013][Li2014][Dixit2014][Zhao2015][Zhao2019]. Au sein même d'un genre, chez *Aspergillus* et chez *Fusarium* (responsable respectivement des moisissures et de la fusariose du blé), la spectroscopie infrarouge offre la possibilité de différencier plusieurs espèces et même plusieurs souches [Nie2007][Garon2010]. En effet, la

spectro-microscopie montre que les spores ont une signature spectrale plus prononcée que le mycélium, car plus riches en carbohydrates et protéines [Ali2013][Oberle2015], facilitant ainsi leur identification. Toutefois, une étude montre que parmi les structures fongiques chez plusieurs basidiomycètes, seules les spores ne permettent pas une distinction entre les genres [Mohacek-Grosev2001].

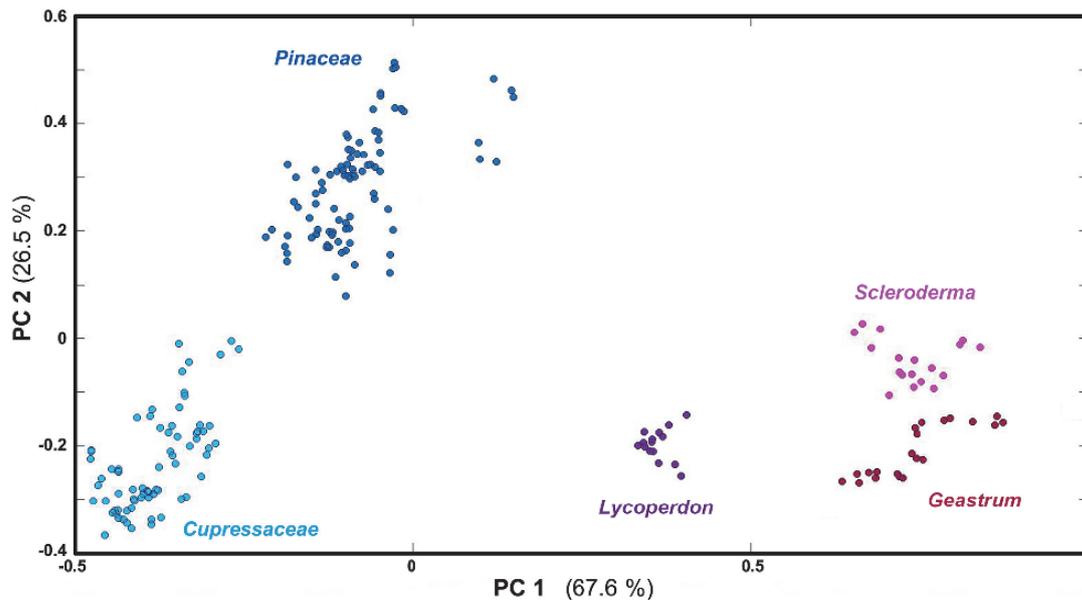


Figure A.12. L'analyse multivariée, telle que l'ACP (Analyse en Composantes Principales), permet d'identifier des aérosols grâce à leurs spectres d'absorption infrarouge [Zimmermann2015].

L'identification des spores fongiques est donc possible par spectroscopie infrarouge. Cependant, trois difficultés limitent son application. Premièrement, les spores ont des dimensions micrométriques, et provoquent donc dans cette gamme d'importants phénomènes de diffusion de la lumière. Deuxièmement, les spores fongiques sont toutes constituées des mêmes briques élémentaires biologiques ; leurs spectres d'absorption peuvent donc être très similaires. Pour finir, les spores sont constituées d'une quantité significative d'eau. Les fortes absorptions des groupements O-H (i) noient certaines absorptions dans l'infrarouge, notamment les N-H, et (ii) expliquent une grande partie de la variance entre les spectres. De plus, multiplier les différentes liaisons d'hydrogène provoque

la dégénérescence des états énergétiques. Sur le spectre cela provoque l'étalement et le chevauchement des fréquences d'absorption, ou plus justement, des bandes d'absorption.

En conclusion de ce paragraphe sur l'identification des spores par spectroscopie, elle est assujettie à un échantillonnage très rigoureux et complexe en amont, mais également à l'utilisation d'outils d'analyse multivariée.

A.II. Les guides d'onde infrarouges pour la détection

A.II.1. Le domaine infrarouge

La lumière infrarouge est une onde électromagnétique dans laquelle on distingue 3 domaines principaux : le proche IR (0,8-2,5 μm), le moyen IR (2,5-25 μm) et le lointain IR (>25 μm). L'étude se focalisera sur le proche et le moyen infrarouge, c'est-à-dire la gamme 0,8-25 μm .

Le proche infrarouge profite d'une technologie développée et déjà bien aboutie, notamment grâce aux applications en télécommunications (aux longueurs d'onde 1,31 et 1,55 μm). Les sources et détecteurs miniaturisés sont accessibles, peu onéreux, et transposables à d'autres applications telles que la détection.

Dans le moyen infrarouge, les fréquences des ondes électromagnétiques correspondent aux transitions énergétiques de nombreux groupements chimiques. Les absorptions fortes et spécifiques des molécules et biomolécules dans le moyen infrarouge permettent leur identification sélective. La gamme 5-10 μm est d'ailleurs surnommée empreinte digitale. La spectroscopie dans le moyen infrarouge est ainsi une méthode d'analyse chimique très largement répandue en laboratoire.

A.II.2. Les guides d'onde infrarouges

Pour développer les applications infrarouges, la micro-électronique introduit l'optique intégrée comme plateforme versatile de conjugaison des différents composants. L'optique intégrée permet la conception de dispositifs robustes, miniaturisés et fabriqués à grande échelle. Ainsi, sources infrarouges, modulateurs électro-optiques, photodétecteurs, amplificateurs, et transducteurs s'intègrent ensemble sur une même puce. Ces composants

optiques sont interconnectés entre eux par des guides d'onde, briques de base de l'optique intégrée. La lumière est confinée dans la section du guide de taille micrométrique.

Le choix des matériaux est contraint par leurs propriétés optiques dans la gamme infrarouge (transparence, indice optique), mais aussi par leur facilité de micro-fabrication. Pour la fabrication de ces guides d'onde infrarouges, les polymères PMMA et SU-8, les semiconducteurs III-V, le Silicium, les verres d'oxydes ou les nitrures sont de bons candidats à 1,55 μm . Quant au moyen infrarouge (2,5-25 μm) les matériaux transparents utilisés sont les halogénures d'argent (AgX (X = Br, Cl,..), les chalcogénures (tels que As_2Se_3 , Ge-Se-Te) et des matériaux cristallins tels que le germanium, le ZnSe ou les semiconducteurs III-V (GaAs, InP, GaN..) [Schaedle2016]. Dans cette dernière gamme de longueurs d'onde, les sources lasers intégrables et abordables font encore défaut.

Développer des transducteurs avec ces mêmes matériaux est d'un intérêt certain : ils sont facilement intégrables. Ainsi des dispositifs de détection intégrant le transducteur à une source ou un détecteur ont pu être fabriqués sur une même puce avec des guide d'onde chalcogénures [Du2018][Han2016][Su2019], GaAs [Sieger2012][Wang2012] ou encore en technologie silicium [Consani2018][Tombez2017].

L'optique géométrique appliquée aux guides plans (formés d'une superposition de couches) offre une première approche simple des mécanismes du guidage optique. Les propriétés de propagation de la lumière sont déterminées par la géométrie du guide et par les propriétés optiques de ses éléments. A l'instar des fibres optiques utilisées en télécommunications où la lumière est confinée dans le cœur par suite de réflexions totales internes sur la gaine, la lumière est confinée dans la couche de cœur (d'indice n_c) des guides d'onde planaires par réflexions totales internes sur les deux milieux qui l'entourent : le substrat et le superstrat. Les indices de ces deux milieux qui entourent la couche de cœur sont n_{sub} et n_{sup} , respectivement, avec $n_c > n_{\text{sub}}$ et $n_c > n_{\text{sup}}$. La lumière reste confinée si l'angle de réflexion θ (défini sur la Figure A.13) est supérieur à un angle critique θ_{critique} , défini par la loi de Snell-Descartes (éq. A.1) :

$$\theta_{\text{critique}} = \arcsin \left(\frac{n_g}{n_c} \right) \quad \text{éq. A.1}$$

avec $n_g = n_{\text{sub}}$ ou n_{sup} . La lumière peut être confinée selon une seule dimension : celle-ci se propage alors selon les deux autres directions et on parle de guide plan. L'onde peut aussi être confinée dans deux dimensions, dans des guides canaux, tels que les guides d'onde à crêtes, à bandes, à fentes ou enterrés.

L'approche ondulatoire de l'optique guidée fait apparaître de nouveaux phénomènes aux interfaces, notamment l'effet Goos-Hänchen et le déphasage de Fresnel. A chaque réflexion, une partie de la lumière pénètre dans la gaine. Cette lumière se propage à l'extérieur du guide selon l'axe longitudinal : c'est l'onde évanescente. Son intensité est très faible et sa profondeur de pénétration dans les deux milieux environnants (substrat et superstrat) est très petite. Mais cette onde évanescente est à la base de l'utilisation des guides d'onde pour la détection. C'est en effet via cette onde évanescente qu'il peut y avoir des interactions entre le signal propagé et le milieu extérieur. Ces interactions sont d'ailleurs à la base de la spectroscopie en réflectance totale atténuée.

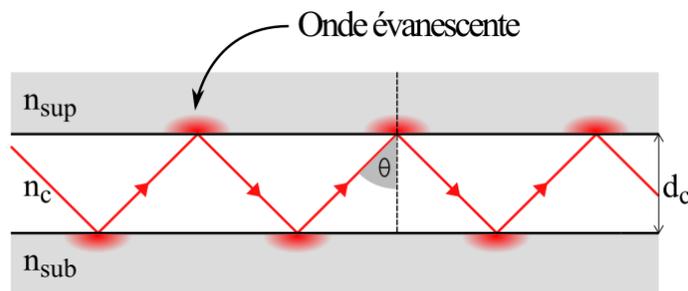


Figure A.13. Confinement de la lumière dans la couche de cœur par réflexions totales internes aux interfaces avec le substrat et le superstrat.

La condition de réflexion totale interne est dictée par les indices optiques du cœur (n_c) et des deux milieux environnants (n_{sub} et n_{sup}) du guide, selon la loi de Snell-Descartes. A chaque point de réflexion totale, une onde évanescente pénètre dans les deux couches qui entourent la couche de cœur.

Dans une première approche purement géométrique, nous avons vu que la lumière peut être confinée dans le guide d'onde, dès lors que les conditions sur l'angle θ sont remplies. L'approche ondulatoire permet d'introduire l'onde évanescente lors de la réflexion. Pour une

analyse et une description toujours plus rigoureuse de l'optique guidée, la théorie privilégiée est l'électromagnétisme. La résolution des équations de Maxwell fait en particulier apparaître des solutions discrètes : les modes de propagation (Figure A.14). La lumière infrarouge se propage uniquement selon ces modes autorisés. La répartition du champ électromagnétique, et donc l'indice effectif ou la vitesse de propagation sont différentes suivant ces modes.

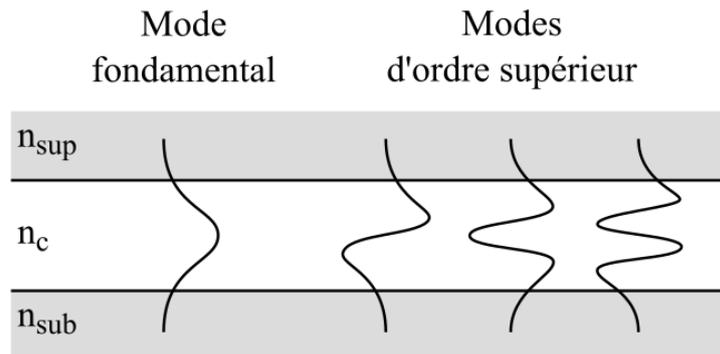


Figure A.14. Profils de différents modes de propagation.

On appelle un guide monomode un guide d'onde dont la propagation d'une lumière de longueur d'onde λ ne peut se faire que sur un mode, appelé le mode fondamental. Celui-ci est localisé majoritairement dans le cœur du guide. Les méthodes de détection interférométriques sont facilitées par l'utilisation de guides monomodes. L'interféromètre de Mach-Zehnder, à modulation de phase, en est un exemple très répandu [Sieger2012].

Les guides multimodes sont de dimensions ou de différence d'indices plus grandes, et plusieurs modes co-existent et interfèrent. Les modes de propagation d'ordre supérieur sont généralement moins bien confinés et ont une composante évanescente plus importante. Ces modes se retrouvent donc davantage en interaction avec le milieu environnant, mais occasionnent plus de pertes.

A.II.3. Les guides d'onde pour la détection

Dans les paragraphes suivants, est donné un aperçu des différents principes sur lesquels peut reposer la détection à partir de l'utilisation de guides d'onde.

A.II.3.a. La transduction

Comme il l'a été spécifié dans le paragraphe précédent, une partie de l'onde guidée se propage à l'extérieur du cœur : dans la gaine pour les fibres optiques et dans le substrat et le superstrat pour les guides d'onde en technologie planaire. C'est l'onde évanescente. En effilant localement la gaine des fibres optiques, ou bien en prenant le milieu extérieur comme superstrat pour les guides d'onde en technologie planaire, l'onde évanescente est en mesure d'interagir avec un analyte (n_a), comme illustré sur la Figure A.15. Le guide d'onde peut alors être utilisé pour détecter des gaz, des liquides ou des particules.

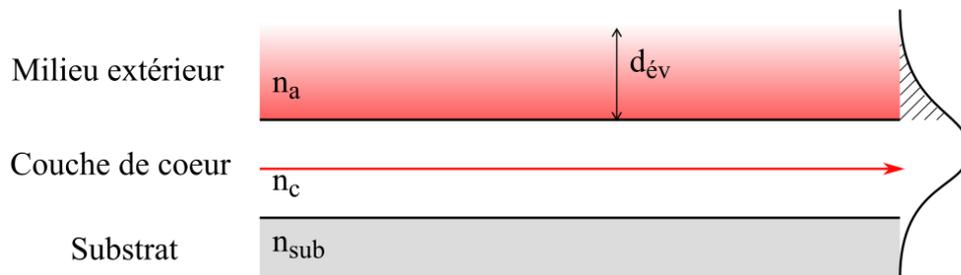


Figure A.15. Mise en évidence de l'interaction de l'onde évanescente, dont la profondeur de pénétration est $d_{év}$, avec le milieu extérieur dans un guide d'onde en technologie planaire. Le superstrat est constitué par le milieu extérieur à analyser.

Il est à noter que l'intensité du champ évanescent décroît exponentiellement en s'éloignant de la surface de la couche de cœur. La sensibilité du guide d'onde pour détecter un analyte est donc d'autant plus grande que celui-ci est proche de la surface. La profondeur de pénétration de l'onde évanescente est quant à elle caractérisée par $d_{év}$, valeur qui croît avec la longueur d'onde, varie selon le couple (n_c , n_a) et dépend de l'angle θ caractéristique des réflexions totales aux interfaces (éq.A.2).

$$d_{év} = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_c^2 \cdot \sin^2\theta - n_a^2}} \quad \text{éq. A.2.}$$

Lorsqu'un analyte interagit avec l'onde évanescente, la propagation de la lumière infrarouge est affectée. L'analyte peut absorber une partie de l'onde évanescente : une diminution de l'intensité de l'onde en sortie de guide sera observée, et une analyse spectroscopique

permettra de remonter à sa nature. L'analyte entraîne également une modification de l'indice de réfraction effectif du guide. Des méthodes réfractométriques permettront de remonter par exemple au déphasage ou à la polarisation de l'onde électromagnétique.

(i) La spectroscopie infrarouge

A l'image des dispositifs de spectroscopie infrarouge en réflectance totale atténuée, l'onde évanescente est absorbée par l'excitation des modes de vibration et de rotation des liaisons chimiques (Figure A.16).

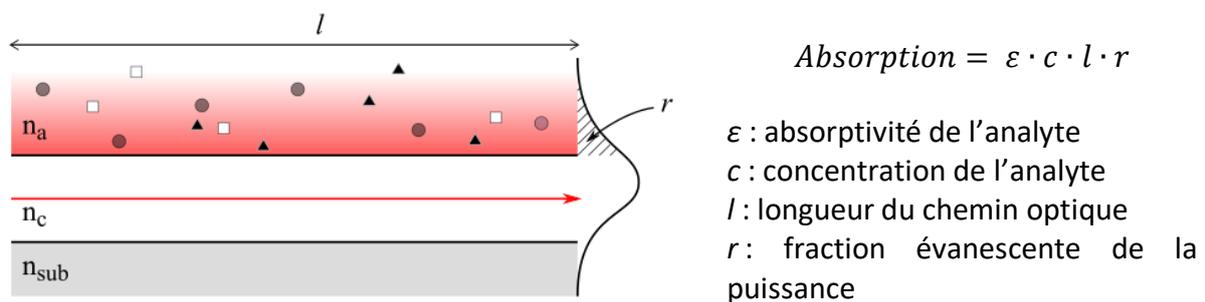


Figure A.16. Interaction des analytes et de l'onde évanescente, phénomène à la base de la détection par spectroscopie infrarouge.

Le spectre infrarouge fournit des informations sur la structure moléculaire, la force et l'orientation des liaisons chimiques. De plus, selon la loi de Beer-Lambert, la concentration en analyte découle directement de l'absorption. Ces dispositifs fournissent donc une information qualitative et quantitative. L'absorption est fonction de l'absorptivité (ϵ), qui pour un même groupement chimique, est plus grande dans la gamme du moyen infrarouge que du proche infrarouge. De plus, la profondeur de pénétration, et donc la fraction évanescente de la puissance, augmente avec la longueur d'onde. Ainsi, la sensibilité est plus grande dans la gamme moyen-infrarouge.

Toujours selon la loi de Beer-Lambert, une meilleure sensibilité peut être obtenue en allongeant la longueur du chemin optique l . Des structures en spirales en sont un bon exemple [Su2019][Li2018a]. Finalement, avec des analytes liquides, ces capteurs par absorption évanescente parviennent à des limites de détection de l'ordre du ppm

[Michel2004] ou de la dizaine de pl [Wang2012]. Les gaz, mille fois moins denses, sont détectables à partir de quelques pourcents [Su2019][Smith2015].

Parmi les dispositifs, la spectroscopie FEWS (fiber-optic evanescent wave spectroscopy), c'est à dire la spectroscopie à fibre optique par champ évanescent, propose d'allier la spectroscopie avec la souplesse, la compacité et la versatilité des fibres optiques [Raichlin2008]. Les guides d'ondes planaires en halogénure d'argent, matériaux III-V ou chalcogénures ont quant à eux un avantage dans le design de dispositifs compacts et intégrables [Schaedle2016]. Des guides d'ondes canaux en verre de chalcogénure (As_2Se_3 , Ge-Sb-S et Ge-Sb-Se) se sont ainsi révélés être de bons candidats pour la détection en spectroscopie par champ évanescent. Plusieurs publications démontrent la faisabilité de ces dispositifs, aussi bien dans le proche que le moyen infrarouge, et aussi bien en milieu liquide qu'en milieu gazeux (Tableau A.2 page suivante).

Guide	Analyte	Liaison chimique	Fréquence d'absorption	Milieu	Limite de détection	Référence
Ge ₂₃ -Sb ₇ -S ₇₀	Diméthylaniline	N-H	1,496 μm	CCl ₄	0,7 % (v)	Hu2007
Ge ₂₃ -Sb ₁₀ -Se ₆₅	Phényléthylamine	N-H	1,46-1,56 μm	CCl ₄	0,1 mol.L ⁻¹	Charrier2012
Ge ₂₂ -Sb ₁₈ -S ₆₀	Chloroforme	C-H	1,695 μm	CCl ₄	25% (v)	Du2018
Ge ₂₃ -Sb ₇ -S ₇₀	Méthane	C-H	3310 cm ⁻¹	N ₂	2,5% (v)	Han2016
Ge ₂₃ -Sb ₇ -S ₇₀	Méthane	C-H	3020 cm ⁻¹	N ₂	1% (v)	Su2019
As ₂ Se ₃	Ethanol et acétone	C-H	2800-3000 cm ⁻¹	N ₂	25% (v)	Jin2019

Tableau A.2. Etat des lieux des publications impliquant l'utilisation de guides d'onde chalcogénures pour la détection de molécules de gaz ou de liquide.

Les spectroscopies en atmosphère humide ou solution aqueuse souffrent des multiples et fortes absorptions de la liaison O-H sur le spectre infrarouge (1,5 ; 1,9 ; 2,9 ; 4,5 ; 6,1 μm). Certains travaux prennent d'ailleurs avantage de ces fortes absorptions pour détecter de faibles quantités d'eau [TalebBendiab2019][TalebBendiab2018]. Finalement, rares sont les exemples de détection d'analyte en atmosphère ambiante ou en solution aqueuse [Haas2018]. Pourtant, la plupart des applications supposent une telle détection : polluants

atmosphériques, qualité de l'eau, diagnostic médical, etc. Comment détecter l'analyte alors que l'eau représente plus de 90 % du milieu ? Cette difficulté motive une grande partie des travaux portant sur la fonctionnalisation des guides d'onde.

(ii) La réfractométrie

Une autre approche consiste à détecter une subtile variation de l'indice de réfraction. L'indice effectif vu par le mode propagé au sein d'un guide d'onde intègre la composante évanescente sur la surface du guide. L'immobilisation de macromolécules, le dépôt de matériaux, ou l'apparition d'un analyte à la surface du guide se répercute sur la valeur de l'indice. De ces valeurs et contrastes d'indice découlent toutes les propriétés de propagation de la lumière.

De nombreuses structures résonantes peuvent exalter et révéler des variations d'indice : résonance par plasmon de surface, cristal photonique, interféromètre ou réseau de diffraction [Kribich2012]. Des résonateurs en anneaux, illustrés sur la Figure A.17, sont également largement utilisés en détection. Ces structures, des plus simples ou plus élaborées, sont d'autant plus sensibles que l'analyte a un indice différent du milieu environnant.

Malheureusement, de nombreux analytes ont des indices de réfraction optiques similaires, et marquent peu l'indice effectif d'une solution liquide ou gazeuse. A ce titre, les indices optiques des gaz sont très proches et sont difficilement identifiables. Température, champ électrique, pression sont également autant de facteurs qui peuvent se répercuter sur les indices optiques.

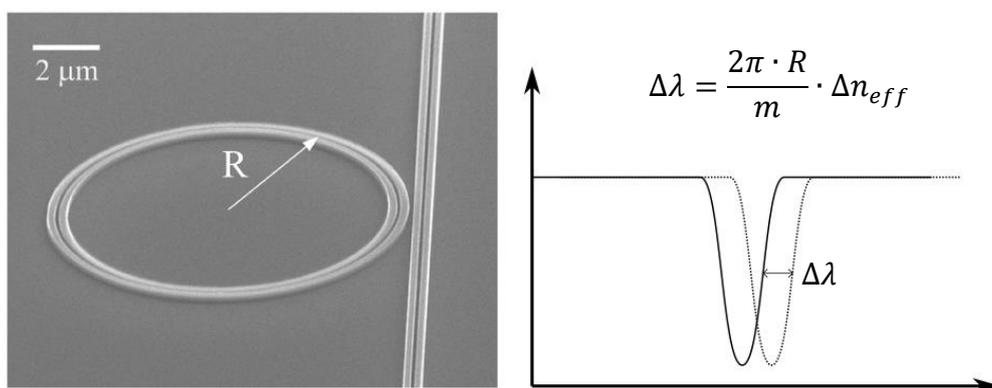


Figure A.17. Résonateur à anneaux en silicium pour la détection de protéines. L'accrochage spécifique de la protéine provoque un déplacement de la résonance propre de la structure [Claes2009].

Difficile alors d'être plus sensible sans être moins robuste. Ces capteurs souffrent par ailleurs d'une très mauvaise sélectivité car ils ne renseignent pas sur l'origine de la modification de l'indice de réfraction : à plusieurs causes, le même effet. Cette problématique est également largement rencontrée avec les capteurs micro-cantilever [Hansen2005]. Une façon de rendre la sensibilité sélective est d'avoir recours à la fonctionnalisation des guides d'onde : en rendant la couche de cœur plus hydrophobe, en y fixant des anticorps, ou en déposant à sa surface une couche poreuse par exemple, il est possible de remonter plus facilement aux causes du changement d'indice.

A.II.3.b. La fonctionnalisation des guides d'onde

La fonctionnalisation des guides d'onde introduit une sélectivité dans la mesure [Villatoro2005][Tuerdi2017], mais permet également d'augmenter la sensibilité [Lu2013] ou d'immuniser le capteur contre certaines pollutions [Ma2013]. La littérature propose différentes approches : (i) déposer une couche sensible sur le guide d'onde, (ii) recouvrir le champ évanescent d'une couche barrière sélective ou (iii) fonctionnaliser avec des récepteurs sélectifs.

(i) Dépôt d'une couche sensible sur le guide d'onde

Pour apporter de la sélectivité, la littérature propose de déposer des matériaux sensibles à l'analyte. Ces matériaux sensibles remplacent alors le superstrat ou la gaine d'une fibre optique. En présence de l'analyte, des réactions physico-chimiques provoquent des changements d'absorption, de volume ou d'indice de réfraction.

Nous pouvons citer ici les travaux de Villatoro et al. [Villatoro2005][Villatoro2005a]. Les auteurs ont déposé une couche de palladium de quelques nanomètres d'épaisseur sur une fibre optique en silice. En atmosphère hydrogène, de l'hydrure de palladium est réversiblement formé. Ce dernier matériau ayant une forte absorption à 1,55 μm , la concentration en hydrogène a donc pu être mesurée directement en analysant l'intensité de la lumière en sortie de la fibre. Depuis, plusieurs autres matériaux se sont révélés être de bons candidats en tant que couches sensibles à l'hydrogène, tels que des MOFs (metal-organic frameworks) ou des alliages [Miliutina2019]. Ces travaux rapportent la détection de l'hydrogène à des concentrations sous la limite inférieure d'explosivité de 4,1 %. De nombreux autres travaux démontrent la mesure de l'humidité grâce à des guides

d'ondes [Alwis2013][Corres2007] : des fibres optiques sont dégainées et recouvertes de matériaux hygroscopiques (polyacétate de vinyle, hydrogel). L'humidité ambiante suffit à changer les propriétés optiques de ces matériaux, affectant ainsi les conditions et propriétés de guidage de la lumière.

Enfin de nombreux travaux font état de la détection optique de polluants, notamment des métaux lourds en solution aqueuse [Zhang2020]. La chimie de coordination permet la détection du mercure par du dithizone ou du cadmium par du chitosan. La complexation du métal à la surface du guide d'onde est ainsi détectée.

(ii) Recouvrement du champ évanescent par une couche barrière sélective

Cette approche est la plus courante. Une des applications emblématiques est la détection de polluants ou d'analytes dans l'eau. Des couches de polymères hydrophobes de plusieurs micromètres sont déposées sur le guide et recouvrent entièrement le champ évanescent. Ces revêtements empêchent le solvant aqueux d'y pénétrer, mais restent perméables à l'analyte qui se concentre au plus près du champ évanescent (Figure A.18). Les guides d'onde sont par exemple recouverts de copolymères en éthylène/propylène [Lu2013][Lu2016], de poly-isobutylène [Baudet2016] ou encore du tétrakis(4-nitrophényl)porphyrine (TNPP) [Tuerdi2017]. A l'inverse, pour détecter la pollution de l'eau dans les hydrocarbures, une équipe propose le recouvrement du guide avec un polymère hydrophile polyacrylique [Luzinova2012].

Une récente étude propose également de fonctionnaliser des fibres optiques avec des nanoparticules microporeuses pour la détection d'éthanol et d'acétone en phase gazeuse [Alimagham2019]. Ces composés organiques volatils se concentrent à la surface du guide par condensation capillaire.

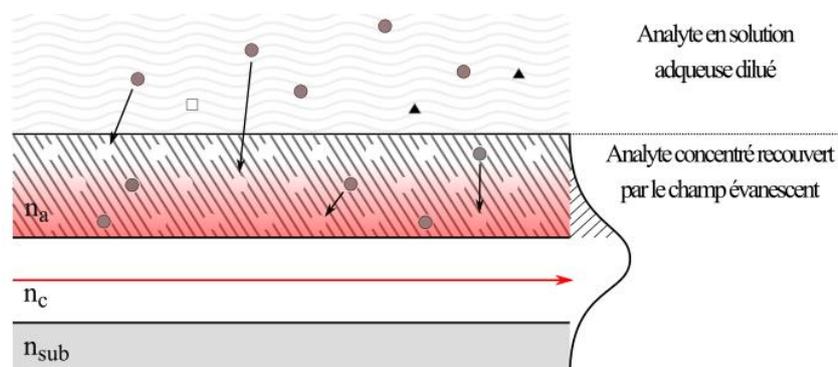


Figure A.18. Illustration du principe de détection d'analytes en solution aqueuse par dépôt d'une couche barrière hydrophobe sur un guide d'onde.

Enfin, une étude tout aussi récente propose la micro-fluidique papier pour aspirer par voie capillaire un analyte sur un guide d'onde ZnSe [Mittal2018]. Ces techniques de micro-fluidique papier sont déjà répandues dans le diagnostic médical portable et bon marché. Cette technique offre à la fois une bonne alternative au système micro-fluidique standard ou de dépôt de goutte, et peut introduire une sélectivité dans la mesure.

(iii) Fonctionnalisation des guides d'onde avec des récepteurs sélectifs.

Une autre approche consiste à immobiliser de façon sélective une protéine ou une cellule (Figure A.19). Ces analytes peuvent avoir les mêmes impacts sur le guidage ou l'absorption de la lumière, mais seules certaines protéines ou cellules pourront s'immobiliser sur le guide. Les guides d'onde sont d'abord fonctionnalisés avec une couche d'accroche : un organosilane, ou une très fine couche d'or ou de polymère. Sont ensuite accrochés des récepteurs biologiques sélectifs : les anticorps [Martin-Palma2009][Ganjoo2008]. Récemment, une équipe est parvenue à détecter l'agent pathogène Escherichia coli grâce à des guides d'onde SU-8, et ce à des concentrations aussi faibles que 100 unités formant colonie par millilitre [Xin2018].

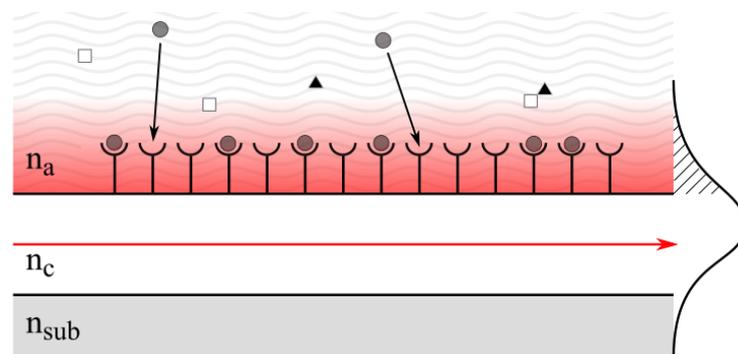


Figure A.19. Illustration de la fonctionnalisation d'un guide d'onde par des récepteurs spécifiques.

A.III. La fonctionnalisation des chalcogénures

La fonctionnalisation des couches minces chalcogénures pourrait notamment permettre une sélectivité (bio)chimique dans l'adsorption d'analytes. C'est l'étape clé vers la construction d'un biocapteur pour la détection de pathogènes, le diagnostic médical ou le contrôle de contaminations. Après quelques généralités sur la fonctionnalisation des surfaces en général, nous aborderons les différentes voies de fonctionnalisation des matériaux chalcogénures décrites dans la littérature. Nous parlerons ensuite plus spécifiquement des deux voies retenues dans le cadre de ce travail de thèse, à savoir la silanisation et la voie peptidique.

A.III.1. Généralités

La fonctionnalisation de la surface d'un matériau consiste à en modifier les propriétés physico-chimiques de surface. Cette modification permet d'introduire de nouvelles affinités physico-chimiques qui régiront les phénomènes surfaciques : adsorption, perméabilité, mouillage. Dans les cas les plus simples, un unique dépôt de couche mince sur le substrat peut suffire à apporter la fonction désirée. Mais dans beaucoup d'autres applications, notamment dans la capture spécifique de biomarqueurs (anticorps, bactérie, cellules...), la fonctionnalisation nécessite plusieurs étapes, comme illustré dans la Figure A.20.

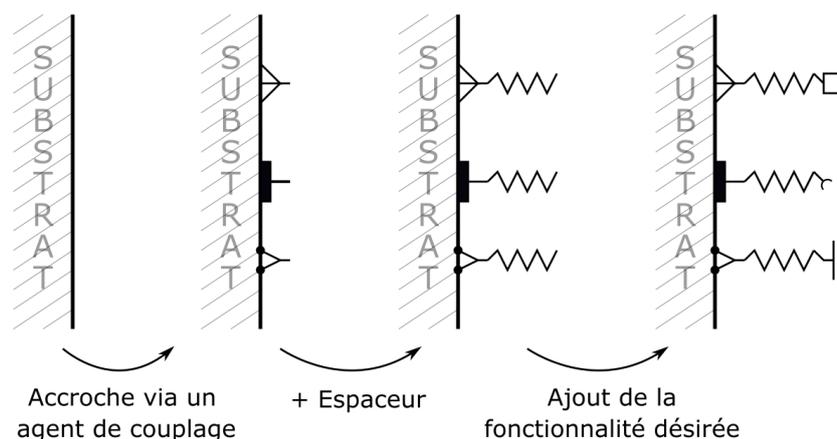


Figure A.20. Exemple d'un procédé de fonctionnalisation nécessitant plusieurs étapes.

L'immobilisation de molécules biologiquement actives ou non à la surface d'un substrat nécessite d'abord la fixation d'un agent de couplage, appelé aussi agent de greffage. Cette modification de surface est spécifique au substrat, et permet l'obtention d'une première couche active, dont les groupements libres sont identifiés et facilement exploitables : $-NH_2$, $-COOH$, $-SH$, $-OH$...

Les agents de couplage se fixent sur le substrat par des liaisons covalentes ou plus simplement par physisorption. Le greffage covalent est basé sur l'établissement de liaisons (iono)-covalentes fortes entre une molécule et la surface d'un substrat. Les organosilanes et les thiols sont par exemple largement utilisés pour former avec le substrat des liaisons covalentes, via les atomes de silicium et de soufre. Les organosilanes sont largement utilisés pour la fonctionnalisation de surfaces métalliques (M-O-Si), et les thiols pour la fonctionnalisation d'or (Au-S). La chimie de coordination est également utilisée pour la modification des surfaces constituées de cations métalliques. La permutation des ligands permet de choisir la fonction libre à la surface du matériau.

L'adsorption physique ou la physisorption est la fixation réversible de molécules d'adsorbat à la surface d'un adsorbant via des interactions faibles (liaison hydrogènes ou électrostatiques). La fonctionnalisation n'est pas spécifique et le terme dépôt est parfois préféré pour les couches minces inorganiques. Cette méthode est aussi largement utilisée dans la fonctionnalisation de systèmes actifs.

Après l'accroche d'un agent de couplage, l'optimisation de la conformation et de la disponibilité des futurs sites actifs est parfois nécessaire. Cette nouvelle modification met en jeu de longues chaînes carbonées, des couches ioniques, ou différentes protéines (appelées espaceurs dans la Figure A.20). Ces étapes intermédiaires peuvent être nombreuses. La dernière étape de la modification introduit enfin les fonctions physiques, chimiques ou biologiques recherchées, parfois hautement spécifiques tels que les anticorps.

A.III.2. Etat de l'art sur la fonctionnalisation des chalcogénures

La littérature propose plusieurs stratégies pour fonctionnaliser des matériaux chalcogénures. Dans les paragraphes suivants, nous allons nous intéresser au greffage covalent et spécifique

des surfaces chalcogénures, au dépôt d'une couche mince de polymère ou métallique et à la fonctionnalisation des matériaux chalcogénures riches en sélénium en particulier.

A.III.2.a. Greffage covalent des surfaces chalogénures

Le tableau A.3 résume les principaux travaux portant sur le greffage covalent et spécifique des surfaces chalcogénures. Dès 1990 est proposée une première voie de fonctionnalisation avec le (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) [Taga1990], déjà largement utilisé pour modifier la surface d'autres matériaux. Ainsi des fibres optiques de composition $As_{29}Se_{54}Te_{17}$ sont fonctionnalisées avec l'APTES, mais aussi avec le (3-glycidyloxypropyl)triméthoxysilane (GPTMS). Cette modification met en jeu de la physisorption, et une possible liaison covalente Te-O-Si [Taga1993]. Plus tard, des liaisons Ge-O-Si ont été mises en évidence, grâce à des analyses par spectroscopie de masse, à la surface d'un verre du système Ge-As-Se après fonctionnalisation avec des alkoxy-silanes [Amalric2012][Amalric2014]. Enfin ces liaisons Ge-O-Si ont été évoquées dans la fonctionnalisation d'un cristal de germanium par du triéthoxysilylane ($HSi(OEt)_3$) [Devouge2009].

Matériau	Surface	Agent d'accroche	Procédé	Liaison	Référence
$Ge_{33}As_{12}Se_{55}$	Massif	PEG7-TES	Drop casting et irradiation	Ge-O-Si	Amalric2014
$Ge_{10}As_{40}Se_{50}$					Amalric2012
$As_{29}Se_{54}Te_{17}$	Fibre optique	APTES	Cellule microfluidique	Te-O-Si ?	Taga1990
		GPTMS		Physisorption	Taga1993
$Ge_{33}As_{12}Se_{55}$	Massif	Disulfure	Drop casting et irradiation	As-S	Amalric2014
$Ge_{10}As_{40}Se_{50}$				Se-S	Amalric2012
					Amalric2011

Tableau A.3. Travaux portant sur la fonctionnalisation covalente et spécifique de matériaux chalcogénures.

D'autres fonctions se sont également montrées concluantes pour fonctionnaliser le matériau Ge-As-Se massif. On peut par exemple citer les disulfures. Après irradiation UV, les liaisons S-S des disulfures sont rompues, rendant possible la création de liaisons covalentes entre le

soufre et l'arsenic ou le sélénium [Amalric2011]. On peut également citer les azotures : le O-succinimidyle-4-(p-azido-phényl)butanoate a par exemple été utilisé pour la fonctionnalisation du Ge-As-Se [Amalric2014]. La mise en évidence de liaisons covalentes n'a toutefois pas été établie. A contrario, les fonctions fluoroazidobenzène et fluorobenzène, catéchol, acides et esters phosphoniques ne se sont pas avérées pertinentes pour la fonctionnalisation de Ge-As-Se [Amalric2014].

A.III.2.b. Dépôt de couche mince

D'autres méthodes, moins spécifiques, reposent sur le dépôt d'une couche mince de polymère ou d'un métal sur la surface des matériaux chalcogénures. Différents polymères ont par exemple été utilisés dans la littérature : le poly(L-Lysine) [Taga1994], le poly(amino-p-xylylène) [Martin-Palma2009] ou encore le poly(isobutylène) [Baudet2016] (Tableau A.4). L'interaction entre la couche mince de polymère et le matériau chalcogénure est principalement physique, et l'épaisseur de la couche ajoutée est plus grande que dans le cas d'un greffage covalent. Elle peut varier de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres, comme on peut le voir dans le Tableau A.4.

Matériau	Surface	Agent d'accroche	Procédé	Epaisseur	Référence
As ₂₉ Se ₅₄ Te ₁₇	Fibre optique	Poly(L-Lysine)	Cellule microfluidique	40 nm	Taga1994
Ge ₂₈ Sb ₁₂ Se ₆₀	Couche mince	Poly(amino-p-xylylène)	CVD	≈ 100 nm	Martin-Palma2009 Elkasabi2006
Ge ₁₂ Sb ₂₅ Se ₆₂	Guide d'onde	Polyisobutylène	Spin Coating	≈ 4 μm	Baudet2016 Baudet2017
Ge ₂₈ Sb ₁₂ Se ₆₀	Couche mince	Or	Evaporation	20 nm	Yu2006 Ganjoo2008

Tableau A.4. Travaux portant sur la fonctionnalisation des matériaux chalcogénures par dépôt d'une couche de polymère ou métallique.

Concernant le dépôt d'une couche mince métallique, on peut citer les travaux de Yu et al. et de Ganjoo et al. [Yu2006][Ganjo2008], qui ont utilisé une couche d'or comme couche intermédiaire dans le procédé de fonctionnalisation. Une couche d'or est en effet déposée sur le matériau chalcogénure (une couche mince de composition Ge₂₈Sb₁₂Se₆₀), puis

fonctionnalisée avec l'acide 3-mercaptopropionique [Yu2006] ou l'acide 16-mercaptophexadecanoïque [Ganjo2008]. L'or est physisorbé sur la surface de chalcogénure, puis les atomes de soufre des groupements -SH établissent des liaisons covalentes avec l'or : S-Au.

A.III.2.c. Fonctionnalisation des matériaux riches en sélénium

La littérature fait état de nombreux exemples de fonctionnalisation des matériaux chalcogénures riches en sélénium (Tableau A.5). La fonctionnalisation de nanoparticules de ZnSe avec de l'iodobenzène met par exemple en jeu la liaison Se-C, dont la présence a pu être démontrée par la RMN du carbone (^{13}C) [vishnoi2018]. La fonctionnalisation de nanoparticules de sélénium avec des polysaccharides se fait quant à elle via les liaisons covalentes Se-O [Liao2015][Maiyo2017]. La chimie de coordination permet également le contrôle et le remplacement des ligands sur des nanoparticules de ZnSe et CdSe ou sur du InSe massif, grâce aux métaux de transition [Wisher2006][Lei2016].

Matériau	Surface	Agent d'accroche	Procédé	Liaison	Référence
ZnSe	NPs*	Iodobenzène	Immersion	Se-C	Vishnoi2018
Se	NPs*	Curcumine	En synthèse	Physisorption, Se-O	Yu2016 Kumari2017
Se	NPs*	Polysaccharide	En synthèse	Physisorption, Se-O	Liao2015 Maiyo2017
CdSe, ZnSe	NPs*	Thiolated PAMAM	Echange de Ligand	Coordination	Wisher2006
InSe	Massif	TiCl ₄	Dip coating	Coordination	Lei2016
ZnSe, CdSe	Massif	Peptide	Drop Casting	Interactions faibles	Estephan2009
ZnSe	Massif	Peptide	Drop Casting	Interactions faibles	Saab2010

Tableau A.5. Travaux portant sur la fonctionnalisation de matériaux chalcogénures riches en sélénium. *Nanoparticules

La recherche de nouvelles voies de fonctionnalisation s'intéresse à la sélection de peptides ayant une affinité sélective pour des surfaces inorganiques. Le peptide est en effet capable de « reconnaître » une surface inorganique et de s'y adsorber spécifiquement. Ainsi, des

peptides ont montré leur capacité à s'adsorber sur de très nombreux matériaux semi-conducteurs, notamment sur ZnSe et CdSe, et ce grâce à de multiples liaisons intermoléculaires faibles [Estephan2009][Saab2010].

A.III.3. La silanisation

La silanisation de surface est un procédé qui repose sur la chimie sol-gel [Hjezi2015]. Cette chimie a été développée dès le 19^{ème} siècle par Ebelman [Ebelmen1846] et Graham [Graham1864], et consiste en la polymérisation inorganique de précurseurs alcoolates métalliques de formule générale $M(OR)_n$ (dans notre cas $Si(OR)_n$). La fonctionnalisation de surface via ce procédé est un cas particulier de cette chimie sol-gel, où seule une très fine couche de précurseurs est déposée sur ladite surface. En pratique elle est donc réalisée par spin-coating, dip coating ou drop casting.

A.III.3.a. Généralités

La fonctionnalisation d'une surface inorganique par des organosilanes est une méthode fréquemment utilisée, notamment pour la détection [Ness2013][Frascella2013]. Cette fonctionnalisation se déroule en deux étapes : hydrolyse et condensation. Ce procédé de fonctionnalisation profite d'un large panel d'organosilanes précurseurs, qui permettent d'atteindre des finalités très différentes. La silanisation de surface a d'abord été développée pour fonctionnaliser des oxydes métalliques et des verres [Maoz1984], avant de s'étendre largement à toutes les surfaces sujettes à l'hydroxylation (M-OH).

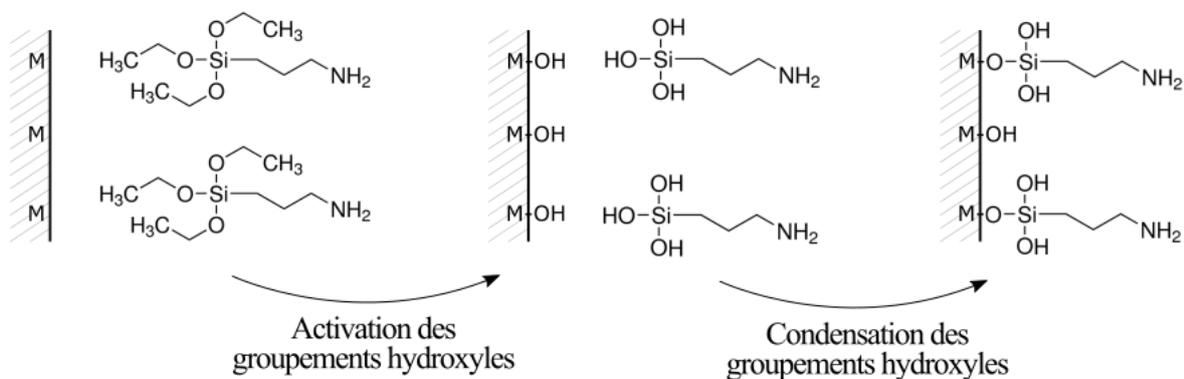
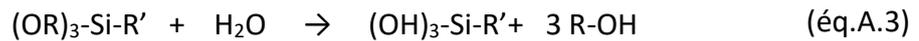


Figure A.21. Processus de fonctionnalisation d'une surface par l'APTES.

Lors de la silanisation, l'agent de couplage est un organosilane de formule générale $\text{Si}(\text{OR})_n \text{R}'_{(4-n)}$ ($n = 0, 1, 2$ ou 3), où $(\text{OR})_n$ désigne n groupement(s) hydrolysable(s), et R' un groupement fonctionnel non hydrolysable. Les organosilanes sont immobilisés via la formation de liaisons covalentes M-O-Si entre les groupements hydrolysés $(\text{OH})_{(4-n)}$ du silane et les groupements hydroxyles (M-OH) présents à la surface du matériau. La surface silanisée est alors recouverte des fonctions X (Figure A.21).

A.III.3.b. Mécanisme d'interaction

Lorsqu'un organosilane se trouve en milieu aqueux, il se produit en premier lieu une réaction d'hydrolyse. Si cette hydrolyse est complète, cela donne la réaction donnée dans l'équation éq. A.3. Les fonctions alcoxydes portées par l'organosilane forment alors des groupements silanols réactifs, en libérant des alcools R-OH .



L'hydrolyse est catalysée en milieu acide, basique ou nucléophile (Figure A.22), et conduit rapidement à l'homocondensation des organosilanes via les silanols.

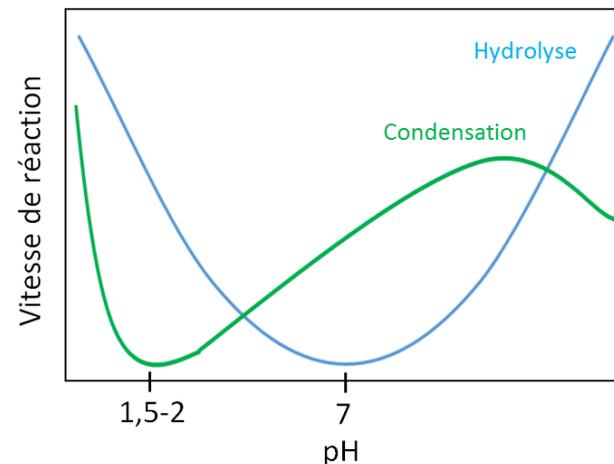
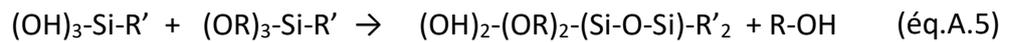
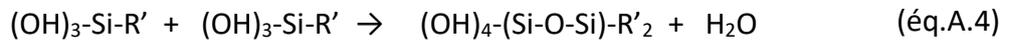
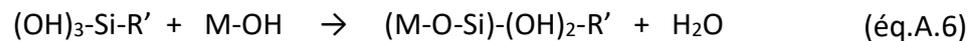


Figure A.22. Vitesse des réactions d'hydrolyse et de condensation en fonction du pH lors de la fonctionnalisation.

L'homocondensation en oligomères, voire en sol-gel, est favorisée par un grand nombre de groupements hydrolysables (OR)_n. Elle s'effectue soit par oxolation (éq. A.4) soit directement par alcoxolation (éq. A.5) :



En présence des groupements hydroxyles à la surface du substrat, l'hétéro-condensation permet également d'établir des liaisons covalentes entre l'organosilane et le substrat (éq. A.6). La silanisation conduit alors à la formation d'une (mono)couche de siloxanes fonctionnalisés avec R', groupement exploité pour la suite de la modification.



Si l'organosilane APTES est couramment utilisé, la modification préalable de cette molécule offre de nombreuses alternatives. Il est ainsi facile de paramétrer l'agent de greffage pour équilibrer les homocondensation et hétéro-condensation, pour choisir la fonction libre (R') après le couplage, ou pour offrir plus de flexibilité stérique.

A.III.3.c. La silanisation des Ge-Se-Te

Dans le cadre de cette thèse, les matériaux envisagés pour fabriquer des micro-capteurs optiques pour la détection précoce des maladies des plantes sont des couches minces du système ternaire Ge-Se-Te. A cet effet, différentes voies de fonctionnalisation de ces couches ont été testées, dont la silanisation. Les résultats seront présentés dans le chapitre C de ce manuscrit. En guise d'introduction au travail réalisé, nous nous intéressons dans ce paragraphe aux liaisons susceptibles de se former au cours de la silanisation de ces matériaux. Au sein du ternaire Ge-Se-Te, les liaisons covalentes les moins stables sont les liaisons Te-Te et Ge-Ge ($\approx 260 \text{ KJ.mol}^{-1}$), comme on peut le voir dans le Tableau A.6. Parmi les liaisons d'un des éléments constitutifs (Ge, Se ou Te) avec l'oxygène, c'est la liaison avec le Ge-O qui est par

ailleurs la plus stable (Tableau A.6). Il est donc à supposer que la silanisation des couches minces du système ternaire Ge-Se-Te se fera via la formation de liaisons covalentes Ge-O. Cette hypothèse est en accord avec les travaux d'Amalric et al concernant la silanisation des matériaux chalcogénures $\text{Ge}_{33}\text{As}_{12}\text{Se}_{55}$ et $\text{Ge}_{10}\text{As}_{40}\text{Se}_{50}$. La spectrométrie photoélectronique par rayons X a en effet démontré la présence de liaisons Ge-O mais pas de liaisons Se-O [Amalric2012][Amalric2012].

Liaison covalente	Energie de liaison KJ.mol ⁻¹ @ 298 K
Te-Te	257
Ge-Ge	264
Se-Te	293
Se-Se	330
Ge-Te	398
Ge-Se	485
Te-O	377
Se-O	430
Ge-O	658

Tableau A.6. Energie des liaisons possibles dans les couches minces chalcogénures du système ternaire Ge-Se-Te (haut du tableau) et énergie des liaisons des différents éléments des couches Ge-Se-Te avec l'oxygène (bas du tableau) [Luo2007].

A.III.4. La voie peptidique

A.III.4.a. Introduction

Un peptide est une courte séquence de 12 acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. On réserve le terme de polypeptide puis de protéine pour les séquences plus longues. Ces biomolécules sont naturellement présentes dans les organismes vivants. En 1901, Emil Fischer a été le premier à synthétiser un dipeptide en laboratoire. Aujourd'hui les peptides artificiels sont synthétisés à grande échelle.

Il n'existe pas de méthode prédictive pour connaître la séquence d'acides aminés qui aura une forte affinité pour une surface inorganique donnée. Il faut donc tester différentes séquences. La sélection d'une séquence peptidique donnée est réalisée par une méthode appelée « phage display » en anglais. Cette technique, d'abord utilisée pour étudier les interactions protéine-protéine, permet en effet de déceler des affinités peptide-substrat.

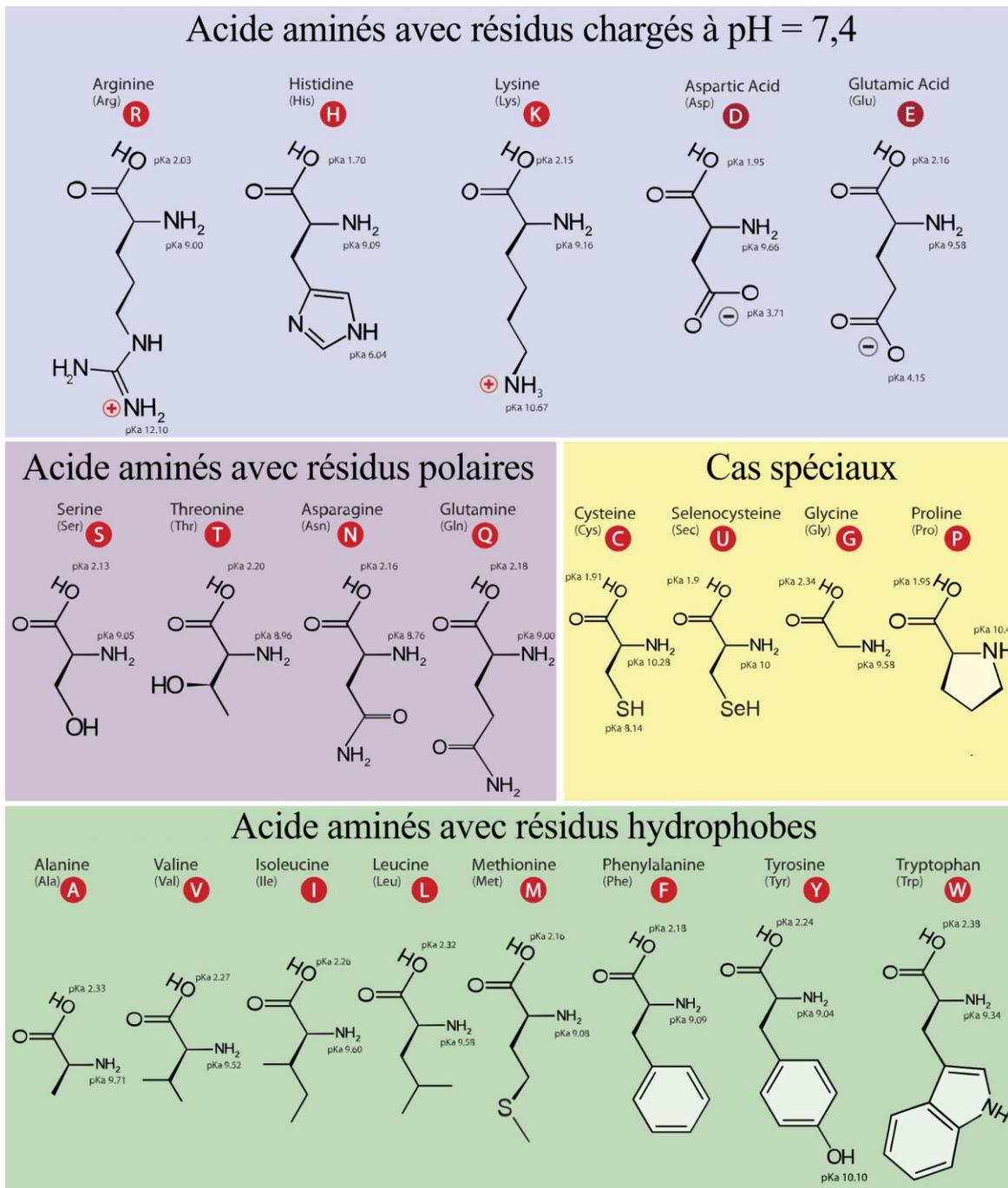


Figure A.23. Liste des 21 acides aminés à partir desquels sont construits les peptides [Dancojocari2010].

Cette méthode de « phage display » consiste à présenter sur une surface cible une collection de différents couples phage-peptide. Les peptides qui présentent le plus d'affinité envers le substrat (ou surface cible) seront davantage retenus lors du rinçage, ceci avec leurs phages respectifs. Les phages correspondants sont alors infectés dans une bactérie (*Escherichia coli*),

permettant leur amplification et la constitution d'une nouvelle collection de couples phage-peptide. Après plusieurs cycles, ne restent que les peptides présentant la plus grande affinité parmi la collection testée. De cette méthode de sélection, seuls les 21 acides aminés protéinogènes, présentés sur la Figure A.23, peuvent être utilisés pour la construction des séquences peptidiques.

En 1992, une première séquence (RRTVKHHVN) est identifiée pour son affinité avec l'oxyde de fer [Brown1992]. Il est à noter que les peptides « reconnaissent » une surface donnée et s'adsorbent spécifiquement [Estephan2011a], ce qui rend la voie peptidique très attractive comparée à la silanisation par exemple, qui est quant à elle non sélective. La Figure A.24 est un bon exemple de mise en évidence de la sélectivité de la voie peptidique. Seuls les motifs de GaN créés sur un substrat en silice ont en effet été fonctionnalisés par un peptide de séquence SVSVGMKPSRP.

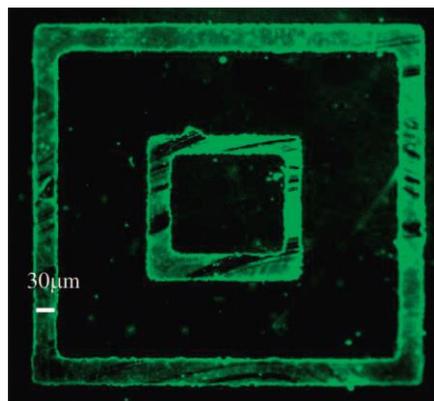


Figure A.24. Image de microscopie à fluorescence d'une surface en silice avec un motif en nitrure de gallium. Le peptide SVSVGMKPSRP, repérable grâce à un marqueur fluorescent en bout de chaîne a été adsorbé préférentiellement sur le GaN [Estephan2008].

A.III.4.b. Mécanisme d'interaction

L'interaction peptide-surface consiste en un ensemble de liaisons faibles dont la force résultante peut avoisiner celle d'une liaison forte [Saab2010]. Le mécanisme d'interaction peptide-surface n'est pas encore parfaitement établi dans la littérature, et diverge selon les couples peptide-surface. Cette interaction se construit à plusieurs échelles : du résidu de l'acide aminé jusqu'à la flexibilité de la chaîne peptidique [Ramakrishnan2014]. Par exemple le tryptophane (W) et la méthionine (M) présentent une affinité particulière pour l'or

[Conri2015], tandis que d'autres rapportent l'importance des contraintes et libertés conformationnelles de la structure peptidique sur ce même matériau [Hnilova2008].

De toute évidence chaque acide aminé peut jouer un rôle de par son caractère acido-basique, hydrophile-hydrophobe, ou simplement par la présence de certains groupements ou atomes [Ramakrishnan2014][Ramakrishnan2015]. Mais finalement, les possibilités d'interaction sont contraintes ou favorisées par la flexibilité de la séquence. La conformation du peptide en solution et la conformation du peptide proche de la surface sont cruciales [Maity2015].

A.III.4.c Les peptides LLA & SVS

Dans le cadre de ce travail de thèse, deux peptides ont été sélectionnés pour fonctionnaliser les couches minces du système ternaire Ge-Se-Te : les peptides SVSVGMPKSPRP (noté SVS) et LLADTTHRPWT (noté LLA). Les résultats obtenus seront présentés dans le chapitre B de ce manuscrit. Dans ce paragraphe, nous justifions le choix de ces deux peptides pour notre étude. Des travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence que le peptide SVS présente une grande affinité pour plusieurs surfaces inorganiques : GaAs(100), GaN(001), ZnTe(100), GaAs(111), GaSb(100), CdSe(100), n⁺-Si, p⁺-Si [Estephan2009][Estephan2008][Papa2016], mais aussi pour de très nombreuses cibles organiques. De ce fait ce peptide peut être considéré comme un agent de couplage universel [Estephan2012]. Dans le cas où la sélectivité vis-à-vis de la surface n'est pas recherchée, cette séquence porte ainsi un grand intérêt.

En ce qui concerne le peptide LLA, il a été montré qu'il présentait une grande affinité pour le silicium n⁺-Si [Saab2010] mais également pour le ZnSe(100) [Estephan2009]. Le sélénium étant l'élément majoritaire des couches minces Ge-Se-Te utilisées dans le cadre de cette thèse, le peptide LLA nous est donc apparu comme prometteur.

A.IV. Positionnement du projet et objectifs de la thèse

Ce travail fait suite aux travaux réalisés à l'ICGM par Mai VU THI [VuThi2014] et Anis TALEB BENDIAB [TalebBendiab2020]. Dans le ternaire Ge-Se-Te, deux compositions ont pu être identifiées pour la conception des guides d'onde [VuThi2014]. En effet les couches minces de compositions Ge₂₅Se₅₅Te₂₀ et Ge₂₅Se₆₅Te₁₀ possèdent une large bande de transparence dans l'infrarouge, de 1 à 16 μm environ, et sont stables thermiquement, avec une température de

transition vitreuse T_g supérieure à 130 °C, et un ΔT (égal à la différence entre la température de cristallisation et la température de transition vitreuse) supérieur à 100 °C. Leurs indices de réfraction, estimés grâce à la méthode de Swanepoel [Swanepoel1983] à partir des courbes de transmission, valent respectivement $2,65 \pm 0,04$ et $2,55 \pm 0,04$ à la longueur d'onde $\lambda = 1,55 \mu\text{m}$. La différence d'indices de réfraction entre les deux couches est alors de l'ordre de $\Delta n = 0,10 \pm 0,08$, valeur utilisée lors des étapes de simulation ayant pour objectif d'optimiser les paramètres géométriques des guides d'onde [VuThi2014][TalebBendiab2020]. Une fois ces paramètres (épaisseurs des couches, profondeur de gravure, largeur des guides) optimisés, des guides d'onde ont été fabriqués. Dans le cadre de la thèse de Mai VU THI, différents guides ont été réalisés : des guides droits, des guides courbes et des guides spirales. Des jonctions Y et un interféromètre de Mach-Zehnder ont également été fabriqués, dont les réponses optiques se sont avérées satisfaisantes. Dans le cadre de la thèse d'Anis TALEB BENDIAB, des guides droits ont été réalisés avec un design légèrement différent (couches plus épaisses et profondeur de gravure plus importante). Ces guides d'onde ont ensuite été éprouvés vis-à-vis du dépôt de gouttelettes d'eau sur leur surface, l'eau devant avoir pour effet une diminution de l'intensité lumineuse en sortie du guide, via l'absorption d'une partie de l'onde évanescente. Les guides ont tout d'abord été testés à mono-longueur d'onde ($\lambda = 1,55\mu\text{m}$), de sorte à vérifier l'impact du dépôt sur le signal en sortie. Comme prévu, le dépôt de gouttelettes s'est traduit par une diminution de l'intensité lumineuse, attestant de l'existence d'interactions entre l'eau et une partie de l'onde évanescente. La diminution de l'intensité lumineuse a été d'autant plus importante que le volume et le nombre des gouttes étaient grands. Les guides ont ensuite été testés sur un banc spectrophotométrique, fonctionnant de 1,2 à 2 μm . Dans cette gamme de longueurs d'onde se situent deux bandes d'absorption caractéristiques de l'eau (1,445 et 1,99 μm) : l'objectif était donc d'observer ces bandes sur le spectre enregistré en sortie de guide. Et en effet les expériences ont permis de confirmer l'effet induit par le dépôt des gouttelettes, avec l'apparition des bandes d'absorption de l'eau sur le spectre en sortie de guide. Par contre, il n'a pas été possible d'obtenir une corrélation directe entre les spectres enregistrés en sortie de guide et le volume des gouttelettes déposées. Il a fallu, pour extraire l'information souhaitée, utiliser des outils d'analyse multivariée. Le jeu de données constitué des spectres enregistrés en sortie de guide a été traité par une analyse en composantes principales (ACP). Celle-ci a montré que 10,09 % des différences observées entre les spectres étaient liées à la taille des gouttelettes et que

85,72 % étaient liés à du bruit inhérent à la mesure. Un modèle de prédiction a ensuite été établi à partir du jeu de données afin d'estimer le volume des gouttelettes déposées à la surface du guide d'onde. Ce modèle a permis de remonter au volume des gouttelettes déposées à 0,36 μl près [TalebBendiab2018].

Dans le cadre de ce travail de thèse, l'objectif n'est plus d'éprouver les guides d'onde vis-à-vis du dépôt de gouttelettes d'eau mais vis-à-vis des spores des maladies des plantes. La difficulté réside essentiellement dans la recherche de la sélectivité : sélectivité de la détection des spores envers celle de poussières ou de pollen par exemple, et sélectivité de la détection entre des spores de différentes maladies des plantes. Pour essayer de proposer une sonde sélective, deux voies sont envisagées : les guides d'onde peuvent être fonctionnalisés de sorte à immobiliser préférentiellement les espèces recherchées, ou bien les spectres enregistrés en sortie de guide peuvent être traités par des techniques d'analyse multivariée pour discriminer les différentes sources de modification du signal.

Le travail très exploratoire de cette thèse va donc s'articuler autour de différents axes :

- la fonctionnalisation des couches minces chalcogénures. Différentes voies sont testées : la voie peptidique et la silanisation. Cet axe est décrit dans le chapitre B.
- la fonctionnalisation sélective des guides d'onde. Dans cet axe décrit dans le chapitre C, il s'agit d'appliquer les voies de fonctionnalisation décrites dans le chapitre B aux composants. Les composants sont constitués de plusieurs guides d'onde séparés par des espaces : l'idée est de fonctionnaliser seulement les zones utiles, pour que les spores se fixent préférentiellement sur les guides d'onde et non sur les zones situées entre les guides.
- la réponse des guides vis-à-vis du dépôt des spores (chapitre D). Ici il s'agit de s'assurer que les guides répondent bien à la présence de spores déposées à leur surface. Les guides testés sont des guides fabriqués selon le design optimisé par Anis TALEB BENDIAB. Ils ne sont pas fonctionnalisés. Une analyse multivariée sera nécessaire pour obtenir la réponse souhaitée.

CHAPITRE B

-

Fonctionnalisation des couches minces du ternaire Ge-Se-Te

Avant de nous intéresser à la fonctionnalisation des guides d'ondes, nous avons étudié la fonctionnalisation des couches minces chalcogénures Ge-Se-Te. Pour toutes les expériences décrites dans ce chapitre, les couches utilisées sont de composition nominale $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$: comme explicité dans le Chapitre A, c'est la composition retenue pour la couche de cœur de nos guides d'onde infrarouges. Ces couches ont été déposées par évaporation thermique sur des substrats en verre (silice). Les trois éléments constitutifs des couches, Ge, Se et Te, ont été chauffés indépendamment, le sélénium et le tellure par effet Joule et le germanium par bombardement électronique. Le procédé de dépôt détaillé est décrit dans la littérature [Vigreux2013][Vigreux2014]. Les couches minces obtenues sont peu rugueuses (rugosité de l'ordre de 0,5 nm) et relativement hydrophobes (angle de contact d'environ 85°). Leur composition effective a été systématiquement vérifiée dans le cadre de cette étude : elle est voisine de la composition nominale à 5 % atomique près.

Dans ce chapitre découpé en trois parties, nous allons d'abord résumer les expériences de fonctionnalisation des chalcogénures en vue de la capture spécifique d'une protéine (partie B.I). Pour ce faire, deux voies de fonctionnalisation ont été testées : la silanisation et la voie peptidique. Ensuite, l'étude bibliographique ayant établi que les spores adhèrent préférentiellement sur les surfaces plus hydrophobes, nous avons naturellement cherché à rendre ces mêmes chalcogénures plus hydrophobes, mais également plus hydrophiles pour comparaison (partie B.II). Enfin, pour aller plus loin, des expérimentations en XPS ont été effectuées sur les surfaces fonctionnalisées par différents organosilanes, avec pour objectif d'identifier la nature des liaisons formées avec les éléments de nos couches minces Ge-Se-Te. Cette étude fera l'objet de la dernière partie de ce chapitre (partie B.III).

B.I. Fonctionnalisation des couches Ge-Se-Te : Capture de la Streptavidine

B.I.1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre A, les organosilanes et les peptides sont de bons candidats pour la fonctionnalisation des matériaux chalcogénures. Ces précurseurs devraient permettre une bonne première accroche sur nos couches minces Ge-Se-Te. Les organotrialkoxysilanes (l'APTES en particulier dans le cadre de ce travail) devraient se fixer via la formation de liaisons covalentes Ge-O-Si (et/ou Te-O-Si), tandis que les peptides devraient

être immobilisés sur nos surfaces chalcogénures via de multiples interactions faibles (liaisons hydrogènes, de Van der Waals). Il est à noter que des tentatives de fonctionnalisation avec un disulfure, à savoir la cystamine dihydrochloride, ont également été réalisées. La littérature faisait en effet état de la formation de liaisons Se-S après irradiation UV de surfaces chalcogénures, grâce à la rupture des liaisons S-S [Amalric2011][Amalric2012]. Toutefois, nos tentatives n'ont pas donné de résultats suffisamment concluants et ne seront donc pas discutées.

Afin de valider les deux voies de fonctionnalisation des couches minces chalcogénures du système ternaire Ge-Se-Te, nous avons choisi de vérifier l'adsorption spécifique de biomolécules sur les surfaces fonctionnalisées. Pour cela, nous avons greffé à l'extrémité des molécules d'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) d'une part et des chaînes peptidiques d'autre part, la fonction biotine. La biotine (ou vitamine B₈) est une petite biomolécule de masse molaire égale à 244,3 g.mol⁻¹. Elle présente une très forte affinité pour la streptavidine, une protéine de 52,8 kDa qui présente quatre sites de liaisons possibles avec la biotine. Avec une constante de dissociation de l'ordre de 10⁻¹⁴ mol.l⁻¹, les liaisons entre la biotine et la streptavidine sont des liaisons non covalentes parmi les plus fortes rencontrées dans la nature. Si la mise en évidence d'une fonction biotine sur une surface peut être délicate, la présence d'une protéine de taille nanométrique l'est beaucoup moins [Neish2002]. Le couple biotine-streptavidine a donc déjà été largement utilisé pour démontrer l'efficacité d'une voie de fonctionnalisation [Haussling1991][Nerurkar1984][Gould1985].

Dans les paragraphes suivants, nous allons décrire les protocoles utilisés pour fonctionnaliser les couches minces chalcogénures Ge₂₅Se₅₅Te₂₀ avec l'APTES et avec les peptides SVS et LLA (introduits dans le paragraphe A.III.4). Ces protocoles incluent les étapes de biotinylation (c'est-à-dire de fixation covalente de la biotine à l'APTES et aux peptides) et d'introduction de la streptavidine. Les différentes étapes de la fonctionnalisation ont été suivies par différentes techniques : analyse de surface par microscopie à force atomique (AFM), analyse de l'angle de mouillage (WCA) et spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (TF-IR). Les principaux résultats seront explicités.

B.1.2. Protocoles de fonctionnalisation

Le protocole des deux voies de fonctionnalisation est résumé sur la Figure B.1. Les concentrations, temps d'incubation et autres paramètres des protocoles sont quant à eux détaillés en Annexe B.1. Dans ce paragraphe n'en sont données que les grandes lignes.

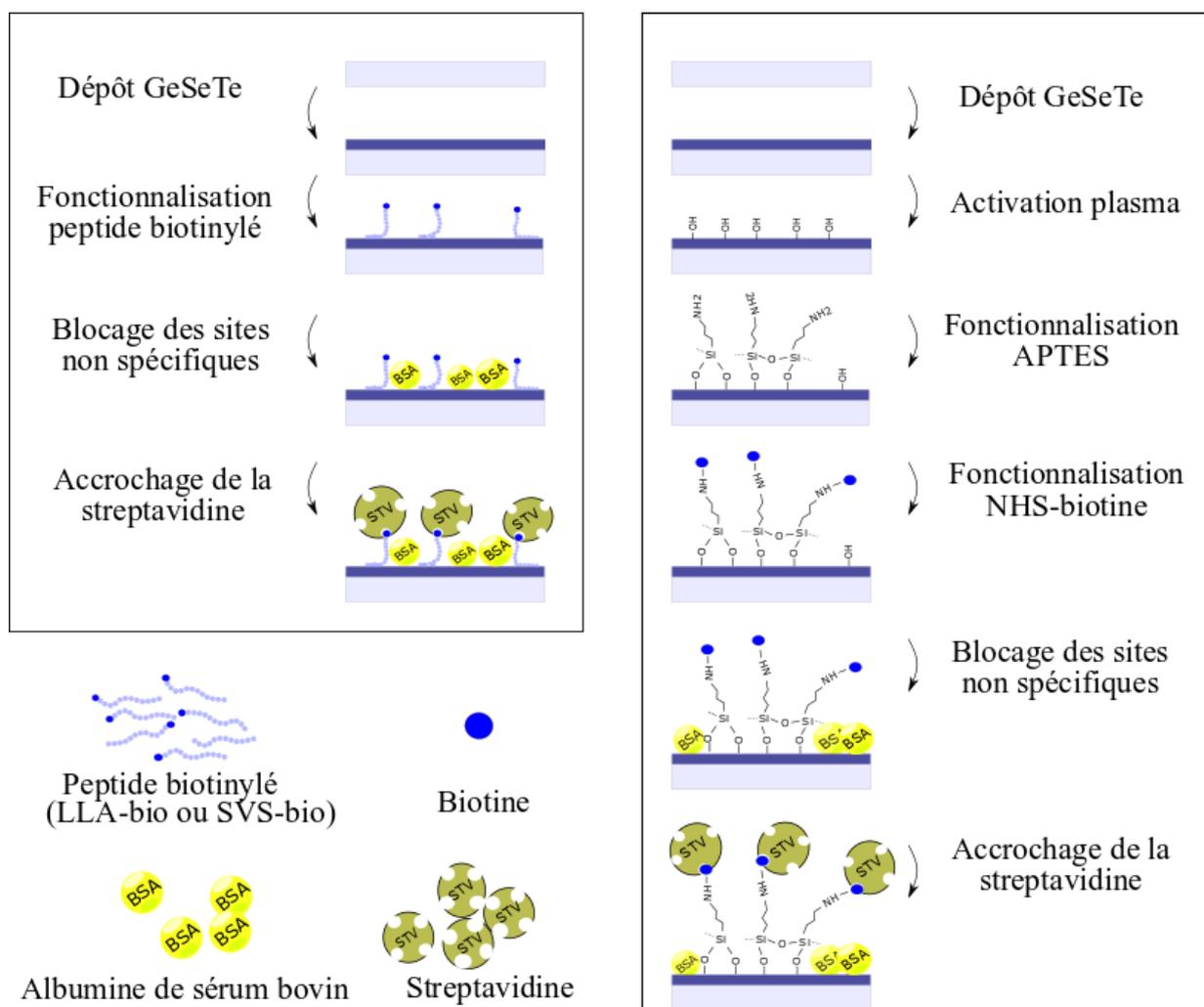


Figure B.1. Schémas récapitulatifs des deux voies de fonctionnalisation utilisées : voie peptidique en haut à gauche et silanisation à droite.

La silanisation requiert la présence de groupements hydroxyles sur la surface. Les couches minces Ge₂₅Se₅₅Te₂₀ doivent donc en premier lieu subir une activation par plasma oxygène. Ensuite, une solution acide d'APTES est déposée par drop-casting (dépôt de goutte) sur les surfaces activées par plasma. Cette étape permet d'introduire des groupements amines NH₂ à

la surface des couches chalcogénures. Comme explicité en introduction, nous avons ensuite choisi de greffer la fonction biotine à l'extrémité des fonctions aminées. Après séchage et rinçage, la surface a donc été incubée avec une solution de NHS-biotine, qui se greffe de façon covalente sur la fonction amine. Ce protocole de fonctionnalisation s'est déjà montré concluant sur d'autres surfaces non chalcogénures [Lapin2009].

En ce qui concerne la voie peptidique, les précurseurs que nous nous sommes procurés (LLA et SVS) ont été préalablement biotinylés. La fonction biotine a été ajoutée de façon covalente sur la terminaison C des peptides. Une seule étape d'incubation a donc été nécessaire pour obtenir des surfaces chalcogénures fonctionnalisées par les peptides, avec la fonction biotine en bout de chaîne, libre et accessible pour l'étape suivante.

Après obtention des surfaces fonctionnalisées et biotinylées, nous avons introduit une première protéine, l'albumine de sérum bovin (ou BSA pour *bovine serum albumin* en anglais). Cette protéine est utilisée pour bloquer les sites d'absorption non spécifiques éventuels [Jeyachandran2010]. Ce n'est qu'après cette étape que nous avons introduit la streptavidine : celle-ci peut alors se lier à toutes les fonctions biotines libres présentes à la surface des couches chalcogénures fonctionnalisées.

B.1.3. Suivi par analyse des images AFM

B.1.3.a. AFM et paramètres de mesure

La microscopie à force atomique (ou AFM pour *Atomic Force Microscopy* en anglais) est une technique d'analyse et d'imagerie de surface révélant des contrastes topographiques, visco-élastiques ou chimiques à l'échelle nanométrique. La mesure est basée sur l'interaction localisée d'une pointe effilée qui balaie la surface étudiée. Les pointes utilisées dans notre étude sont des pointes OMCL-AC240TS de chez Olympus ; elles permettent une analyse de la surface en mode résonant (ou *tapping*). Des photographies de la structure en levier et de la pointe sont présentées sur la Figure B.2. L'extrémité de la pointe, en interaction avec nos surfaces, est assimilable à une demi-sphère en silicium de 7 nm de rayon. La spécification détaillée de ces pointes est en Annexe B.2.

Pour notre étude, toutes les images des surfaces ont été digitalisées sur 512 x 216 pixels, avec une vitesse de balayage d'une ligne par seconde. Les spécifications des paramètres de mesure

sont données en Annexe B.2. Typiquement, pour chaque surface étudiée, trois jeux de trois images ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$, $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ et $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$) ont été enregistrés sur trois spots différents.

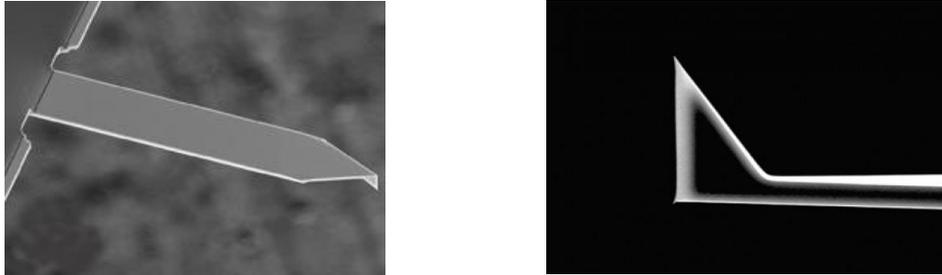


Figure B.2. Illustrations de la pointe AFM OMCL-AC240TS utilisée pour nos analyses en microscopie à force atomique.

Un traitement des images AFM a ensuite été utilisé pour corriger l'aplanissement, supprimer les lignes imparfaites et les bruits aux fréquences propres. Les images topographiques et de phase nous ont permis de suivre les changements d'état de surface entre les différentes étapes de fonctionnalisation.

B.1.3.b. Topographies, rugosités et tailles des particules

Les images AFM $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$, enregistrées juste après dépôt des couches $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$, après leur biotinylation, et après incubation avec les protéines BSA et la streptavidine, sont présentées sur les Figures B.3, B.4 et B.5, pour les trois précurseurs LLA, SVS et APTES, respectivement. Pour alléger ce chapitre, les images $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ correspondantes sont présentées en Annexe B.3. Grâce à un logiciel de traitement d'images, les rugosités ont pu être extraites et la géométrie des particules visibles sur les images ont pu être analysées. Les rugosités extraites des images $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ont été moyennées et leurs valeurs sont représentées sur la Figure B.6.

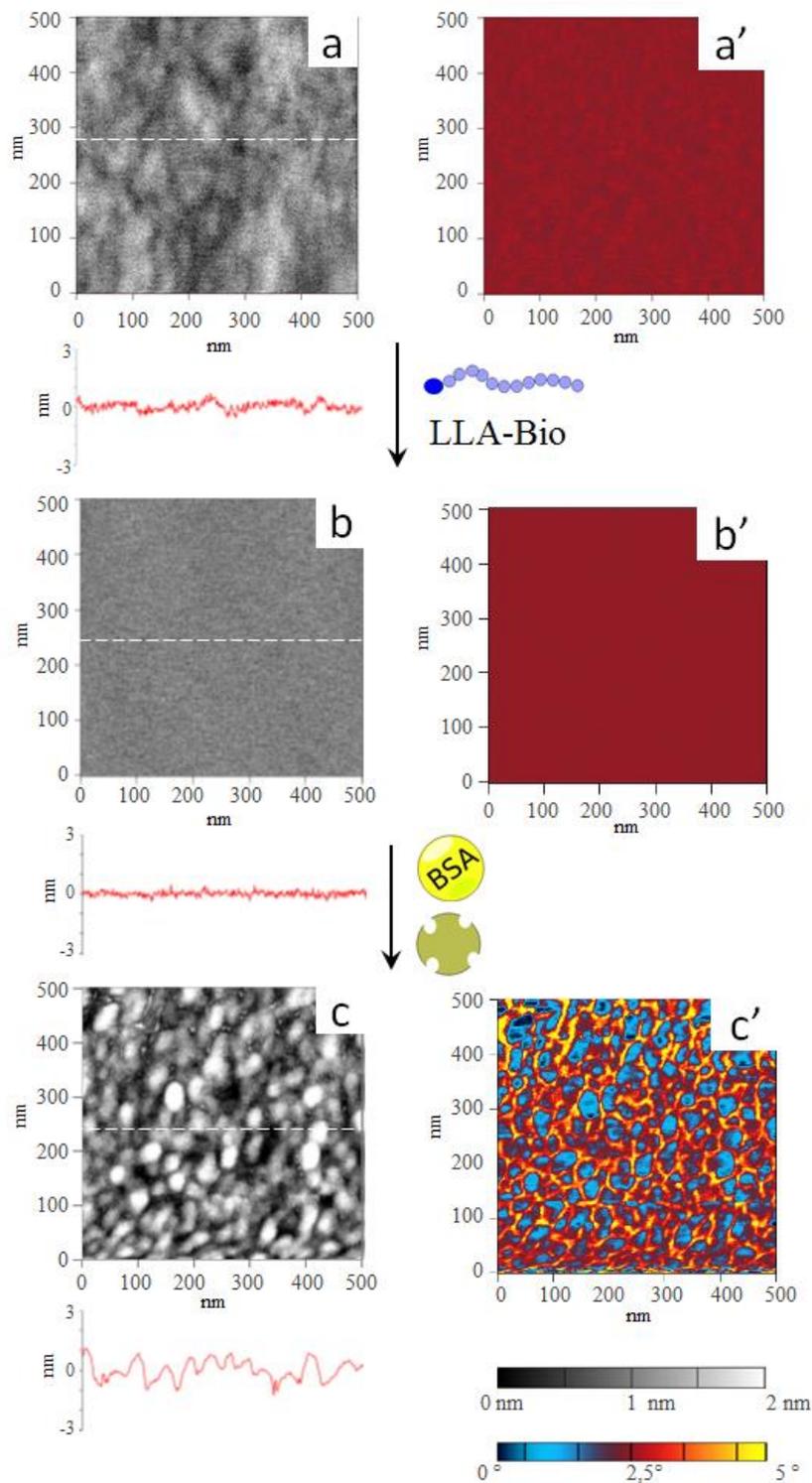


Figure B.3. Images de la topographie ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$) et profils de la surface d'une couche $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$: (a) juste après dépôt, (b) après incubation avec le peptide LLA biotinyllé, et (c) après incubation avec le BSA et la streptavidine. Les images de phase correspondantes sont respectivement annotées (a'), (b') et (c').

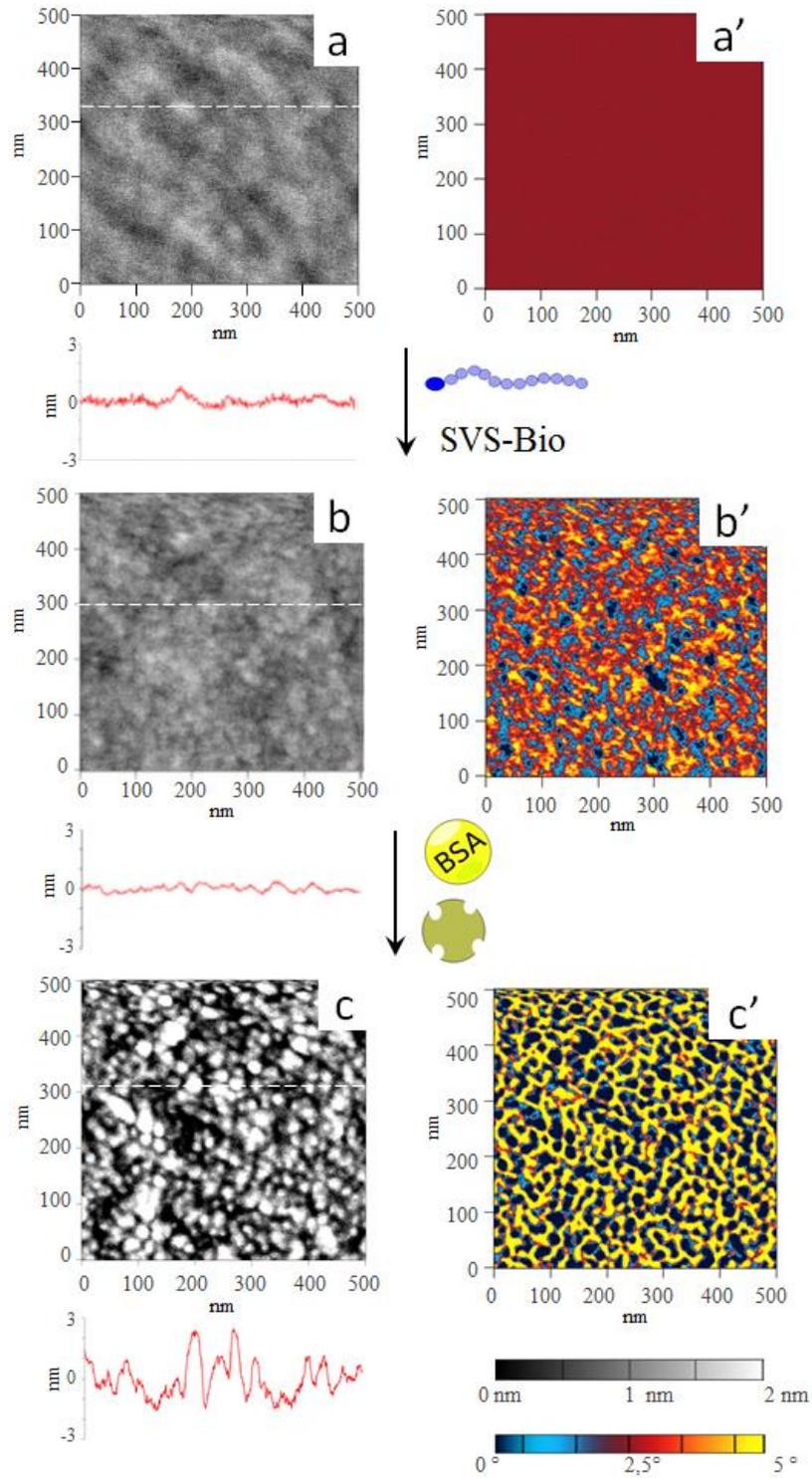


Figure B.4. Images de la topographie ($0,5 \times 0,5 \mu m^2$) et profils de la surface d'une couche $Ge_{25}Se_{55}Te_{20}$: (a) juste après dépôt, (b) après incubation avec le peptide SVS biotinyllé, et (c) après incubation avec le BSA et la streptavidine. Les images de phase correspondantes sont respectivement annotées (a'), (b') et (c').

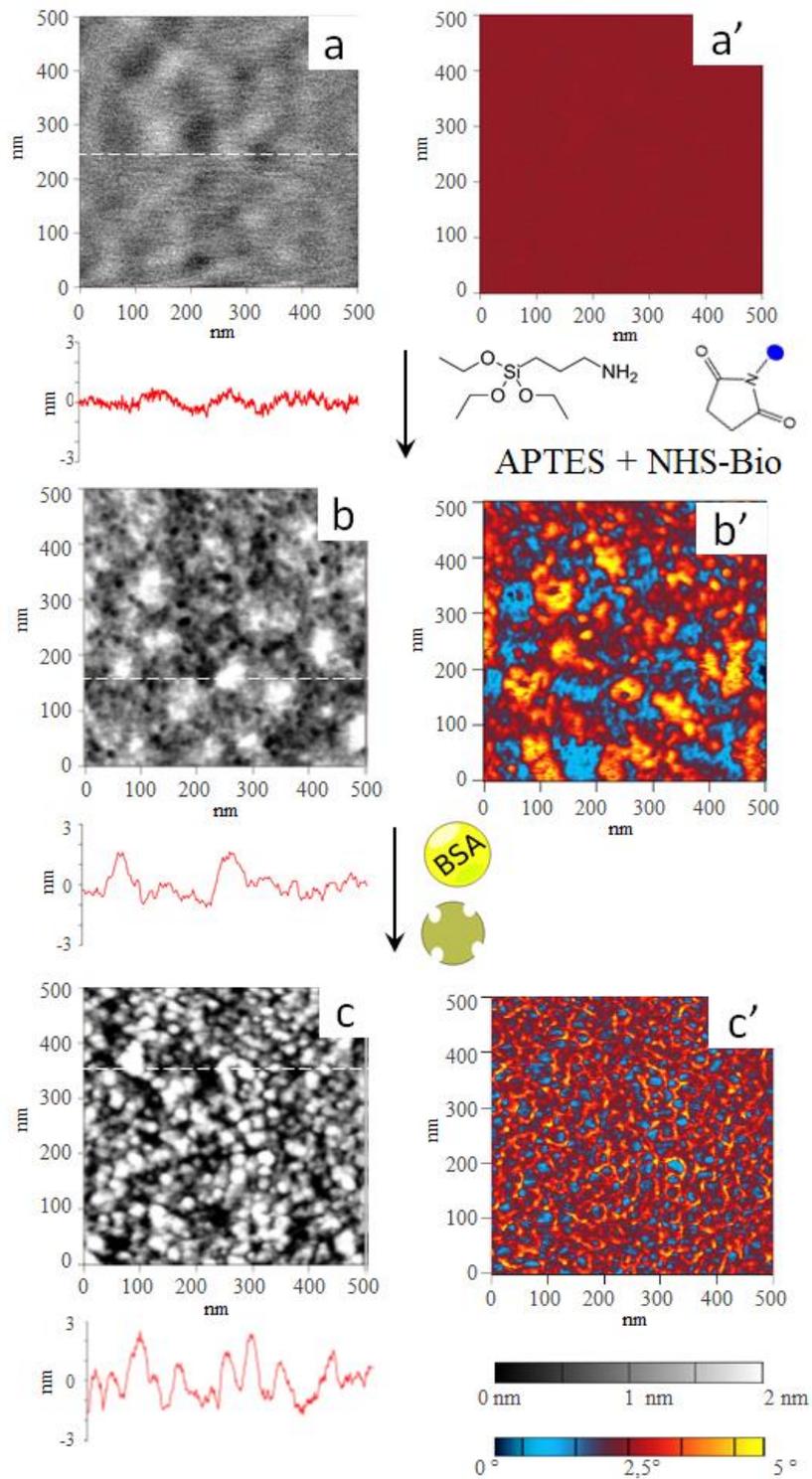


Figure B.5. Images de la topographie ($0,5 \times 0,5 \mu m^2$) et profils de la surface d'une couche $Ge_{25}Se_{55}Te_{20}$: (a) juste après dépôt, (b) après incubation avec l'APTES biotinylé, et (c) après incubation avec le BSA et la streptavidine. Les images de phase correspondantes sont respectivement annotées (a'), (b') et (c').

En comparant les images (a) et (b) des Figures B.3, B.4 et B.5, on constate que la fonctionnalisation avec les trois précurseurs biotinylés provoque un changement dans la topographie et les propriétés physico-chimiques des surfaces. Ces modifications suggèrent l'accrochage des précurseurs à la surface de la couche chalcogénure. La surface fonctionnalisée avec le peptide LLA biotinylé présente un aspect très homogène (Figure B.3.b), tandis que de nouvelles aspérités et agrégats sont visibles sur les surfaces fonctionnalisées avec le peptide SVS biotinylé et l'APTES biotinylé (Figure B.4.b et Figure B.5.b, respectivement). Ces aspérités provoquent naturellement l'augmentation de la rugosité de ces deux surfaces : comme on peut le voir sur la Figure B.6, la rugosité augmente de 0,30 à 0,39 nm après fonctionnalisation avec le peptide SVS biotinylé et de 0,44 à 0,60 nm après fonctionnalisation avec l'APTES biotinylé.

Pour ces deux précurseurs, les images de phase (Figures B.4.b' et B.5.b') mettent par ailleurs en évidence de nouveaux contrastes des propriétés physico-chimiques de la surface, suggérant également l'immobilisation effective des précurseurs. Les agrégats visibles sur les surfaces fonctionnalisées avec l'APTES biotinylé laissent supposer une légère homocondensation des précurseurs organosilanes. En effet, les précurseurs ne forment plus une monocouche homogène, car certains se condensent en oligomères de quelques nanomètres de hauteur.

Après le blocage des sites d'adsorption non spécifiques par les protéines BSA puis la capture de la streptavidine, les surfaces sont recouvertes de nouvelles particules régulières, et ce quel que soit le précurseur (Figure B.3.c, Figure B.4.c et Figure B.5.c). Ces nouvelles particules, vraisemblablement les protéines, font considérablement augmenter la rugosité de la surface (Figure B.6). La taille de ces particules est d'une dizaine de nanomètres pour un ou deux nanomètres de haut. Ces dimensions sont tout à fait cohérentes avec le balayage d'une pointe d'un rayon de 7 nm sur une surface recouverte de protéines plus ou moins sphériques, adsorbées sur la surface biotinylée. D'autres études d'adsorption de protéines ont en effet fait état de ces mêmes dimensions [Riepl2002][Weisenhorn1992].

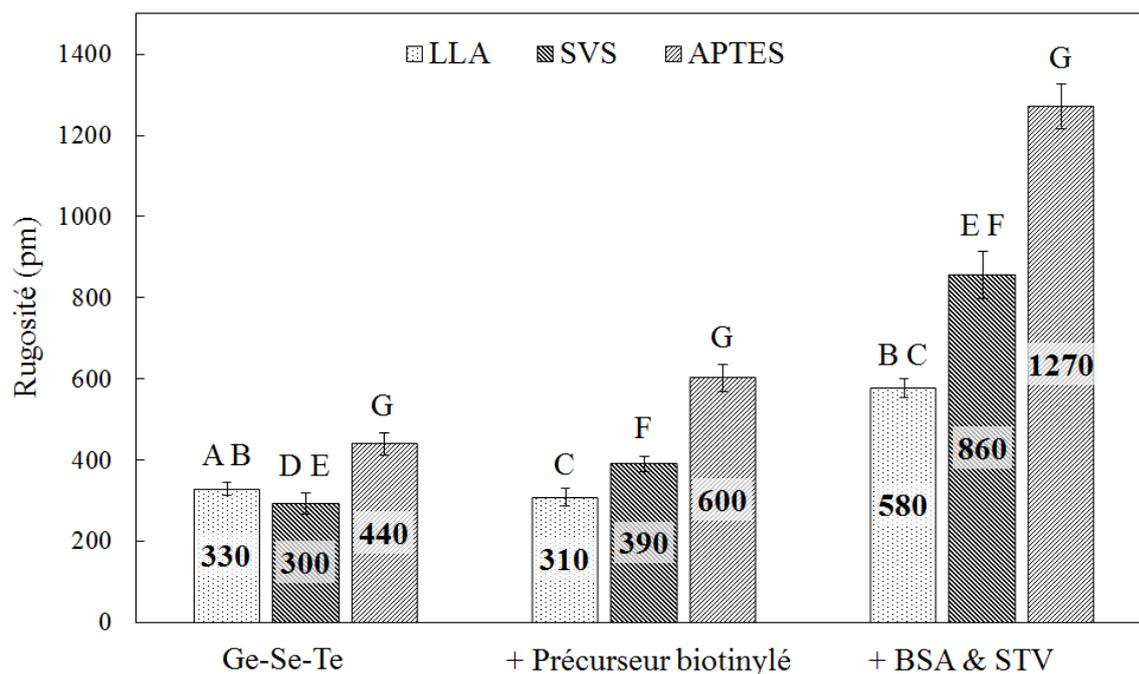


Figure B.6. Rugosités (moyennes quadratiques) des couches minces $Ge_{25}Se_{55}Te_{20}$ avant et après incubation avec les précurseurs biotinylés, et après incubation avec le BSA et la STV. Les données représentent la moyenne et la déviation standard calculée sur 3 images topographiques ($2 \times 2 \mu m^2$). Des lettres identiques indiquent des rugosités significativement différentes (probabilité $p < 0,05$ selon le test t [West2021])

Au vu des images topographiques et de phase, ces protéines semblent être plus étalées sur la surface fonctionnalisée par le peptide LLA biotinylé. L'analyse des dimensions de ces protéines a permis d'obtenir des données quantitatives, avec notamment la densité, le diamètre équivalent, la hauteur et la circularité de ces particules. Ces caractéristiques sont résumées sur la Figure B.7.

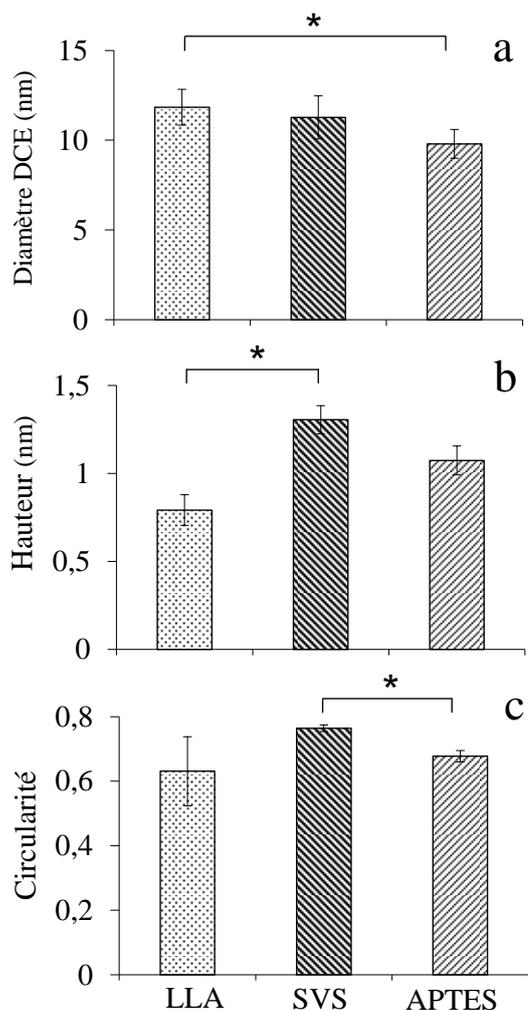


Figure B.7. Diamètres du cercle équivalent (DCE), (b) hauteur et (c) circularité des particules visibles sur les images AFM après incubation avec les protéines BSA puis STV. Les données représentent la moyenne et la déviation standard calculées sur 3 images topographiques $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$. (* distribution différente, probabilité $p < 0,05$ selon le test t [West2021])

Les densités des protéines sur les surfaces fonctionnalisées par les précurseurs LLA-biotine, SVS-biotine et APTES + NHS-biotine sont respectivement de 890, 1320 et 1400 particules par micromètre carré. La plus faible densité de protéines constatée dans le cas de la fonctionnalisation via le peptide LLA biotinylé peut s'expliquer par la plus faible densité initiale de fonctions biotines à la surface, mais également par un important accrochage non spécifique du BSA. En effet une adsorption non spécifique s'accompagne d'une déformation structurelle plus importante de la protéine [Bouhekk2012][Roach2005][Taborelli1995]. Comme on peut le voir sur la Figure B.7.a, les diamètres du cercle équivalent pour les surfaces Ge-Se-Te fonctionnalisées via les peptides LLA et SVS et via l'organosilane APTES sont

respectivement de 12,6 ; 10,5 et 9,3 nm. Les diamètres plus faibles observés dans le cas des fonctionnalisations via le peptide SVS et l'APTES, ainsi que les hauteurs plus importantes (Figure B.7.b) suggèrent une meilleure conservation de la structure de la protéine. Toujours dans le cas de ces deux précurseurs, la très faible disparité de la circularité (Figure B.7.c) suppose également une meilleure préservation de la structure. Dans le cas du LLA, les protéines adsorbées à la surface sont effectivement plus étalées, suggérant encore une fois un accrochage partiellement non spécifique.

Les analyses par microscopie à force atomique ont donc mis en évidence les modifications survenant sur les surfaces des couches minces $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$ après fonctionnalisation avec des précurseurs biotinylés, et après la capture des protéines BSA puis de la streptavidine. Les trois précurseurs s'accrochent effectivement à la surface des couches chalcogénures Ge-Se-Te. Dans le cas du peptide SVS et de l'organosilane APTES, les protéines fixées à la surface conservent mieux leurs structures sphériques, suggérant l'existence effective des liaisons spécifiques biotine-streptavidine [Gonzalez1997]. Dans le cas de la fonctionnalisation via le peptide LLA, les protéines semblent se fixer de manière non spécifique. On peut supposer qu'après adsorption du peptide biotinylé à la surface, les fonctions biotines ne sont pas accessibles, dû à un encombrement stérique trop important.

B.I.4. Suivi par analyse de l'angle de contact

B.I.4.a. Mesure de l'angle de contact

L'angle de contact est une méthode de caractérisation de la mouillabilité d'une surface qui reflète les interactions intermoléculaires s'établissant à l'interface liquide-surface. Très facile à mettre en place, elle permet d'évaluer quantitativement le caractère hydrophile-hydrophobe d'une surface à partir de l'angle que forme une goutte de liquide déposée sur celle-ci. Une surface hydrophile maximise le contact avec une goutte de liquide. La goutte s'étalant, l'angle est petit. A l'inverse, une surface hydrophobe minimise cette interface, et la goutte conserve une forme plus sphérique. L'angle est alors grand. Ainsi la mouillabilité peut être graduée sur une échelle allant de 0° - strictement hydrophile - à 180° - strictement hydrophobe. Pour

notre étude, nous avons utilisé un appareil SCA optical angle et son logiciel. Le liquide choisi est l'eau déminéralisée.

B.1.4.b. Résultats

Les angles de contact mesurés sur les couches chalcogénures juste après dépôt, après fonctionnalisation avec les précurseurs biotinylés et après incubation avec les protéines BSA puis STV sont présentés sur la Figure B.8. A titre de comparaison, les angles de contact mesurés sur les surfaces fonctionnalisées avec les mêmes précurseurs (LLA, SVS et APTES) non biotinylés sont également donnés. Dans le cas de la voie de fonctionnalisation par l'APTES, il est à noter que le traitement préliminaire de la surface Ge-Se-Te par le plasma oxygène provoque la chute de l'angle de contact, de $84 \pm 4^\circ$ à $7 \pm 5^\circ$. La surface est donc rendue extrêmement hydrophile, via la formation de groupements hydroxyles -OH.

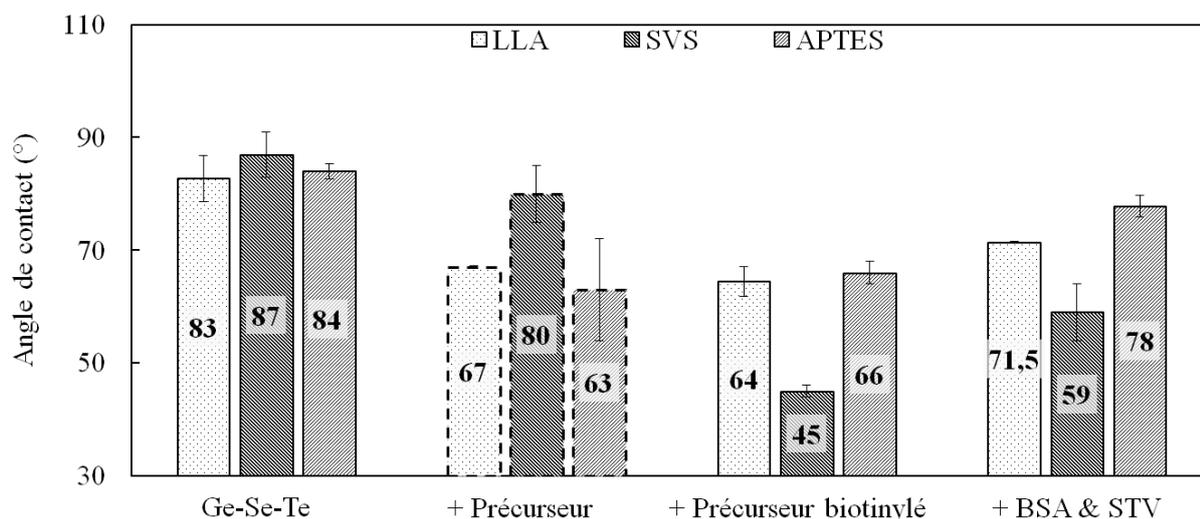


Figure B.8. Angles de contact mesurés sur les couches minces Ge-Se-Te juste après dépôt (à gauche), après incubation avec les précurseurs non biotinylés (en pointillés), après incubation avec les précurseurs biotinylés, et après incubation avec les protéines BSA et STV (à droite). Les valeurs sont des valeurs moyennes issues d'une dizaine de mesures. Les barres d'erreur indiquent la déviation standard correspondante.

Après incubation avec l'APTES non biotinylé, la surface reste relativement hydrophile ($63 \pm 9^\circ$), tout comme après incubation avec la NHS-biotine ($66 \pm 3^\circ$). Comme on peut le constater sur la Figure B.8, les deux précurseurs peptidiques non biotinylés rendent également la surface plus hydrophile, allant encore une fois dans le sens d'un accrochage effectif des chaînes d'acides aminés sur la surface chalcogénure. Leurs équivalents biotinylés rendent

aussi la surface plus hydrophile, et de façon accentuée dans le cas du peptide SVS. Il est à supposer que dans le cas de ce précurseur, la fonction biotine renouvelle le mécanisme d'adsorption et de conformation du peptide. Dans la littérature, les surfaces biotinyllées se sont révélées hydrophiles, avec des angles de contact autour de 35° [Rios2009]. Parmi les trois précurseurs biotinyllés utilisés, le peptide SVS semble être le plus pertinent, puisque c'est celui qui rend la surface la plus hydrophile, avec un angle de contact de $45 \pm 5^\circ$. Cette hypothèse est en accord avec les résultats AFM présentés dans les paragraphes précédents.

B.I.4.c. Pour aller plus loin : mécanisme d'interaction des peptides

Le mécanisme interactionnel des peptides sur une surface n'est pas trivial, et aucune étude antérieure ne fait état de la fonctionnalisation de surfaces amorphes par des peptides.

En vue d'appréhender le mécanisme d'adsorption des peptides sur nos couches minces chalcogénures, il est intéressant de comparer leurs caractéristiques physico-chimiques. Celles-ci sont regroupées dans le Tableau B.1. Il est également intéressant de comparer leur séquence d'acides aminés, avec les caractères hydrophobe ou hydrophile de chacun d'entre eux (Figure B.9). Selon les valeurs de l'indice d'instabilité (II) et de l'indice aliphatique (AI) données dans le Tableau B.1 et explicités dans la légende correspondante, le peptide SVS est plus stable que le peptide LLA. Les deux peptides présentent par ailleurs un caractère plus hydrophile qu'hydrophobe ($H < 0$). La séquence d'acides aminés en fin de chaînes, où les fonctions biotines sont greffées dans notre étude, est en effet hydrophile. En revanche, comme on peut le voir sur la Figure B.9, les débuts de chaîne peptidique sont hydrophobes. La chaîne de départ du peptide LLA (de séquence d'acides aminés LLADTTHRPW) comprend en effet deux leucines (L) et une alanine (A), tous deux contenant des groupes CH_3 . Le peptide SVS (de séquence SVSVGMPKSPRP) possède quant à lui deux acides aminés de type valine (V) conférant également un caractère hydrophobe en début de chaîne. Ces séquences hydrophobes de début de chaîne interagissent vraisemblablement avec la surface hydrophobe des couches minces Ge-Se-Te (interaction hydrophobe-hydrophobe, ce qui implique que les parties hydrophiles se situent sur le dessus de la surface modifiée). Ceci est cohérent avec les valeurs d'angles de contact présentés dans le paragraphe précédent (Figure B.8). En effet, après incubation avec les peptides non biotinyllés, on a observé l'obtention de couches plus hydrophiles. Les fonctions biotines étant greffées du côté hydrophile des chaînes peptidiques

LLA et SVS, on a donc confirmation qu'elles sont bien accessibles pour fixer la streptavidine lors des étapes ultérieures.

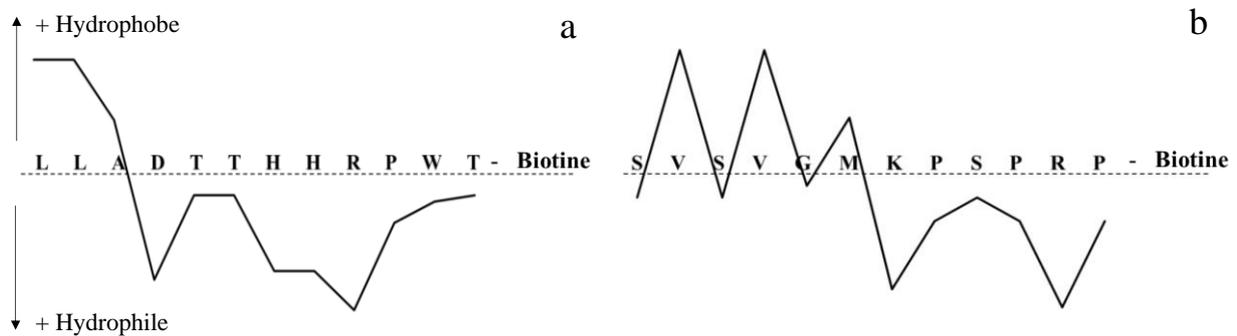


Figure B.9. Séquences des peptides LLA (a) et SVS (b) avec les caractères hydrophobes-hydrophiles de chaque acide aminé les constituant.

	LLADTTTHHRPWT	SVSVGMKPSRP
<i>pI</i>	11	6,92
<i>Charge</i>	2	+1, -1
<i>II</i>	58,24	- 9,31
<i>AI</i>	48,33	73,33
<i>H</i>	- 0,475	- 0,8

Tableau B.1. Propriétés physico-chimiques de ces deux séquences peptidiques LLA et SVS. « *pI* » correspond au point isoélectrique. C'est le pH (potentiel hydrogène) pour lequel la charge globale du peptide est nulle ou, autrement dit, le pH pour lequel le peptide est électriquement neutre. « *II* » correspond à l'indice d'instabilité d'un peptide. Pour les valeurs inférieures à 40, on considère que le peptide est stable, tandis que pour les valeurs supérieures à 40, le peptide est instable. « *AI* » correspond quant à lui à l'indice aliphatique et *H*, à l'hydropathicité. Les valeurs ont été calculées à l'aide de programmes de calcul disponibles à l'adresse <http://expasy.org>. « *H* » est calculé comme la somme des valeurs d'hydropathie selon Kyte et Doolittle (1982) de tous les acides aminés, divisée par le nombre de résidus dans la séquence. L'indice aliphatique « *AI* » a été calculé comme une mesure du volume relatif occupé par les chaînes latérales aliphatiques des acides aminés alanine, valine, leucine et isoleucine. Plus l'indice aliphatique est élevé, plus le peptide est thermostable.

B.I.5. Suivi par analyse de spectres FT-IR

B.I.5.a. Spectroscopie FT-IR

La spectroscopie FT-IR (Fourier Transformed InfraRed) révèle la présence de groupements chimiques grâce à l'identification des fréquences de vibration propres des liaisons covalentes et intermoléculaires. Nos couches minces chalcogénures se prêtent particulièrement bien à cette analyse spectroscopique car elles sont transparentes dans l'infrarouge, dans la gamme de longueurs d'onde allant de 1 à 16 μm environ. Dans notre étude, l'analyse a été réalisée en Réflectance Totale Atténuée (mode ATR) avec un cristal en diamant, sur la gamme 4000 cm^{-1} - 650 cm^{-1} , avec une résolution de 2 cm^{-1} . Ce mode d'analyse en réflexion permet de sonder uniquement la surface du matériau. Le champ évanescent en interaction effective avec la surface la pénètre sur une profondeur caractéristique de l'ordre du micromètre. Lorsque cela est nécessaire, le logiciel Origin Pro 8 est utilisé pour corriger la ligne de base, filtrer et déconvoluer le signal infrarouge.

B.I.5.b. Comparaison des spectres

Après fonctionnalisation avec les peptides LLA et SVS biotinylés ou avec l'APTES biotinylé, les spectres enregistrés sont difficilement exploitables et présentent peu voire aucune raie d'absorption significative, probablement dû aux très faibles épaisseurs d'adsorbats à la surface des couches chalcogénures.

Nous nous sommes donc concentrés sur les spectres enregistrés après incubation avec les protéines BSA et après incubation avec la streptavidine. Les spectres correspondants sont présentés sur la Figure B.10, et ce pour les trois voies de fonctionnalisation étudiées (voie peptidique avec LLA et SVS, et silanisation par l'APTES). Sur tous les spectres, on peut facilement identifier les élongations N-H et O-H vers 3500 cm^{-1} , l'élongation C-H vers 2900 cm^{-1} et 1450 cm^{-1} , ainsi que l'Amide I à 1650 cm^{-1} et l'amide II à 1550 cm^{-1} . La présence de ces groupements confirme la présence des protéines sur les couches chalcogénures fonctionnalisées, quelle que soit la voie utilisée. La surface fonctionnalisée avec l'organosilane présente des absorptions plus importantes des groupements alcanes, suggérant encore une fois une légère homocondensation de l'APTES.

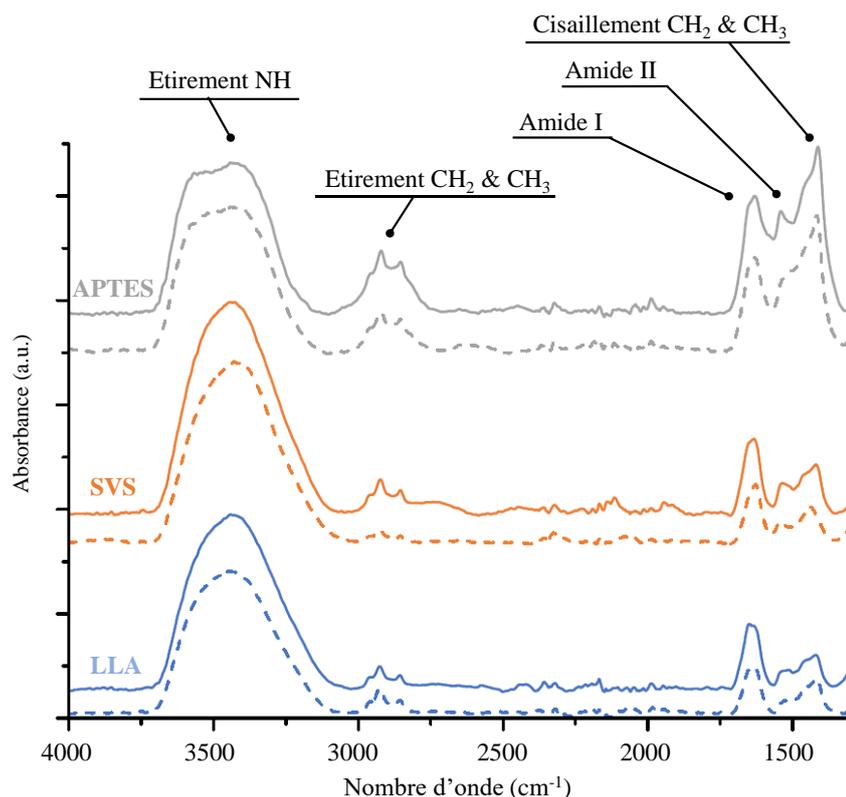


Figure B.10. Spectres FTIR-ATR des couches minces Ge-Se-Te fonctionnalisées avec les peptides ou l'APTES biotinylés, après incubation avec la protéine BSA (en pointillés) et après incubation avec la streptavidine STV (en traits continus).

Une comparaison entre les spectres obtenus après incubation avec les protéines BSA uniquement (en pointillés sur la Figure B.10), et les spectres obtenus après incubation avec les protéines BSA et la streptavidine (en traits continus sur la Figure B.10), montre une augmentation de la contribution de la bande de l'Amide I, ainsi que de l'amide II. En effet un calcul de l'aire sous la courbe entre 1700 et 1600 cm^{-1} montre qu'elle augmente de 18, 43 et 21% pour les précurseurs LLA, SVS et APTES, respectivement. Cette plus forte absorption indique que plus de protéines sont effectivement adsorbées à la surface. Les protéines BSA ayant bloqué tous les sites d'adsorption non spécifiques, la streptavidine s'est donc fixée aux fonctions biotines disponibles. Ce résultat suggère que les précurseurs permettent bien d'obtenir des fonctions biotines libres et accessibles. L'effet est plus prononcé avec le peptide SVS, ce qui conforte les tendances évoquées dans les paragraphes précédents.

B.I.5.c. Analyse de la bande Amide-1

La spectroscopie d'absorption infrarouge permet également de discriminer la conformation des protéines [Barth2007]. Effectivement, la structure secondaire des protéines peut s'organiser périodiquement de deux façons principales : des hélices α ou des feuillets β . Ces arrangements périodiques stabilisent la structure des protéines, via la formation de liaisons intermoléculaires, et se traduisent par des fréquences d'absorption légèrement décalées. Ainsi, la bande Amide I vers 1650 cm^{-1} est utilisée pour étudier la structure secondaire des protéines [Barth2007][Singh2000]. Les vibrations des hélices α sont identifiées à 1655 cm^{-1} , tandis que les structures en feuillets β sont identifiées grâce à une bande située à 1630 cm^{-1} et dans une moindre mesure grâce à une bande à 1685 cm^{-1} . Une autre structure moins significative, le coude β , est quant à lui identifié grâce à une bande située à 1670 cm^{-1} . Lors de l'adsorption non-spécifique de protéines sur une surface inerte, la structure est sujette à dénaturation. Ainsi, la structure secondaire, et donc les absorptions de l'Amide I, peuvent montrer des différences significatives [Bouhekka2012]. L'analyse fine des bandes de l'Amide I peut donc fournir des informations complémentaires.

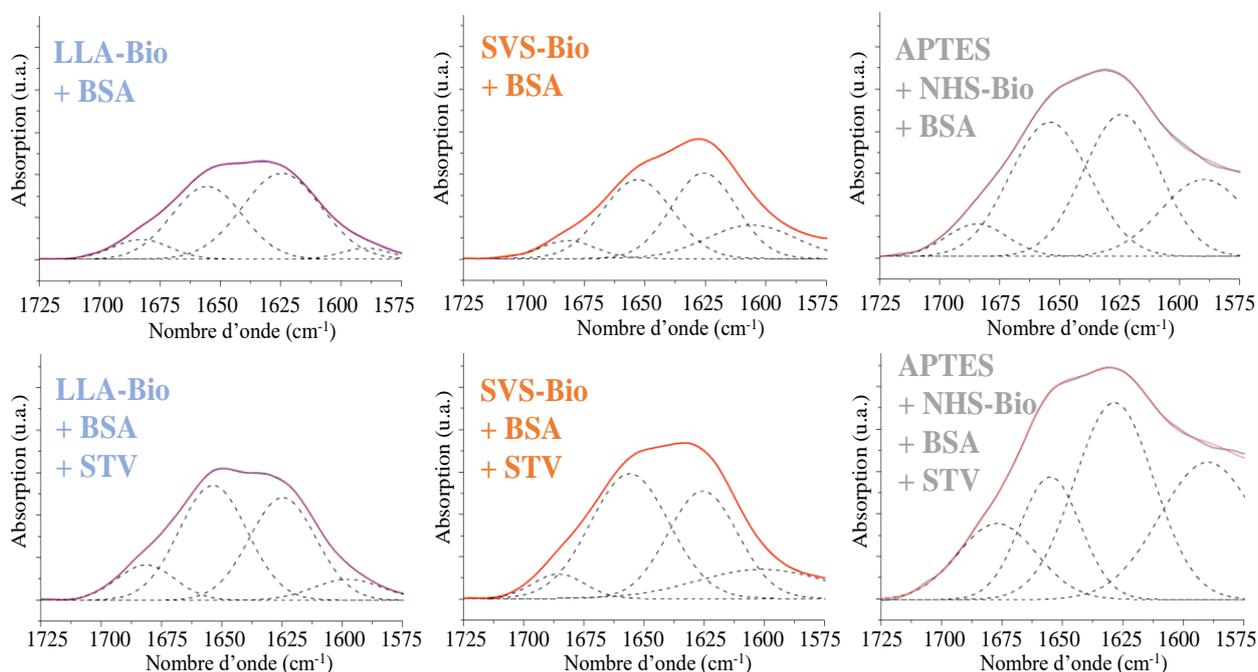


Figure B.11. Déconvolution des bandes d'absorption Amide I vers 1650 cm^{-1} : après incubation avec BSA (en haut) et après incubation avec STV (en bas).

Comme les bandes de l'Amide I observées sur les spectres présentés sur la Figure B.10 laissent supposer plusieurs contributions, nous avons procédé à leur déconvolution. Les résultats obtenus sont regroupés sur la Figure B.11, ainsi que dans les Tableaux B.2 et B.3. Dans ces tableaux, nos résultats sont par ailleurs comparés avec ceux trouvés dans la littérature.

		Coude β	Hélice α	Feuillet β	Feuillet β Intermol.	Autre
Littérature	Adsorbé sur TiO ₂ ^a	1680 cm ⁻¹ (10%)	1653 cm ⁻¹ (66%)	1632 cm ⁻¹ (22%)	1614 cm ⁻¹ (2%)	-
	Dans H ₂ O ^a	1680 cm ⁻¹ (9%)	1655 cm ⁻¹ (67%)	1632 cm ⁻¹ (23%)	1614 cm ⁻¹ (1%)	-
	Dans H ₂ O ^b	1684 cm ⁻¹ (4%)	1654 cm ⁻¹ (53%)	1625 & 1632 cm ⁻¹ (14%)	-	-
Notre étude	LLA	1683 cm ⁻¹ (10%)	1656 cm ⁻¹ (39%)	1625 cm ⁻¹ (51%)	-	1590 cm ⁻¹
	SVS	1682 cm ⁻¹ (11%)	1653 cm ⁻¹ (44%)	1626 cm ⁻¹ (45%)	-	1606 cm ⁻¹
	APTES	1685 cm ⁻¹ (11%)	1654 cm ⁻¹ (44%)	1624 cm ⁻¹ (44%)	-	1590 cm ⁻¹

Tableau B.2. Résultats issus des déconvolutions des bandes d'absorption Amide I après incubation avec la protéine BSA. ^a[Bouhekka2012], ^b[Abrosimova2016]

		Coude ou feuillet β	Hélice α ou désordonné	feuillet β	Autre
Littérature	Dans D ₂ O ^c	1673 cm ⁻¹	-	1637 cm ⁻¹	-
	Surface biotinylée ^d	~1695 cm ⁻¹	~1680 cm ⁻¹	1640 cm ⁻¹	-
	Surface biotinylée ^e	1689 cm ⁻¹	~1668 cm ⁻¹	1632 cm ⁻¹	-
Notre étude	LLA	1682 cm ⁻¹ (12%)	1654 cm ⁻¹ (47%)	1625 cm ⁻¹ (41%)	1598 cm ⁻¹
	SVS	1686 cm ⁻¹ (9%)	1656 cm ⁻¹ (52%)	1626 cm ⁻¹ (40%)	1601 cm ⁻¹
	APTES	1677 cm ⁻¹ (19%)	1655 cm ⁻¹ (28%)	1629 cm ⁻¹ (53%)	1590 cm ⁻¹

Tableau B.3. Résultats issus des déconvolutions des bandes d'absorption Amide I après incubation de la protéine STV. ^c[Jiang2008], ^d[Lapin2009], ^e[Krueger2018]

La déconvolution des bandes Amide I met bien en évidence la superposition de trois bandes vers 1685 cm⁻¹, 1655 cm⁻¹ et 1625 cm⁻¹, bandes correspondant aux structures secondaires des protéines. Pour pouvoir aller plus loin, les structures secondaires des deux protéines utilisées dans ce travail, l'albumine de sérum bovin (BSA) et la streptavidine (STV), sont illustrées sur la Figure B.12. On peut constater que la protéine BSA est majoritairement constituée d'hélices α , tandis que la streptavidine est majoritairement constituée de feuillets β .

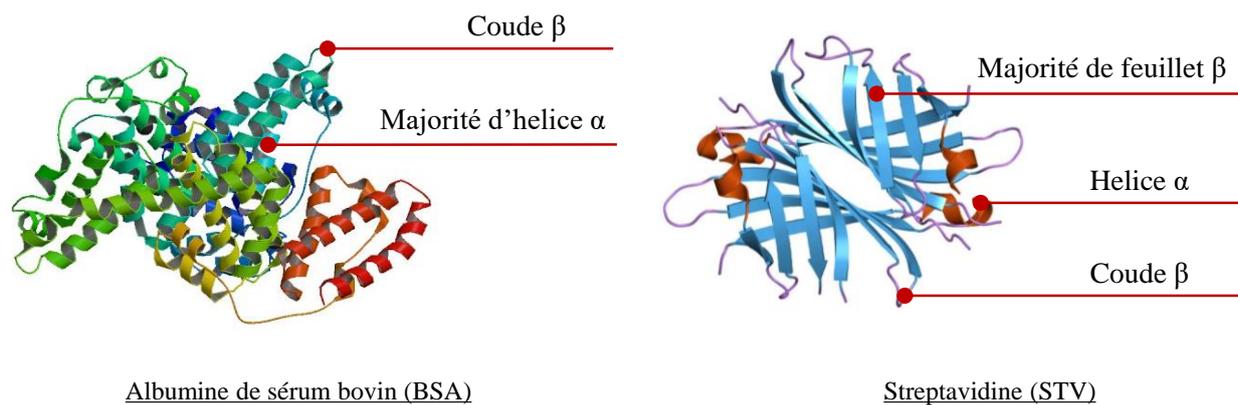


Figure B.12. Structures secondaires des protéines BSA et STV.

L'analyse des résultats donnés dans le Tableau B.2, concernant les contributions des différents arrangements après incubation avec la protéine BSA, permet de conclure qu'il y a une grande proportion de feuillets β , alors qu'ils sont normalement inexistant dans la structure de cette protéine. Ceci peut s'expliquer par la déformation des hélices α ou bien par la formation de structures intermoléculaires [Roach2005].

Après incubation avec la streptavidine, la déconvolution de la bande Amide I fait toujours apparaître les absorptions vers 1685 cm^{-1} , 1655 cm^{-1} et 1625 cm^{-1} correspondant aux structures secondaires de la protéine. Dans le cas des peptides, l'augmentation de la contribution des hélices alpha à 1655 cm^{-1} est en revanche contre-intuitive. Il est plus probable que cette contribution soit le fait d'une structure désordonnée, supposant une adsorption accompagnée d'une déstructuration de la streptavidine. La contribution des feuillets β à 1629 cm^{-1} est enfin plus importante dans le cas d'une fonctionnalisation avec l'APTES, suggérant une meilleure conservation de la structure de la streptavidine. Cela va dans le sens de la présence de fonctions biotines plus facilement accessibles sur la surface chalcogénure fonctionnalisée avec l'APTES qu'avec les peptides.

B.I.6. Bilan

Deux voies de fonctionnalisation des couches minces Ge-Se-Te ont été testées : la voie peptidique et la silanisation. Chaque précurseur (les peptides LLA et SVS et l'organosilane APTES) étant biotinylé en bout de chaîne, la capture spécifique de la streptavidine sur les fonctions biotine a permis de valider chacune des voies.

La mesure de l'angle de contact et l'analyse par AFM ont permis d'apprécier les changements survenant à l'extrême surface des couches lors de l'accroche des trois précurseurs biotinylés. Il a été montré que la surface devient globalement plus hydrophile, notamment avec le précurseur SVS, supposant une importante adsorption de la biotine. L'analyse des images AFM a mis en évidence que la silanisation avec le précurseur APTES conduit à la formation d'une surface plus rugueuse, avec des aspérités de plusieurs nanomètres, supposant ici un degré relatif d'homocondensation pendant la silanisation.

La présence et la conformation des protéines ont pu être étudiées par AFM et spectroscopie infrarouge. La streptavidine s'accroche à la surface grâce à la fonction biotine, et apparaît alors sur les images en topographie de l'AFM, sous forme de particules de diamètre équivalent de 10 nm, d'1 nm de haut et de circularité d'environ 0,7. La densité de protéines est plus importante avec les précurseurs SVS et APTES (environ $1400\mu\text{m}^{-2}$). La spectroscopie infrarouge révèle les changements conformationnels s'opérant pendant l'accrochage de la streptavidine. La structure secondaire de cette protéine est mieux conservée avec le précurseur APTES.

Des deux peptides, le SVS semble le plus apte à réaliser un premier accrochage sur la surface chalcogénure. Cette adsorption s'effectue grâce à de nombreuses interactions faibles, et laisse possible une régénération de la surface active du capteur, avec par exemple un rinçage avec un surfactant. Quant à la silanisation, le précurseur APTES s'accroche de façon covalente, et donc de façon plus stable, probablement à travers la formation de groupements Ge-O-Si ou Te-O-Si. Le paragraphe suivant permettra de le vérifier.

B.II. Silanisation des couches Ge-Se-Te : modification de la mouillabilité

L'étude bibliographique présentée dans le chapitre A a permis d'apporter de nombreuses informations sur les spores des champignons phytopathogènes. Plusieurs travaux ont notamment démontré que ces spores adhèrent préférentiellement sur des surfaces hydrophobes, à l'instar de la cuticule foliaire. Rendre les couches minces chalcogénures Ge-Se-Te plus hydrophobes peut donc être un levier pour augmenter la sensibilité des futurs micro-capteurs optiques. Nous avons donc cherché à rendre nos couches minces Ge-Se-Te plus hydrophobes. Et à titre de comparaison, nous avons également cherché à rendre nos couches plus hydrophiles.

Dans le premier paragraphe, nous allons présenter les précurseurs choisis (des organosilanes) et décrire les protocoles utilisés. Les organosilanes ont été préférés aux peptides du fait de leur versatilité et leur plus faible prix. Les paragraphes suivants seront dédiés à la présentation des principaux résultats obtenus.

B.II.1. Protocoles & méthodes

Deux précurseurs portant une chaîne hydrophobe ont tout d'abord été testés pour rendre les couches minces Ge-Se-Te plus hydrophobes : (i) l'octyl-triméthoxysilane (OTMS) qui porte une chaîne de 8 carbones et (ii) un organosilane perfluoré, le triéthoxy(1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-octyl)silane (TEOPF), qui porte le radical C_4F_9 . Au vu de l'hétérogénéité des surfaces après dépôt de ces deux précurseurs, l'ajout de Tétrahétoxy silane (TEOS) a rapidement été jugé nécessaire. Ce précurseur, qui joue le rôle de ciment, a donc été ajouté à l'OTMS et au TEOPF de sorte à obtenir un mélange à 50 % molaire de TEOS. Afin d'obtenir des surfaces avec des propriétés très différentes, et de pouvoir procéder à des comparaisons, il nous a par ailleurs semblé pertinent de chercher également à rendre nos couches minces Ge-Se-Te plus hydrophiles. Dans cet objectif, d'autres précurseurs ont été testés, comme le tétraéthoxysilane (TEOS), l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) ou le Phenyltriméthoxysilane (PhTMS). Les formules semi-développées de tous les précurseurs utilisés sont présentées dans la Figure B.13.

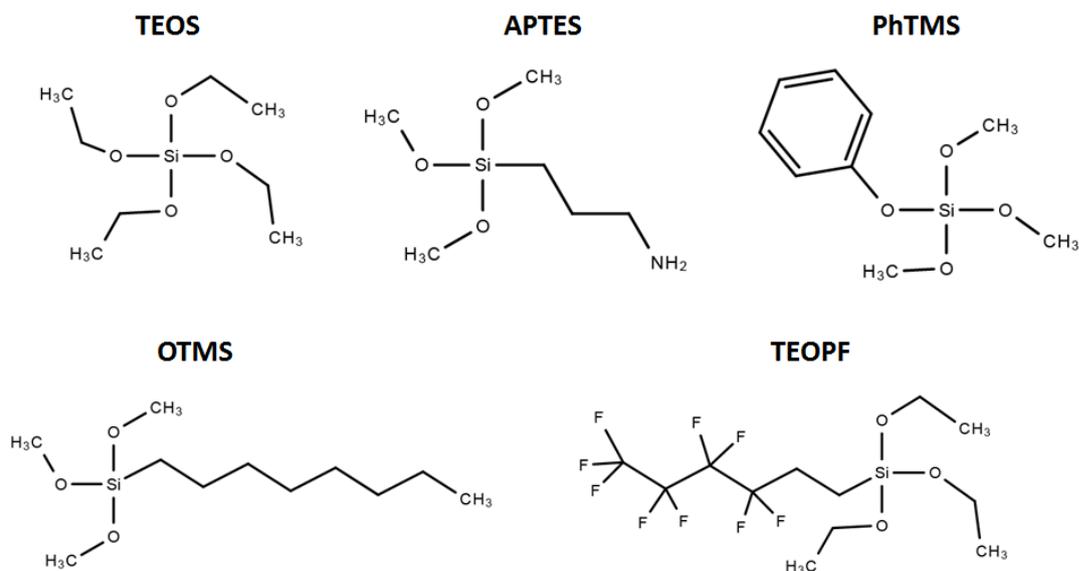


Figure B.13. Formules semi-développées des précurseurs utilisés.

Des solutions colloïdales contenant 0,5 % massique en précurseurs ont tout d'abord été préparées par dilution avec un mélange d'éthanol (80 % volumique) et d'acide chlorhydrique à pH 1,5 (20 % volumique). Le choix d'ajouter de l'acide chlorhydrique a été justifié par le fait qu'un milieu acide catalyse l'hydrolyse des siloxanes (voir Figure A.22), permettant ensuite leur condensation par évaporation.

Les couches minces Ge-Se-Te ont ensuite été activées par plasma en utilisant l'appareil Diener PicoPCCE. L'activation a été réalisée sous oxygène pendant 10 minutes à une pression de 0,6 mbar et une puissance de 120 W. Cette opération introduit des groupements hydroxydes à la surface de la couche. Les solutions colloïdales des différents précurseurs ont enfin été déposées par dip coating sur les surfaces activées avec une vitesse de retrait de 10 centimètres par minute. Le protocole correspondant est schématisé sur la Figure B.14. Après l'étape de dépôt, les couches ont été séchées à l'air pendant 1 heure puis à l'étuve à 80°C pendant 3 heures. Cet étuvage conditionne la condensation complète des groupements hydroxydes. Puis, afin de retirer toute trace d'adsorbats non liés, les surfaces ont été rincées à l'éthanol puis à l'eau distillée.

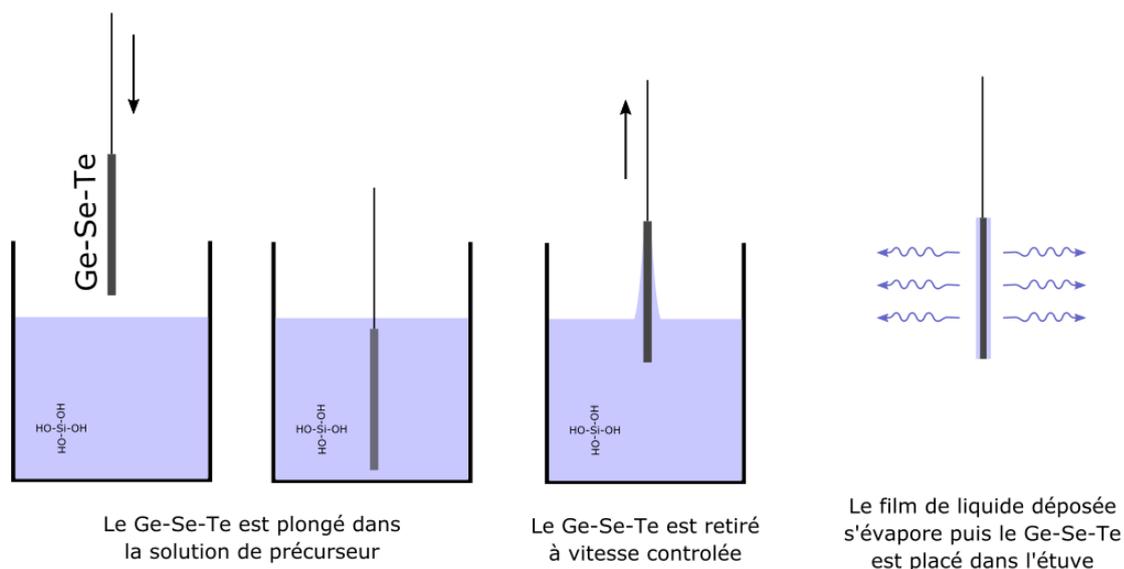


Figure B.14. Protocole utilisé (dip coating) pour fonctionnaliser les couches Ge-Se-Te.

B.II.2. Angle de contact

Une dizaine de gouttes d'eau déminéralisée de $1 \mu\text{l}$ ont été déposées sur chaque surface, donnant lieu à une valeur moyenne de l'angle de contact pour chaque surface fonctionnalisée.

La surface fonctionnalisée avec le précurseur TEOS présente la mouillabilité la plus importante, avec un angle de contact d'environ 50° (Figure B.15). Cette surface devient donc plus hydrophile grâce à l'apport de fonctions silanols (Si-OH). Cela étant, le précurseur TEOS n'apparait pas subir une hydrolyse complète. D'après la littérature, celle-ci devrait en effet conduire à des surfaces encore plus hydrophiles : 10° [Gomes1995], voire 8° [Yang2016]. La surface des couches chalcogénures fonctionnalisées avec le précurseur TEOS est probablement en partie recouverte de $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{Si}(\text{OH})_3$ ou $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{Si}(\text{OH})_2$.

La surface la plus hydrophobe est obtenue avec le mélange TEOS + OTMS, avec un angle de contact de 110° (Figure B.15). Cette surface est vraisemblablement recouverte de groupements alkyles CH_2 et CH_3 . Sur silice, cette chaîne carbonée a déjà permis d'obtenir des angles de contact de 97° [Purcar2014]. Une autre étude rapporte des angles de contact supérieurs à 160° avec le précurseur octyltriéthoxysilane (OTES) [Agbe2020]. Toutefois, l'hydrophobie rapportée est en partie amplifiée par la forte rugosité de la surface : $6,5 \mu\text{m}$.

La fonctionnalisation avec les trois autres précurseurs, l'APTES, le PhTMS et le mélange TEOS + TEOFP, modifie également la mouillabilité de la surface Ge-Se-Te, mais dans une moindre mesure

(Figure B.15). Les fonctions amines NH_2 et phényles rendent la surface légèrement plus hydrophile, tandis que l'ajout de la chaîne perfluorée rend la surface très légèrement plus hydrophobe. Dans le reste de l'étude sur la mouillabilité, ces trois précurseurs seront écartés.

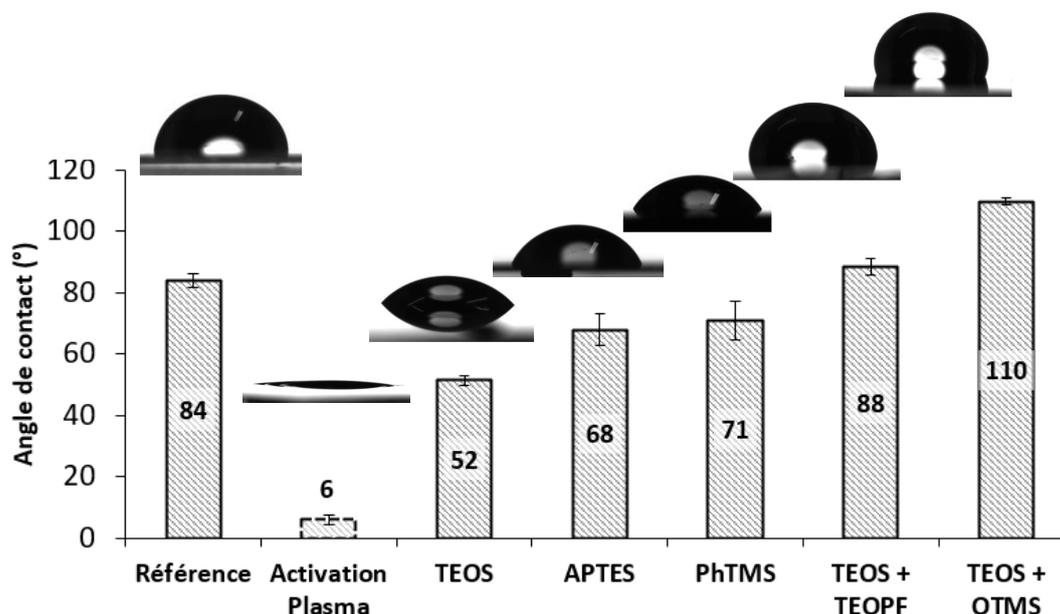


Figure B.15. En haut : profil des gouttes déposées sur les différentes surfaces. En bas : angles de contact correspondants.

B.II.3. Caractérisation AFM

Pour compléter cette étude sur la mouillabilité des surfaces Ge-Se-Te, les surfaces fonctionnalisées avec le précurseur TEOS et le mélange de précurseurs TEOS + OTMS ont été analysées par microscopie à force atomique. Les images de la topographie de ces surfaces sont présentées sur la Figure B.16. Ces images suggèrent une légère modification de la topographie. La surface modifiée avec le TEOS paraît plus homogène, avec effectivement une rugosité plus faible : $0,52 \pm 0,04$ nm contre $0,66 \pm 0,02$ nm pour la surface de départ. La surface modifiée avec le mélange TEOS + OTMS présente de nouvelles aspérités de quelques nanomètres de haut, avec une légère augmentation de la rugosité : $0,72 \pm 0,03$ nm. Cette augmentation est significative mais relative, et n'explique pas l'augmentation de l'hydrophobie de la surface. La fonctionnalisation avec le précurseur OTMS provoque donc une augmentation chimique de l'hydrophobie, via les nouveaux groupements alkyles.

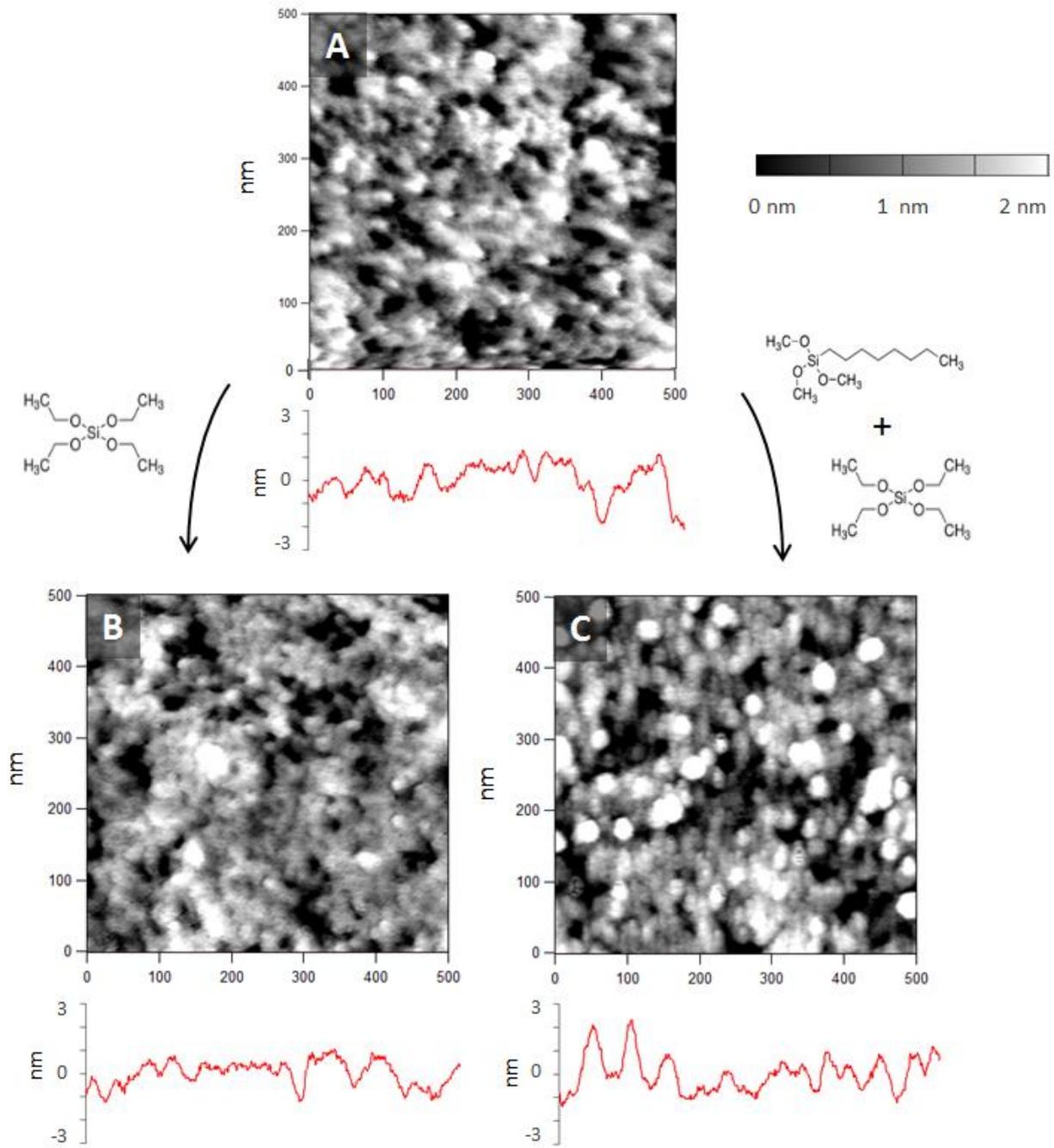


Figure B.16. Images topographiques AFM des surfaces Ge-Se-Te avant fonctionnalisation (A), puis après fonctionnalisation avec le TEOS (B) et le mélange TEOS + OTMS (C).

B.III. Pour aller plus loin : étude XPS

B.III.1. XPS

La spectrométrie photoélectronique X, (ou XPS pour *X-Ray photoelectron spectrometry* en anglais) est une technique d'analyse de la chimie de surface. Le matériau à analyser est bombardé par des rayons X monochromatiques et en retour émet des photoélectrons. Pendant l'interaction, l'énergie incidente ($h\nu$) provoque l'ionisation des électrons de cœur des atomes de la surface du matériau. Une partie de cette énergie est requise pour arracher un électron (E_L), tandis que le reste est conservé par l'électron sous forme d'énergie cinétique (E_C). En considérant l'équation de conservation de l'énergie (éq. B.1), le photoélectron détecté porte l'information sur l'énergie d'ionisation.

$$h\nu = E_L + E_C \qquad \text{éq. B.1}$$

La profondeur d'analyse en XPS est de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Cette technique permet d'identifier les atomes constitutifs de la surface. Elle permet aussi d'étudier leur environnement chimique et d'identifier leurs plus proches voisins. Des voisins électronégatifs (et donc l'oxygène) diminuent la densité du nuage électronique, et donc la constante de blindage. Les orbitales considérées sont ainsi observées à des énergies de liaisons plus importantes. La XPS est donc particulièrement bien adaptée pour la caractérisation des surfaces silanisées [Puglisi1984]. Sous certaines réserves, une analyse quantitative est également possible.

La XPS est donc tout à fait adéquate pour l'étude de la fonctionnalisation avec les organosilanes, via notamment la présence de silicium et l'établissement de nouvelles liaisons covalentes. En revanche, la XPS n'apportera que très peu d'informations utiles sur l'adsorption de peptides ou de protéines sur une surface, car ceux-ci sont principalement composés de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. Nous avons donc exclusivement utilisé la XPS pour approfondir et compléter l'étude de la fonctionnalisation des couches minces chalcogénures Ge-Se-Te par les organosilanes. Les analyses ont été réalisées avec l'appareil ESCALAB 250 de Thermo Electron, avec la raie excitatrice Al K α (1486,6 eV). Les spectres de

photoélectrons ont été calibrés en énergie de liaison par rapport à l'énergie de la composante C-C du carbone C1s à 284,8 eV.

B.III.2. Des organosilanes à la surface des couches Ge-Se-Te ?

Pour cette étude XPS, nous avons choisi d'étudier les surfaces chalcogénures fonctionnalisées avec l'APTRES comme dans le paragraphe B.I, mais également avec un mélange d'OTMS et de TEOS, et avec le TEOS seul, comme dans le paragraphe B.II. La Figure B.17 donne les spectres obtenus pour ces trois voies de fonctionnalisation, ainsi que le spectre enregistré sur une couche mince Ge-Se-Te juste après dépôt (notée « référence » sur la Figure).

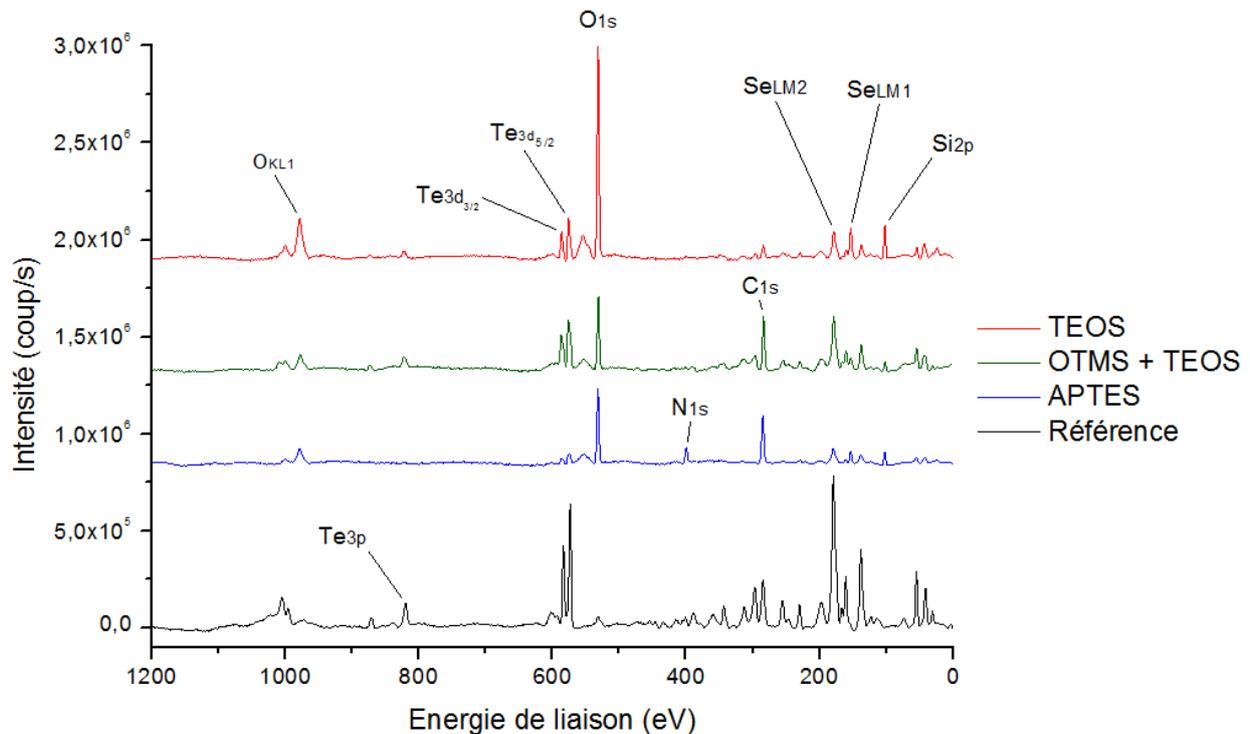


Figure B.17. Spectres XPS d'une couche chalcogénure $Ge_{25}Se_{55}Te_{20}$ avant fonctionnalisation (Référence), puis après fonctionnalisation avec l'APTRES (bleu), avec OTMS+TEOS (vert foncé) et avec TEOS (rouge). Les 4 spectres ont été corrigés avec une ligne de base.

On constate sur la Figure B.17 que la couche chalcogénure du ternaire Ge-Se-Te de référence présente de très nombreuses énergies d'ionisation (en noire). Effectivement, ses éléments constitutifs sont composés de nombreuses orbitales de cœur, et font apparaitre de nombreuses transitions Auger (SeLM1, SeLM2). En plus du germanium, sélénium et tellure,

sont identifiées sur le spectre des couches Ge-Se-Te non fonctionnalisées des traces de carbone et d'oxygène. L'assignation complète des énergies présentes sur le spectre de référence figure en Annexe B.4. A titre indicatif et selon cette analyse XPS, la composition de cette couche mince chalcogénure serait $\text{Ge}_{18}\text{Se}_{67}\text{Te}_{15}$. La composition réelle de cette couche, vérifiée par EDX, est $\text{Ge}_{22}\text{Se}_{55}\text{Te}_{23}$. Cette différence est peu surprenante au vu des limites des analyses quantitatives avec la XPS [Shard2020].

En ce qui concerne les spectres des trois surfaces fonctionnalisées, toujours sur la Figure B.17, ils présentent tous les éléments chimiques attendus : Ge, Se, Te ainsi que N, Si, C et O. La présence du silicium se manifeste à travers les orbitales Si2s et Si2p, respectivement à 153 eV et 103 eV. La présence de l'azote dans le cas d'une fonctionnalisation avec l'APTES est vérifiée par l'orbitale N1s à 400 eV. Le Tableau B.4 compare les rapports stœchiométriques calculés et théoriques pour les trois précurseurs.

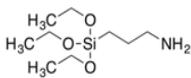
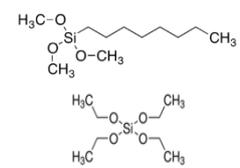
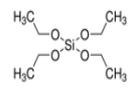
Formule chimique		APTES	OTMS + TEOS	TEOS
				
Oxygène/Silicium	XPS (O1s/Si2p)	2,1	2,9	2,6
	Théorie	3,0	3,5	4,0
Carbone/Silicium	XPS (C1s/Si2p)	3,6	4,5	0,4
	Théorie	3,0	4,0	0,0
Azote/Silicium	XPS (N1s/Si2p)	0,7	-	-
	Théorie	1,0	-	-

Tableau B.4. Rapports stœchiométriques calculés à partir des spectres XPS et rapports théoriques, pour les trois surfaces fonctionnalisées avec l'APTES, le mélange OTMS + TEOS et le TEOS. Les rapports théoriques supposent une hydrolyse complète et aucune homocondensation.

Les rapports de compositions calculés sont en adéquation avec les rapports théoriques, ce qui confirme que la fonctionnalisation des chalcogénures est bien effective, et ce avec les trois précurseurs organosilanes. On observe toutefois que les ratios oxygène/silicium obtenus sont dans tous les cas inférieurs à la théorie. Ce déficit d'oxygène s'explique par

l'homocondensation via la formation de groupements Si-O-Si, puis le début de formation d'un réseau de SiO₂ ou de R-SiO_{1.5}. Il en résulte en effet une perte d'atomes d'oxygène sous la forme de molécules d'eau. Il est à noter que cet écart est plus important pour la couche fonctionnalisée avec le TEOS. En effet, ce précurseur porte 4 groupes hydrolysables, ce qui le rend davantage enclin à l'homocondensation. La littérature rapporte ces mêmes observations [Mai2015]. Lorsque le TEOS est mélangé avec l'OTMS, on constate que ce ratio oxygène/silicium est plus élevé. A considérer qu'il y a moins d'oxygène dans l'OTMS, ce constat paraît d'abord contradictoire. Mais ce résultat indique surtout que l'OTMS est très peu sujet à l'homocondensation, dû à l'encombrement stérique apporté par la longue chaîne carbonée.

A l'inverse de l'oxygène, on peut constater dans le Tableau B.4 que le carbone est légèrement en excès par rapport à la théorie, et ce quel que soit le précurseur utilisé. Ce léger excès peut être attribué en partie à une pollution carbone, déjà observée sur la surface de référence non fonctionnalisée. Cet excès peut être également expliqué par l'hydrolyse incomplète des précurseurs, et donc par la présence de groupements méthoxy (CH₃O) ou éthoxy (C₂H₅O).

La présence des éléments Ge, Se et Te sur les spectres des couches minces fonctionnalisées indique que la modification n'affecte que les premiers nanomètres de la surface. En calculant les rapports stœchiométriques des éléments issus de la fonctionnalisation (Si) versus les éléments de la couche chalcogénure (Ge, Se et Te), on peut obtenir des renseignements sur l'épaisseur relative de la zone fonctionnalisée. Les rapports stœchiométriques Si2p/Se3d pour les précurseurs APTES, OTMS + TEOS et TEOS sont par exemple respectivement de 3,5 ; 1,0 et 5,5. L'épaisseur de la zone fonctionnalisée serait donc plus importante avec le TEOS seul, et moins importante avec le mélange OTMS + TEOS. Cette tendance peut encore une fois s'expliquer par différents rapports d'homocondensation/hétérocondensation, comme déjà discuté dans les paragraphes précédents. En effet, l'organosilane TEOS est plus enclin à former un réseau 3D de Si-O-Si, d'où une couche plus épaisse. Quant à l'OTMS + TEOS, la chaîne de 8 carbones de l'OTMS limite l'homocondensation et favorise la formation d'une monocouche à la surface de la couche chalcogénure.

Une analyse plus précise des raies correspondant à l'orbitale 2p du silicium est présentée sur la Figure B.18, à gauche. Les énergies de liaison correspondantes, vers 103 eV, indiquent logiquement un environnement oxydé [Thoegersen2012]. Plus l'environnement de l'élément est oxydé, plus l'énergie de liaison sera par ailleurs élevée. Comme on peut le voir sur la Figure B.18, cette énergie de liaison augmente quand on passe de l'APTES au mélange OTMS + TEOS puis au TEOS. Dans ce dernier cas, avec le TEOS seul, l'ionisation à 103,4 eV est cohérente avec la formation d'un réseau SiO₂ [Ingo2001]. Ceci est également cohérent avec les ratios théoriques oxygène/silicium donnés dans le Tableau B.4. Ce résultat confirme de nouveau que la fonctionnalisation des couches est bien effective, et ce quel que soit le précurseur organosilane utilisé.

Pour aller plus loin, la raie observée pour la couche fonctionnalisée avec le mélange de précurseurs OTMS + TEOS a été déconvoluée. Effectivement, la largeur à mi-hauteur de 1,9 eV paraît trop grande pour supposer un environnement unique pour le silicium [Milosev2012]. Le résultat de la déconvolution est présenté sur la Figure B.18 (à droite), et suggère l'existence de deux environnements pour le silicium. Ce résultat est en accord avec l'utilisation d'un mélange de deux organosilanes : l'un portant 3 oxygènes (102,6 eV pour OTMS) et l'autre 4 oxygènes (103,3 eV pour TEOS).

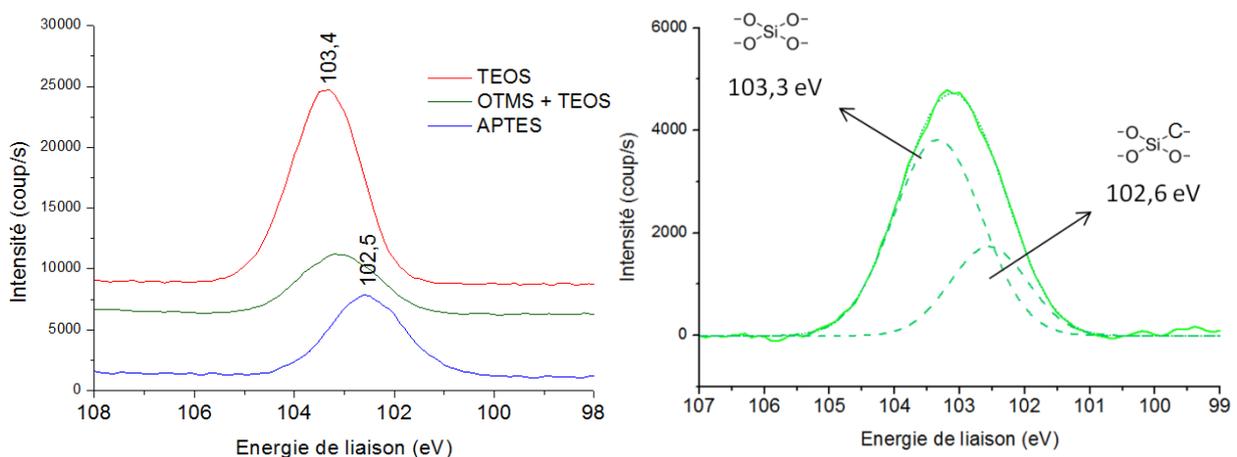


Figure B.18. Spectres XPS de l'orbitale 2p du silicium pour les trois surfaces fonctionnalisées (à gauche), et déconvolution de cette orbitale pour la surface OTMS+TEOS (à droite).

Ces premières exploitations des spectres XPS établissent que les trois précurseurs se sont effectivement accrochés sur la surface de nos couches chalcogénures. Le précurseur TEOS favorise la formation d'une couche relativement épaisse via des réactions de condensation entre molécules. L'ajout d'OTMS inhibe l'homocondensation et favorise la formation d'une couche plus fine. Le nettoyage mécanique et chimique effectué après cette modification suppose une adhésion forte. En toute vraisemblance, des liaisons covalentes se sont formées entre les organosilanes et les éléments des couches Ge-Se-Te. Une analyse plus fine des spectres doit nous permettre d'identifier la nature de ces liaisons : cette analyse fait l'objet du paragraphe suivant.

B.III.3. Analyse des liaisons formées

Il est possible d'obtenir, à partir des spectres XPS, des informations sur la coordination des éléments constitutifs de nos couches : Ge, Se et Te. En particulier, les spectres enregistrés à partir des surfaces avant et après fonctionnalisation présentent d'importantes modifications de l'environnement du tellure.

Tout d'abord, un scan précis de l'orbitale Te3d (vers 580 eV) de la couche mince Ge-Se-Te avant fonctionnalisation est présenté sur la Figure B.19. La déconvolution de ce spectre fait apparaître trois environnements différents pour le tellure, et ceci sur les deux configurations de spin Te3d_{5/2} et Te3d_{3/2}.

Plusieurs études XPS approfondies sur la structure et l'oxydation des éléments chalcogénures permettent d'assigner chaque énergie d'ionisation à un environnement chimique. Pour le tellure pur, les orbitales Te3d_{5/2} et Te3d_{3/2} sont assignées à des énergies de 573 eV et 583,5 eV, respectivement. Un environnement oxydé du tellure, et donc la présence de liaisons Te-O, est facilement identifiable à des énergies de liaison décalées d'environ 4 eV [Zhao2020]. La présence de sélénium, relativement électronégatif, résulte quant à elle d'un décalage moindre, d'environ 1 eV [Vinod2012]. La distinction entre les liaisons Te-Te ou les liaisons Te-Ge est beaucoup plus subtile, mais certains travaux indiquent un léger décalage d'environ 0,3 eV [Shalvoy1977].

Grâce à cette déconvolution, nous pouvons donc identifier une très légère oxydation de la couche, surtout via la présence d'une ionisation à 576,0 eV ($\text{Te}3d_{5/2}$) et éventuellement à 586,1 eV ($\text{Te}3d_{3/2}$). Cette oxydation est tout à fait prévisible dès lors que la surface est sous atmosphère ambiante [Yashina2001]. La déconvolution permet également d'identifier la liaison Te-Se via les raies à 573,0 eV ($\text{Te}3d_{5/2}$) et 583,4 eV ($\text{Te}3d_{3/2}$). La dernière contribution mise en évidence peut quant à elle être assignée à des liaisons Te-Ge ou Te-Te.

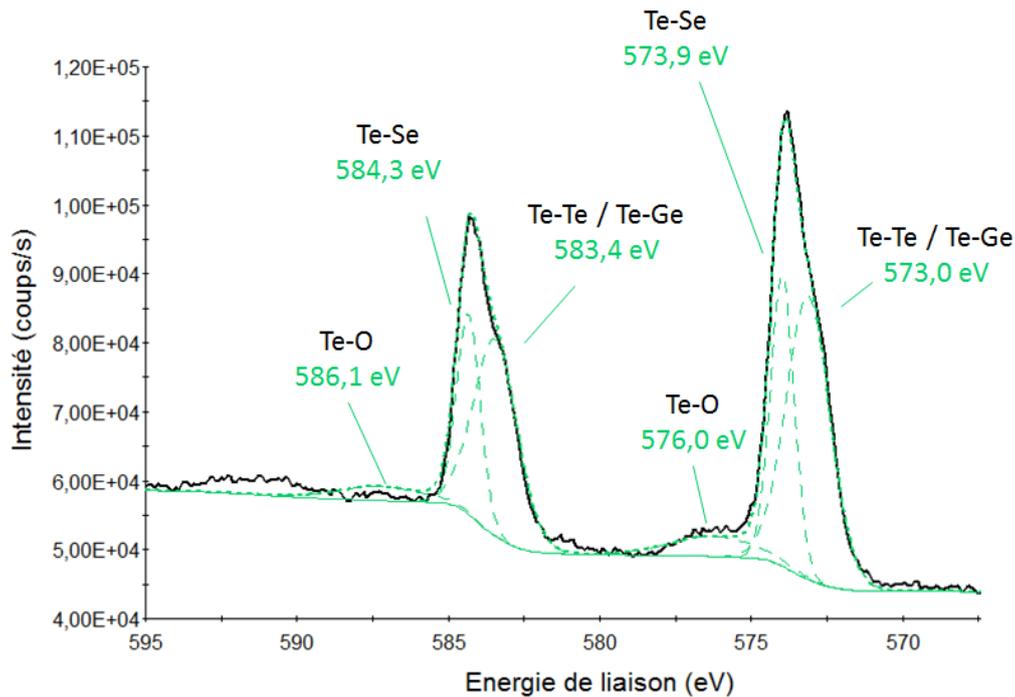


Figure B.19. Déconvolution de l'orbitale $\text{Te}3d$ de la surface Ge-Se-Te sans fonctionnalisation.

Après fonctionnalisation, le spectre des orbitales du tellure est complètement transformé. La Figure B.20 montre très nettement l'apparition d'un nouvel environnement oxydé du tellure, avec deux nouvelles énergies vers 576,5 eV ($\text{Te}3d_{5/2}$) et vers 587,5 eV ($\text{Te}3d_{3/2}$). Les orbitales $\text{Te}3p_{1/2}$, $\text{Te}3p_{3/2}$ et $\text{Te}4d$ montrent également l'apparition de cet état d'oxydation (Annexe B.5). À l'évidence il y a formation de liaisons Te-O, qui selon toute vraisemblance, sont utilisées pour former des groupements Te-O-Si. Une analyse plus poussée révèle que les trois couches fonctionnalisées ont perdu la quasi-totalité - voire la totalité - des contributions Te-Ge et Te-Te à 573,0 eV ($\text{Te}3d_{5/2}$) et 583,4 eV ($\text{Te}3d_{3/2}$). Finalement, lors de la fonctionnalisation par les organosilanes, des liaisons Te-O sont vraisemblablement formées à partir de la rupture des liaisons Te-Te et/ou Ge-Te. À considérer les énergies de liaison, la

rupture de Te-Te est favorisée, car c'est la liaison la plus faible parmi les 6 envisageables dans le ternaire Ge-Se-Te : 257 KJ.mol⁻¹.

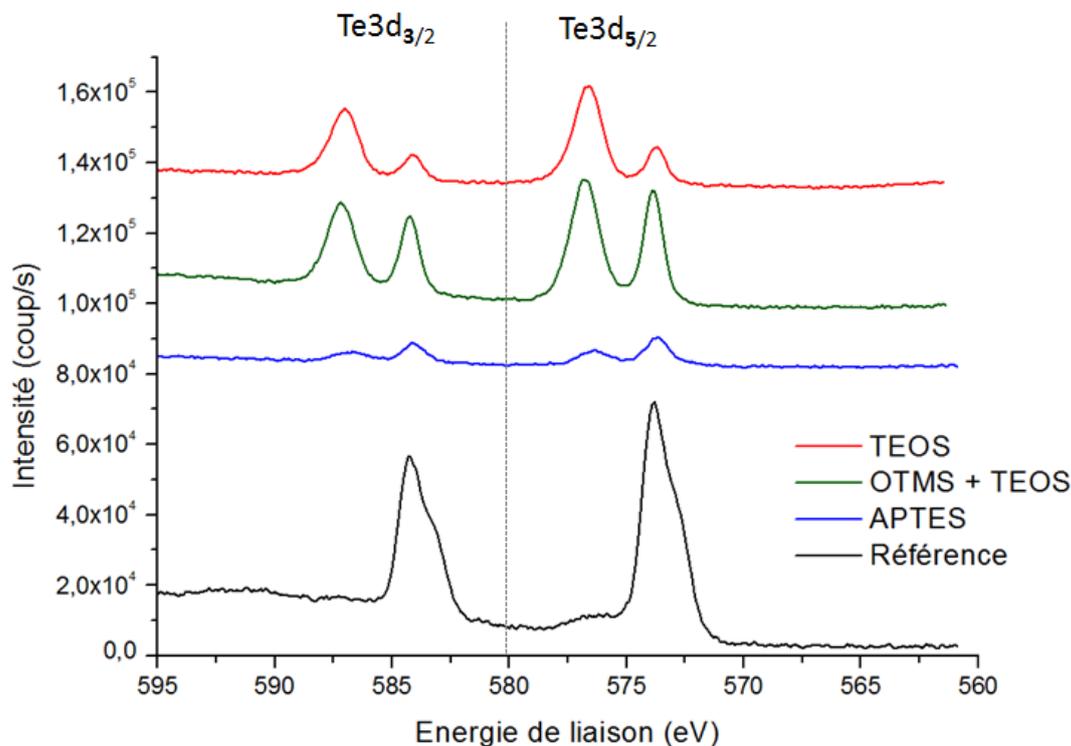


Figure B.20. Spectres XPS des orbitales $Te3d_{5/2}$ et $Te3d_{3/2}$ des couches Ge-Se-Te avant et après fonctionnalisation.

Le Tableau B.5 résume les indexations effectuées pour chacune des énergies d'ionisation des différents spectres présentés sur les Figures B.19 et B.20.

Orbitale	Indexation	Référence	Surfaces			
			Ge-Se-Te	APTES	OTMS+TEOS	TEOS
Te 3d _{5/2}	Te-Te ou Te-Ge	[Shalvoy1977]	573,0	-	-	-
	Te-Se	[Vinod2012]	573,9	573,7	573,9	573,7
	Te-O	[Yashina2001]	576,0	576,4	576,8	576,6
Te 3d _{3/2}	Te-Te ou Te-Ge	[Shalvoy1977]	583,4	-	-	-
	Te-Se	[Vinod2012]	584,3	584,1	584,3	584,1
	Te-O	[Zhao2020]	586,1	586,7	587,2	587,0

Tableau B.5. Energies d'ionisation des orbitales $Te3d_{5/2}$ et $Te3d_{3/2}$ des surfaces avant (colonne Ge-Se-Te) et après fonctionnalisation avec les différents précurseurs (colonnes APTES, OTMS + TEOS et TEOS, respectivement). Toutes les énergies sont en électronvolts.

L'analyse des spectres n'a pas révélé de changement significatif des énergies de liaisons des orbitales du germanium (Ge3d vers 31 eV) ou du sélénium (Se3d vers 55 eV).

La Figure B.21 présente le scan précis de l'orbitale Ge3d du matériau avant fonctionnalisation. L'allure de la courbe ne laisse entrevoir que peu de contributions différentes. La principale contribution est située à 31,3 eV et correspond vraisemblablement à un environnement sélénium (31,3 eV) [Shalvoy1977][Ueno1983]. Une deuxième contribution très peu prononcée est située à 29,9 eV et correspond probablement à un environnement tellure, précédemment rapporté à 30,0 eV [Shalvoy1977][Vinod2012]. Il est à noter l'absence de liaisons homopolaires Ge-Ge, rapportées à 29,0 eV [Shalvoy1977] ou 29,1 eV [Hollinger1974]. En effet, dans le ternaire Ge-Se-Te, le germanium ne forme pas de liaisons homopolaires Ge-Ge, mais va préférentiellement former des liaisons Ge-Se [Cernosek2017][Sarrach1976]. Il est également à noter que l'oxyde natif formé à partir du germanium est quasiment inexistant. Cet oxyde est en effet rapporté à 32,5 eV [Hollinger1974] ou 32,6 eV [Vinod2012].

Après fonctionnalisation, on retrouve à quelque chose près le même scan de l'orbitale Ge3d, indiquant que le germanium ne change pas de plus proches voisins. Cette stabilité peut s'expliquer par les fortes énergies de liaisons covalentes dans lesquelles le germanium est impliqué. Les liaisons Ge-Te et Ge-Se ont des énergies respectives de 398 kJ.mol⁻¹ et 485 kJ.mol⁻¹ ; parmi les 6 liaisons envisageables du ternaire Ge-Se-Te, ce sont les deux liaisons covalentes dont les énergies sont les plus importantes.

Ces résultats suggèrent que la fonctionnalisation des couches Ge-Se-Te s'effectue non pas via la formation de liaisons Ge-O-Si, mais vraisemblablement via la formation de liaisons Te-O-Si, avec rupture de liaisons Te-Te. Les travaux d'Amalric & al rapportent la silanisation de Ge-As-Se via la formation de groupements Ge-O-Si, identifiés par une analyse par spectrométrie de masse [Amalric2012]. La silanisation des verres chalcogénures est donc possible via la formation de Ge-O-Si, mais est probablement préférentiellement réalisée via la formation de Te-O-Si lorsque les deux éléments Ge et Te sont présents dans le matériau.

Grâce à cette analyse XPS, nous avons donc une conception beaucoup plus précise de la chimie de surface des couches chalcogénures fonctionnalisées. La Figure B.22 illustre cette chimie en résumant ces résultats de façon plus visuelle.

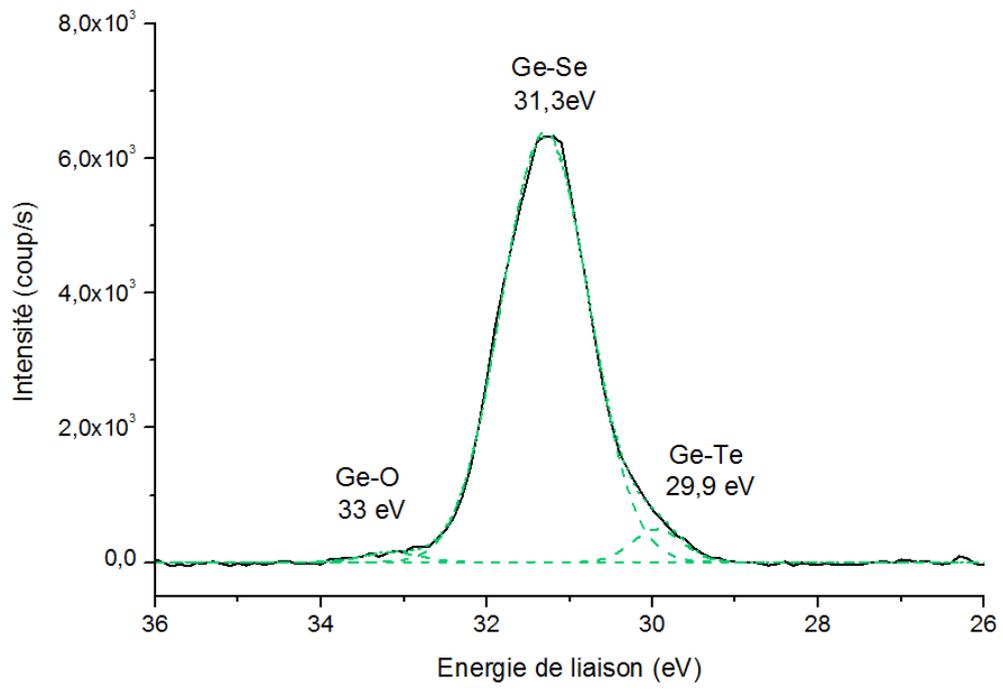


Figure B.21. Scan et déconvolution de l'orbitale Ge3d pour une couche Ge-Se-Te avant fonctionnalisation.

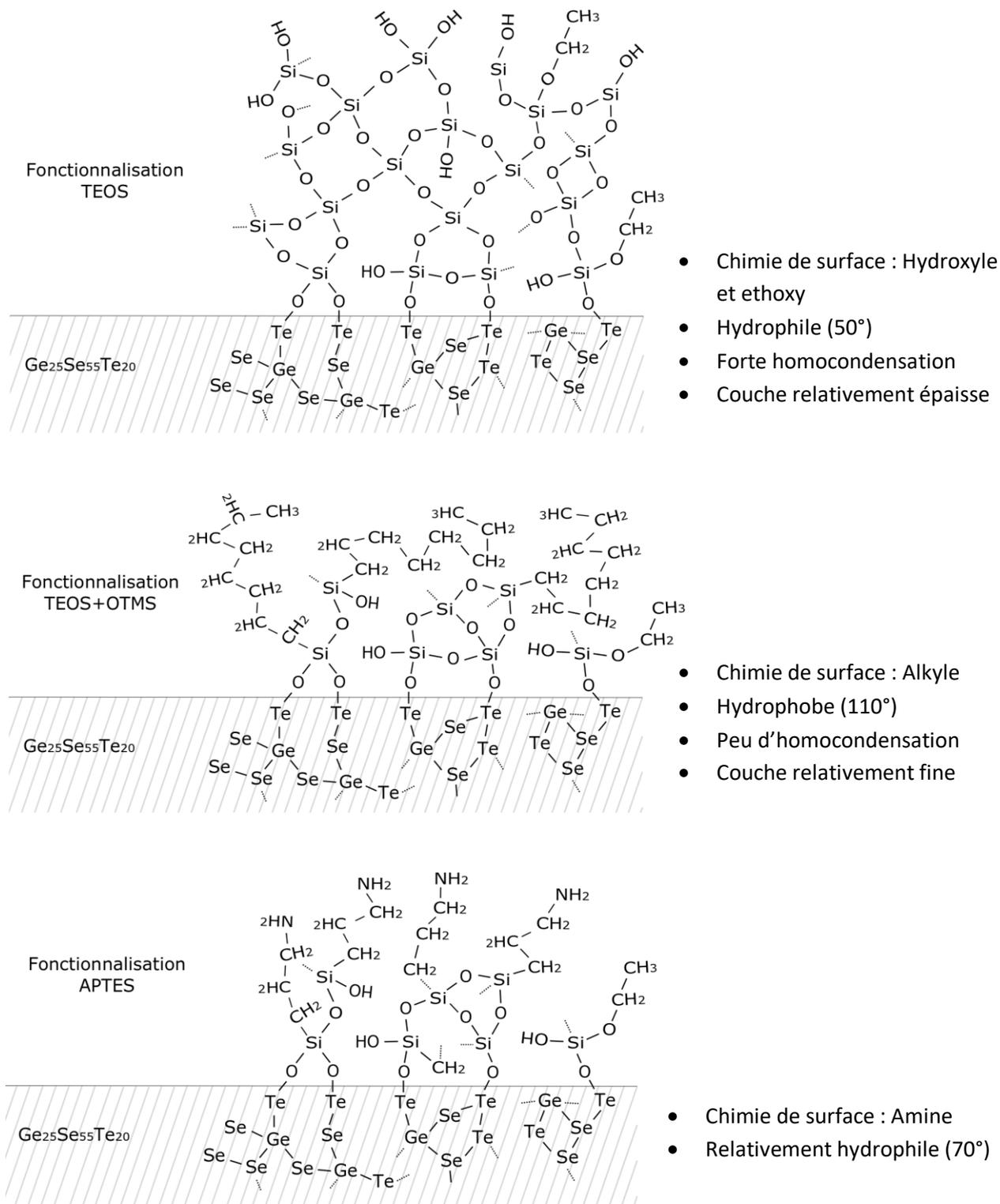


Figure B.22. A gauche : schématisation des surfaces Ge-Se-Te obtenues après fonctionnalisation avec les différents précurseurs (en haut : TEOS ; au milieu : TEOS + OTMS ; en bas : APTES). A droite : propriétés et caractéristiques correspondantes.

B.IV. Conclusion

Ce chapitre a été consacré à la fonctionnalisation des couches minces Ge-Se-Te. Après avoir démontré la fonctionnalisation effective des couches par voie peptidique et par silanisation grâce à la capture spécifique de la streptavidine, le travail a porté sur la modification de la mouillabilité des surfaces par silanisation. Il a été montré que la silanisation avec des précurseurs tels que le TEOS apporte de l'hydrophilie à la surface (de 84 à 52°), tandis que la silanisation avec des précurseurs tels que le mélange TEOS + OTMS donne lieu à des surfaces Ge-Se-Te plus hydrophobes (de 84 à 110°). Il sera donc possible d'avoir recours à la silanisation pour modifier judicieusement le caractère hydrophile/hydrophobe des guides d'onde, et ainsi favoriser l'immobilisation des spores. En rendant les guides plus hydrophobes et au contraire les zones qui entourent les guides plus hydrophiles, les spores devraient en effet se fixer préférentiellement sur les guides. Cela devrait permettre d'augmenter la sensibilité des micro-capteurs envisagés.

Pour aller plus loin dans la compréhension de la chimie impliquée dans la silanisation des couches minces Ge-Te-Se, une étude XPS approfondie a été effectuée. Elle a permis de fournir de nombreuses informations sur le mécanisme réactionnel. La formation des groupements Te-O-Si, mise en évidence par cette étude, est cohérente avec la faible énergie des liaisons Te-Te (257 kJ.mol^{-1}), la plus faible de tout le ternaire Ge-Se-Te.

Pour finir, il est à noter que la silanisation ne s'accompagne pas d'une augmentation significative de la rugosité. Ce résultat est encourageant pour la suite de l'étude. Cela signifie en effet que la fonctionnalisation des guides d'onde ne résultera pas dans l'apparition pas de pertes optiques par diffusion [Lee2001][Zhao2019b][Hu2007]. La silanisation ne devrait donc pas augmenter les pertes de propagation, qui devraient rester autour de 1 dB.cm^{-1} à $1,55 \mu\text{m}$ [Vigreux2013][Vigreux2014]. Il est à souligner également que la silanisation n'affecte que les premiers nanomètres de la surface : les spores à détecter devraient donc rester suffisamment proches de la surface et devraient donc pouvoir interagir avec le champ évanescent.

CHAPITRE C

-

Fonctionnalisation sélective des guides d'onde

Le chapitre précédent a permis d'identifier deux voies de fonctionnalisation des couches minces chalcogénures du système ternaire Ge-Se-Te (voie peptidique et silanisation). Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à la fonctionnalisation sélective des guides d'onde Ge-Se-Te.

La transition de la fonctionnalisation d'une surface plane (couche Ge-Se-Te) vers celle d'un composant pleine plaque, formé de plusieurs guides d'onde, ne présente pas de difficultés particulières. Il suffit d'appliquer le même procédé, c'est-à-dire le dip coating ou le drop-casting. Cette expérience a été réalisée et les résultats obtenus ont été utilisés à titre de comparaison. Nous avons ensuite cherché à ce que les guides d'onde, parties actives de nos composants, soient fonctionnalisés de manière contrôlée. En effet, dans le composant final, la lumière sera injectée au sein d'un guide d'onde (Figure C.1, à gauche) et seuls les analytes (molécules, protéines, spores, etc.) « déposés » sur le guide d'onde pourront être détectés via leur interaction avec le champ évanescent. Il est à noter que le champ évanescent, mis en évidence sur la Figure C.1, à droite, est présent aussi bien sur le guide d'onde que sur ses flancs.

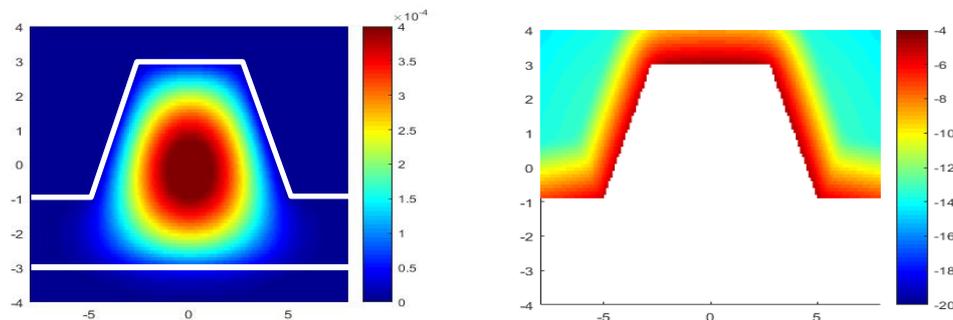


Figure C.1. A gauche : profil de champ du mode fondamental guidé au sein d'un guide d'onde. A droite : mise en évidence du champ évanescent par « extinction » des fortes intensités.

Pour que les analytes se déposent préférentiellement sur cette zone sensible du composant, à savoir sur la surface et sur les flancs des guides d'onde, il est nécessaire de générer un contraste d'affinité chimique ou biologique. Pour produire ce contraste, il y a deux options. La première option consiste à fonctionnaliser uniquement les zones entre les guides d'onde ; la seconde option consiste à ne fonctionnaliser au contraire que les guides d'onde. Dans les deux cas, nous créerons un contraste d'affinité chimique ou biologique entre les zones actives et les zones non actives du capteur.

Dans les paragraphes suivants, nous allons dans un premier temps reprendre le protocole de fabrication des guides d'onde. Cette introduction nous permettra d'identifier des stratégies de fonctionnalisation sélective. Une fois ces stratégies identifiées et explicitées, nous allons les tester, notamment avec un précurseur fluorescent, afin d'être en mesure de suivre la fonctionnalisation à l'échelle micrométrique.

C.I. Protocole de fabrication des guides d'onde

Les guides d'ondes chalcogénures fabriqués dans le cadre de ce travail sont des guides d'onde RIB. La zone de guidage se compose essentiellement d'un cœur situé sur une couche de même indice de réfraction. Concrètement cela revient à avoir une couche de cœur gravée partiellement. Le protocole de fabrication détaillé dans la littérature [Vigreux2013] [Vigreux2014][VuThi2014] est résumé sur la Figure C.2.

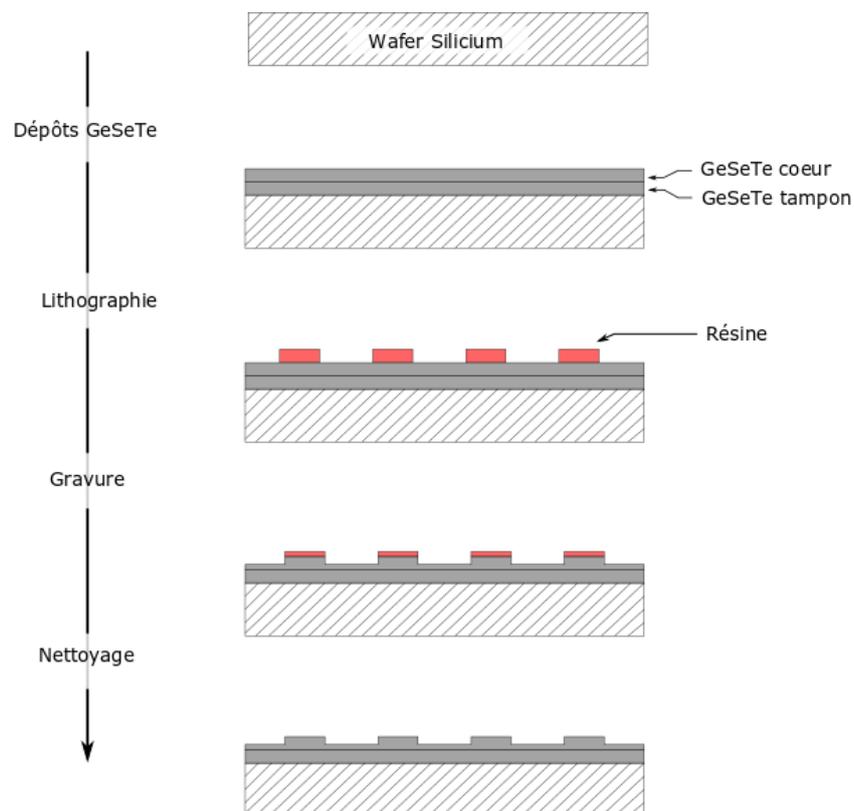


Figure C.2. Schéma résumant les étapes de fabrication des guides d'onde à base de couches minces Ge-Se-Te.

Il est à noter que le choix des compositions des couches a été fait suite à l'étude du ternaire Ge-Se-Te [VuThi2014] et que celui des paramètres optogéométriques (épaisseurs des couches, profondeur de gravure, etc.) a été réalisé par simulation [TalebBendiab2020]. Dans le cadre de ce travail de thèse, aucune modification n'a été apportée par rapport aux travaux antérieurs.

Les guides d'onde RIB réalisés sont composés d'un substrat en silicium sur lequel sont déposées successivement par co-évaporation thermique, une couche tampon (de composition nominale $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{65}\text{Te}_{10}$ et d'épaisseur $6\ \mu\text{m}$) et une couche de cœur (de composition nominale $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$ et d'épaisseur $6\ \mu\text{m}$). Cette différence de stœchiométrie se traduit par une légère différence d'indice de réfraction. Cette différence d'indices entre les deux couches, $\Delta n = n(\text{couche de cœur}) - n(\text{couche tampon})$, vaut $0,10 \pm 0,08$ à $\lambda = 1,55\ \mu\text{m}$. Ce contraste est suffisant pour obtenir le confinement de la lumière infrarouge entre ces deux couches. Afin d'obtenir un guide de type RIB et un confinement bidimensionnel de la lumière, la couche de cœur est gravée partiellement. Pour cela, deux étapes classiquement utilisées en micro-électronique sont nécessaires : la photolithographie au travers un masque présentant les motifs souhaités (dans notre cas plusieurs séries de bandes de différentes largeurs sur toute la longueur du masque) et la gravure. Dans cette étude, la gravure est réalisée par usinage ionique.

Pour l'étape de photolithographie, la résine positive AZ4533 est déposée par spin-coating, à raison de 4000 tours par minute pendant 30 secondes. L'épaisseur de la couche de résine obtenue est d'environ $3,3\ \mu\text{m}$. Le masque utilisé présente plusieurs séries de 17 bandes, de largeurs comprises entre 4 et $40\ \mu\text{m}$ (**w** sur la Figure C.3, à gauche). Ces bandes sont espacées de plusieurs centaines de μm . L'insolation à travers le masque sous une lampe UV (400 W pendant 7 secondes), le développement dans une solution basique et une étape de recuit permettent d'obtenir le transfert des motifs du masque vers la résine. On obtient alors notre composant, constitué du substrat silicium et de ses couches Ge-Se-Te, recouvert de bandes de résine. Ces bandes servent à leur tour de masque durant l'étape de gravure. Pour ce qui est de la gravure par usinage ionique, elle est réalisée sous atmosphère d'argon avec quelques pourcents d'oxygène. La présence d'oxygène permet de rendre la gravure plus sélective au regard de la résine. Cela est nécessaire pour atteindre la profondeur de gravure souhaitée, à savoir $4\ \mu\text{m}$. La profondeur de gravure définit la hauteur des guides (**h** sur la Figure C.3, à

gauche). On peut constater sur la Figure C.3 que les flancs des guides ne sont pas verticaux mais inclinés d'un angle d'environ 65° (θ sur la Figure C.3). Le choix de flancs inclinés a été fait pour être en mesure, à terme, de recouvrir certaines zones du composant. Pour obtenir un angle de 65° environ, le porte-composants tournant est lui-même incliné d'un tel angle pendant la gravure.

Après gravure, il reste une certaine épaisseur de résine (moins de $1 \mu\text{m}$), garante de la sélectivité de la gravure. Elle est retirée grâce à un lavage à l'acétone. On obtient alors des guides d'onde RIB, tels que celui présenté sur l'image MEB de la Figure C.3, à droite.

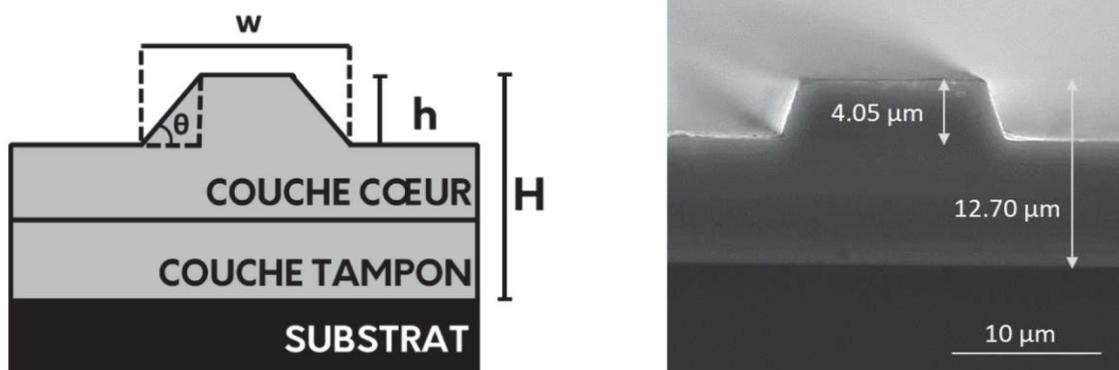


Figure C.3. A gauche, schéma du guide d'onde avec ses dimensions caractéristiques. A droite : image par microscopie électronique à balayage d'un guide d'onde RIB.

C.II. Vers une fonctionnalisation sélective

Comme explicité en introduction de ce chapitre, l'objectif est de fonctionnaliser sélectivement le composant. Dans le paragraphe C.II.1, nous allons décrire le protocole utilisé pour fonctionnaliser les zones entre les guides d'onde. Dans le paragraphe C.II.2, nous verrons ensuite comment nous avons procédé pour ne fonctionnaliser au contraire que les guides d'onde. Il est à noter que pour ces expériences, seule la couche de cœur de $6 \mu\text{m}$ d'épaisseur a été déposée sur substrat silicium. Effectivement, la présence de la couche tampon n'est pas encore utile pour ces tests de modification chimique. Par ailleurs, la silanisation a été privilégiée par rapport à la voie peptidique pour cette étude. Les organotrialkoxysilanes ($\text{R}'\text{Si}(\text{OR})_3$) garantissent entre autres une meilleure accroche sur la surface chalcogénure.

Contrairement à l'approche peptidique, cette immobilisation par des liaisons covalentes a plus de chance de résister à la dernière étape de fabrication, à savoir le lavage avec l'acétone.

C.II.1. Fonctionnalisation entre les guides d'onde

C.II.1.a. Protocole

La stratégie retenue pour fonctionnaliser les zones situées entre les guides d'onde exploite la présence du résidu de résine après gravure. Au lieu d'être éliminée par un lavage à l'acétone, cette résine résiduelle est au contraire préservée et va nous servir de masque pendant la fonctionnalisation.

Comme vu précédemment, l'épaisseur de résine déposée par spin-coating en appliquant une vitesse de rotation de 4000 tours par minute durant 30 secondes est de 3,3 μm environ. Après gravure, il en reste typiquement moins d'un micromètre. Afin d'avoir une épaisseur de résine résiduelle plus importante, nous avons diminué la vitesse de rotation appliquée par spin-coating. Nous sommes passés de 4000 à 2000 tours par minute, nous permettant ainsi d'obtenir une couche de résine plus importante. Après gravure, nous avons obtenu une couche résiduelle de 5 μm d'épaisseur, comme illustré sur l'image AFM d'un guide après gravure (Figure C.4, à gauche), et sur l'histogramme des hauteurs correspondant (Figure C.4, à droite).

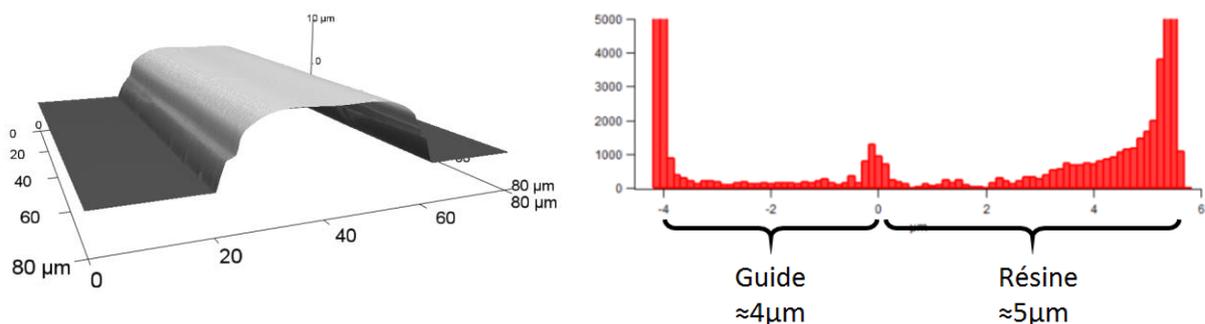


Figure C.4. A gauche : image AFM en 3D d'un guide d'onde après gravure par usinage ionique, avec les nouvelles conditions de dépôt de la résine positive. A droite, histogramme des hauteurs.

Juste avant de retirer cette couche de résine résiduelle, dont l'épaisseur a été augmentée, nous procédons à une étape de fonctionnalisation telle que décrite dans le chapitre B. Toute la surface du composant est alors fonctionnalisée. Un simple rinçage à l'acétone permet ensuite de retirer la résine. Seules les zones entre les guides sont donc finalement fonctionnalisées, comme illustré par le protocole global résumé sur la Figure C.5.

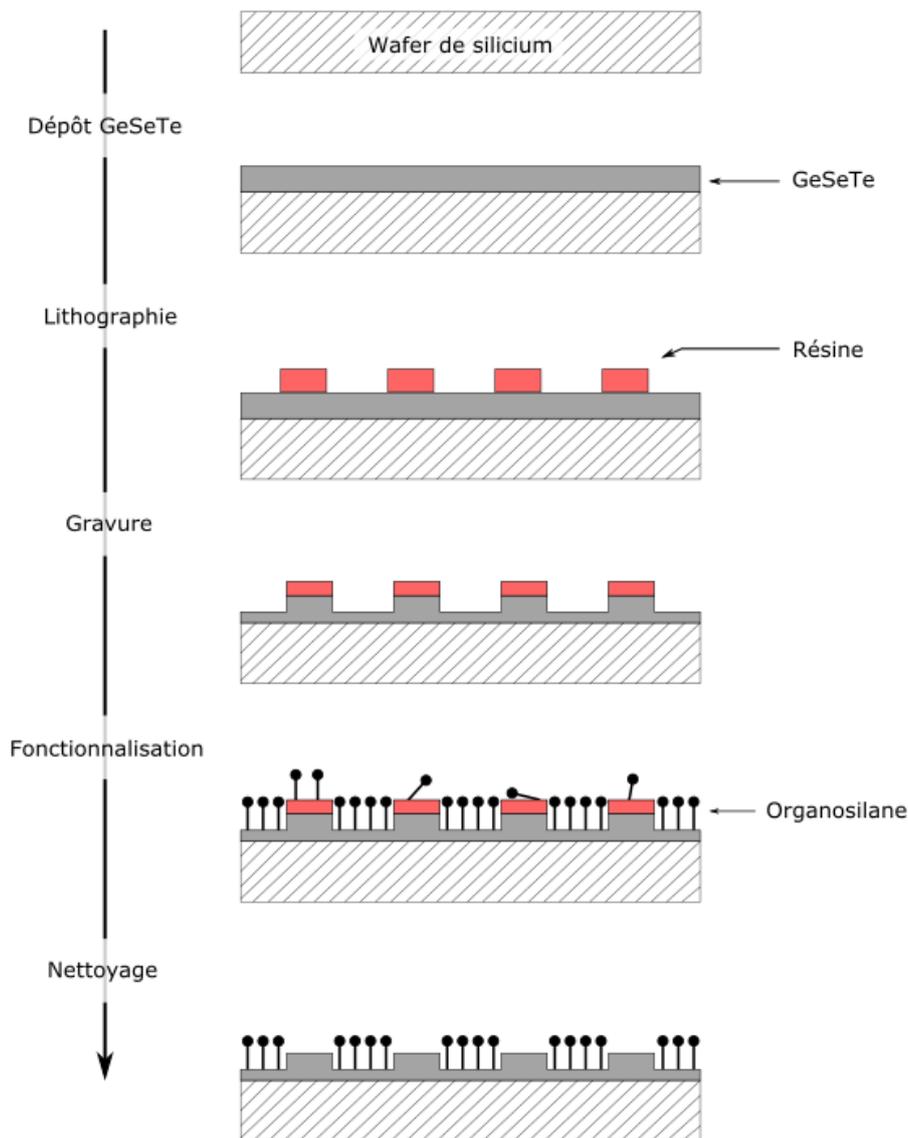


Figure C.5. Schéma résumant le protocole de fabrication des composants fonctionnalisés dans les zones séparant les différents guides d'onde.

Concernant l'étape de fonctionnalisation, elle est toujours réalisée via activation plasma, dip coating, séchage et rinçage. La génération de groupements hydroxyles sur le Ge-Se-Te, par

activation plasma, n'altère pas significativement la couche de résine. Celle-ci est cependant en partie dissoute par l'éthanol, représentant 90% du solvant de la solution de précurseurs organosilanes. Pour prévenir toute pollution par la résine (polymère de phénolformaldéhyde), la surface est rincée rapidement à l'éthanol avant d'être plongée dans la solution de dip coating. La surface est ensuite séchée à l'air ambiant pendant 1 heure, puis à l'étuve à 80°C pendant plusieurs heures afin d'assurer la formation des liaisons Si-O-Te. Enfin, la surface peut être nettoyée à l'acétone pour retirer la résine résiduelle.

C.II.1.b. Caractérisation

Pour caractériser cette surface avec motifs, peu de méthodes s'avèrent appropriées. La taille du spot analysé ne doit pas dépasser quelques dizaines de micromètres. La spectrométrie photoélectronique X (XPS), fournissant pourtant des informations très riches et utiles, ne s'applique plus ici. Les spectroscopies Raman et micro-infrarouge ne se sont pas révélées probantes non plus : la profondeur d'analyse, de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde, est trop importante. Même constat pour la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX).

(i) AFM

En revanche, la microscopie par force atomique, déjà largement utilisée dans le chapitre précédent, dévoile des contrastes de rugosité et d'aspect de surface. La Figure C.6 montre à titre d'exemple les images AFM de la surface d'un guide d'onde non fonctionnalisé (image de gauche) et de la surface de la zone entre deux guides, fonctionnalisée avec le précurseur TEOS (image de droite).

Comme on peut le constater, l'aspect de surface est assez différent entre les deux zones et les rugosités sont également significativement différentes. Le dessus du guide d'onde, non fonctionnalisé, présente une rugosité de $0,75 \pm 0,10$ nm, tandis que plus bas, entre les guides, la rugosité est plus faible : $0,55 \pm 0,10$ nm.

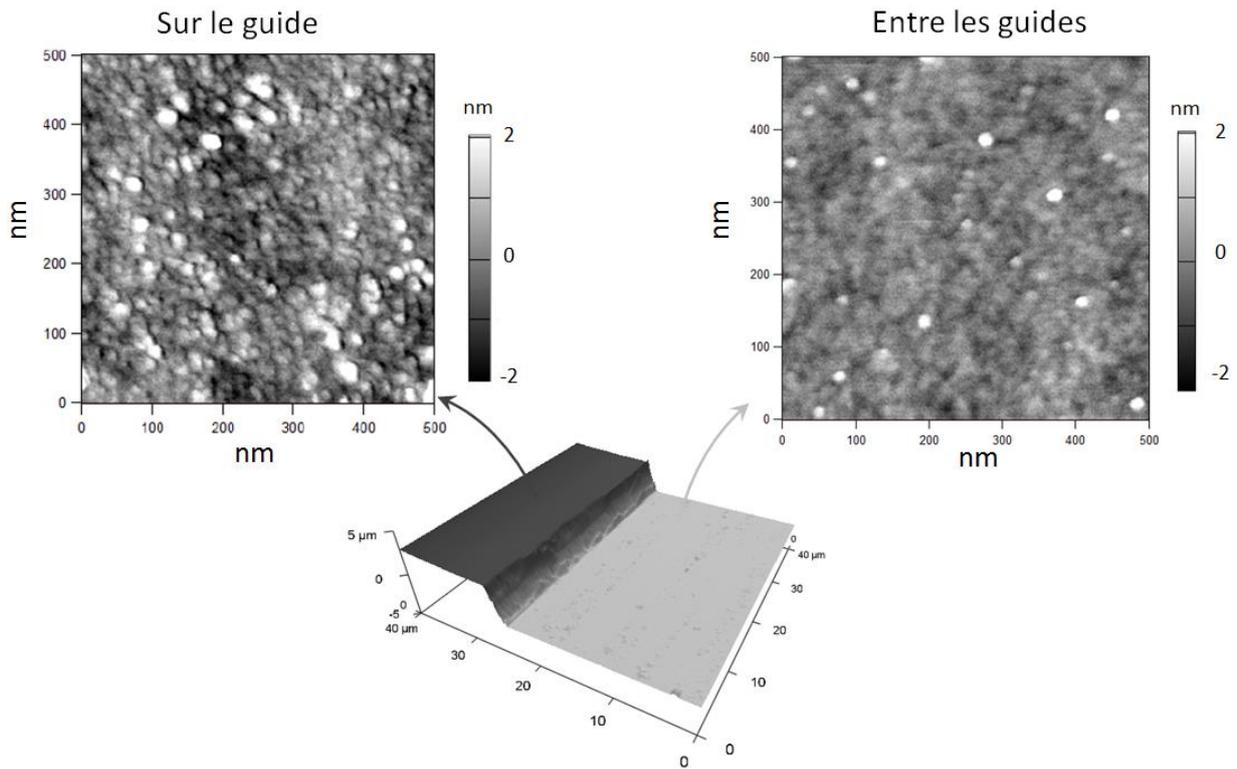


Figure C.6. Images AFM : en haut à gauche, topographie de la surface d'un guide d'onde, zone non fonctionnalisée ; en haut à droite, topographie de la zone située entre deux guides d'onde, fonctionnalisée avec le précurseur TEOS.

Si durant l'étape de fonctionnalisation on remplace le précurseur TEOS par un mélange TEOS + OTMS (voir chapitre précédent), on obtient également des aspects de surface assez différents selon que l'on se place sur un guide (non fonctionnalisé) ou entre deux guides (zone fonctionnalisée) (Figure C.7). Mais cette fois-ci on obtient une rugosité plus importante pour les zones fonctionnalisées, c'est-à-dire entre les guides d'onde. On a en effet une rugosité de $0,60 \pm 0,10$ nm sur le dessus des guides et de $0,85 \pm 0,15$ nm entre les guides. Cette augmentation de la rugosité après fonctionnalisation avec le mélange de précurseurs TEOS + OTMS peut s'expliquer par la présence des longues chaînes carbonées de l'OTMS.

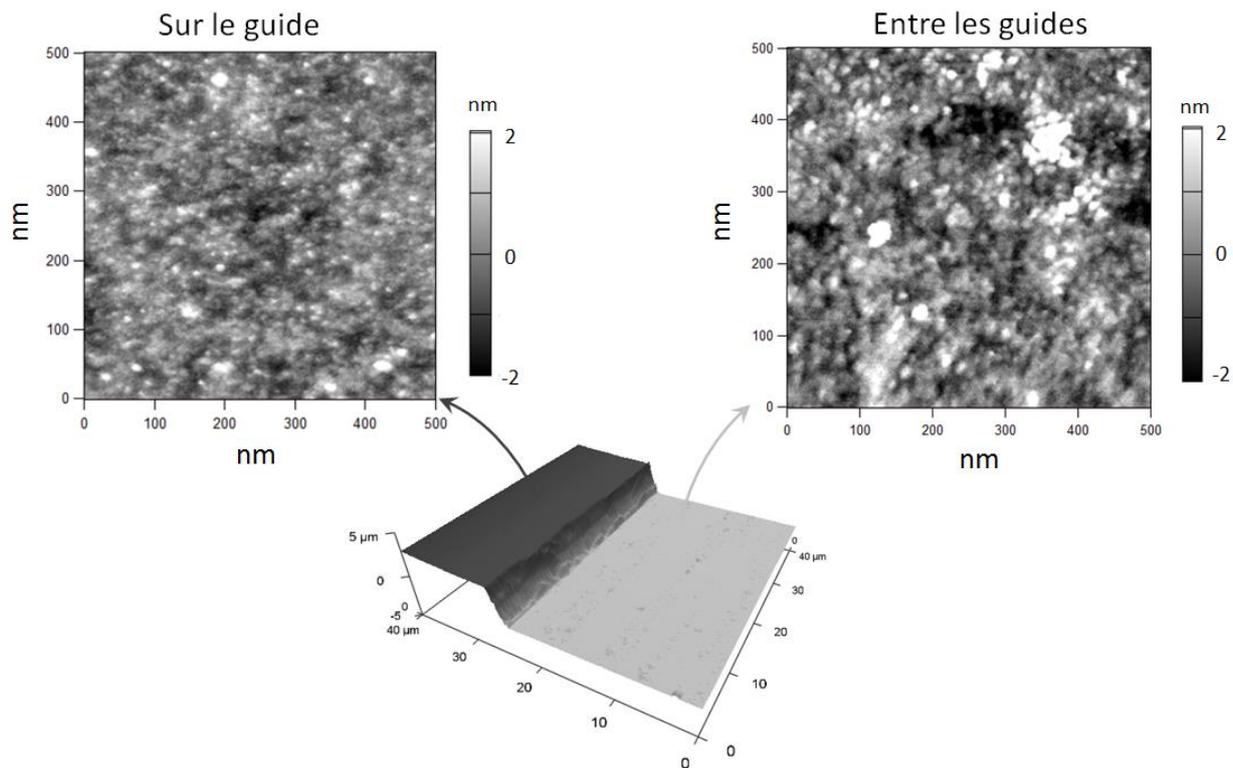


Figure C.7. Images AFM : en haut à gauche topographie de la surface d'un guide d'onde, zone non fonctionnalisée ; en haut à droite, topographie de la zone située entre deux guides d'onde, fonctionnalisée avec le mélange de précurseurs TEOS + OTMS.

L'AFM permet de sonder des spots nanométriques, et donc d'analyser préférentiellement les zones fonctionnalisées et les zones non fonctionnalisées. Les différences observées peuvent être liées à la fonctionnalisation sélective de certaines zones, mais rien ne peut être affirmé. En effet, les surfaces subissent différentes étapes durant le procédé de fabrication des guides d'onde, étapes qui peuvent elles aussi se traduire par des modifications de l'aspect de surface. En particulier, l'étape de gravure par usinage ionique, qui consiste en un bombardement ionique des zones entre les guides, modifie également la surface.

(ii) Angle de contact

Les images AFM n'étant pas suffisantes pour conclure quant à la fonctionnalisation sélective des zones situées entre les guides d'onde, nous avons cherché à analyser nos surfaces par mesure de l'angle de contact. Malheureusement, il est très difficile, avec cette méthode, de travailler à l'échelle micrométrique [Taylor2007]. Une goutte d'un microlitre recouvre en effet

une zone millimétrique, et donc plusieurs guides d'ondes. L'analyse est malgré tout intéressante si l'on procède par comparaison de plusieurs surfaces. Ainsi, nous avons mesuré l'angle de contact de trois composants, et ce pour les deux types de précurseurs : TEOS et TEOS + OTMS. Ces trois composants sont : un composant de référence fabriqué par la voie classique sans aucune fonctionnalisation (protocole de la Figure C.2) ; un deuxième composant obtenu via le protocole décrit sur la Figure C.5, avec la fonctionnalisation des zones entre les guides ; et un dernier composant fonctionnalisé pleine plaque.

Il est important de signaler que la présence des guides droits sur les surfaces complique la mesure de l'angle de contact. En effet, les gouttes adoptent une forme allongée en demi-ellipsoïde, telle qu'illustré sur la Figure C.8. Ainsi, il est possible de mesurer deux angles de contact : une première valeur lorsque l'axe de la caméra est dans l'axe des guides (WCA_{Axe1}) et une seconde valeur lorsque l'axe de la caméra est perpendiculaire à l'axe des guides. A titre d'exemple, pour le composant dit de référence, fabriqué selon le protocole de la Figure C.2, l'angle de contact WCA_{Axe1} vaut $79 \pm 4^\circ$ et l'autre angle WCA_{Axe2} vaut $110 \pm 8^\circ$. Pour simplifier la comparaison des résultats obtenus sur les différents composants, nous présentons sur la Figure C.9 uniquement les valeurs d'angle de contact WCA_{Axe1} . A gauche, sont présentés les résultats obtenus avec le précurseur TEOS ; à droite, sont présentés les résultats obtenus avec le mélange de précurseurs TEOS + OTMS.

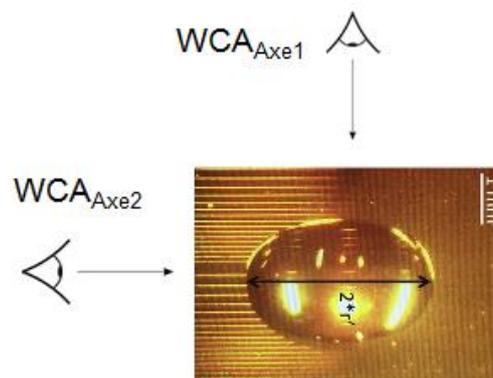


Figure C.8. Sur une surface structurée avec les guides droits, la goutte adopte une forme de demi-ellipsoïde, donnant lieu à deux angles de contact différents. Dans notre étude, nous garderons arbitrairement l'angle le plus petit, à savoir WCA_{Axe1} .

Comme on peut le voir sur la Figure C.9, la surface de référence non fonctionnalisée présente un angle de contact moyen de $79 \pm 4^\circ$. Les surfaces fonctionnalisées pleine plaque avec TEOS

sont plus hydrophiles, avec un angle de contact de $47 \pm 2^\circ$. A l'inverse, les surfaces fonctionnalisées pleine plaque avec le mélange TEOS + OTMS sont plus hydrophobes, avec un angle de contact de $103 \pm 4^\circ$. Ce résultat est tout à fait intuitif. Pour notre stratégie de fonctionnalisation partielle, elle donne lieu à des mouillabilités intermédiaires. En effet, lorsque TEOS est utilisé pour fonctionnaliser uniquement entre les guides d'onde, l'angle de contact est de $50 \pm 6^\circ$. Dans le cas du mélange TEOS + OTMS, cette valeur est de $96 \pm 5^\circ$. Ces résultats sont donc tout à fait concordants avec des surfaces partiellement fonctionnalisées : les gouttes d'eau sont déposées à cheval sur des zones plus ou moins hydrophiles, et l'angle de contact ne permet que d'en déduire un comportement global.

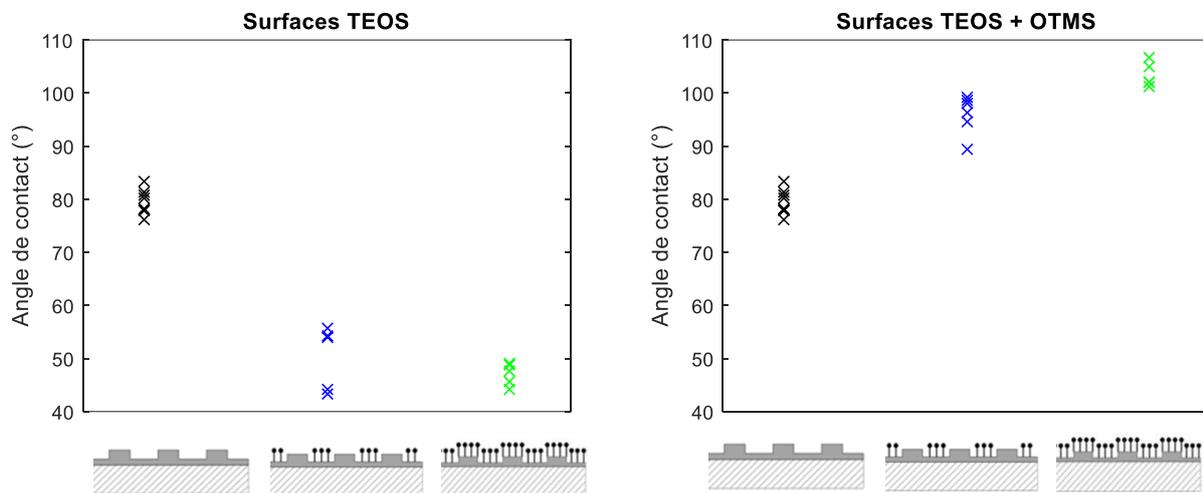


Figure C.9. Valeurs des angles de contact obtenues en analysant la surface : des composants non fonctionnalisés (croix noires), des composants fonctionnalisés entre les guides (croix bleues) et des composants fonctionnalisés pleine plaque (croix vertes) ; à gauche en utilisant le précurseur TEOS, et à droite en utilisant le mélange de précurseurs TEOS + OTMS.

Cette caractérisation globale avec un angle de contact moyen ne permet pas de différencier les zones fonctionnalisées des zones non fonctionnalisées. Cependant, on peut observer les images du front de contact d'une goutte d'eau déposée sur les différentes surfaces. La Figure C.10 regroupe les images obtenues dans trois cas différents : dans le premier cas, une goutte d'eau a été déposée sur un composant de référence non fonctionnalisé (Figure C.10.A) ; dans le deuxième cas la goutte a été déposée sur un composant fonctionnalisé entre les guides avec le précurseur TEOS (Figure C.10.B) ; et dans le troisième cas, la goutte a été déposée sur un composant fonctionnalisé entre les guides avec le mélange de précurseurs TEOS + OTMS

(Figure C.10.C). Dans tous les cas, la goutte recouvre plusieurs guides d'onde. Dans le premier cas (Figure C.10.A), on peut constater qu'il n'y a aucune différence de mouillabilité entre la surface des guides et les zones entre les guides. Cependant, le profil de la goutte change dès lors qu'elle est déposée sur les composants fonctionnalisés sélectivement, mettant en évidence les contrastes de mouillabilité. Effectivement, l'eau minimise son interaction avec les zones plus hydrophobes, et maximise son interaction avec les zones plus hydrophiles. Ainsi, lorsque les zones entre les guides sont fonctionnalisées avec le précurseur TEOS, la goutte d'eau maximise son contact avec ces zones plus hydrophiles (Figure C.10.B). C'est tout le contraire qui se produit lorsque la fonctionnalisation fait intervenir le mélange de précurseurs TEOS + OTMS : l'eau maximise le contact avec les guides d'onde, car relativement moins hydrophobes (Figure C.10.C).

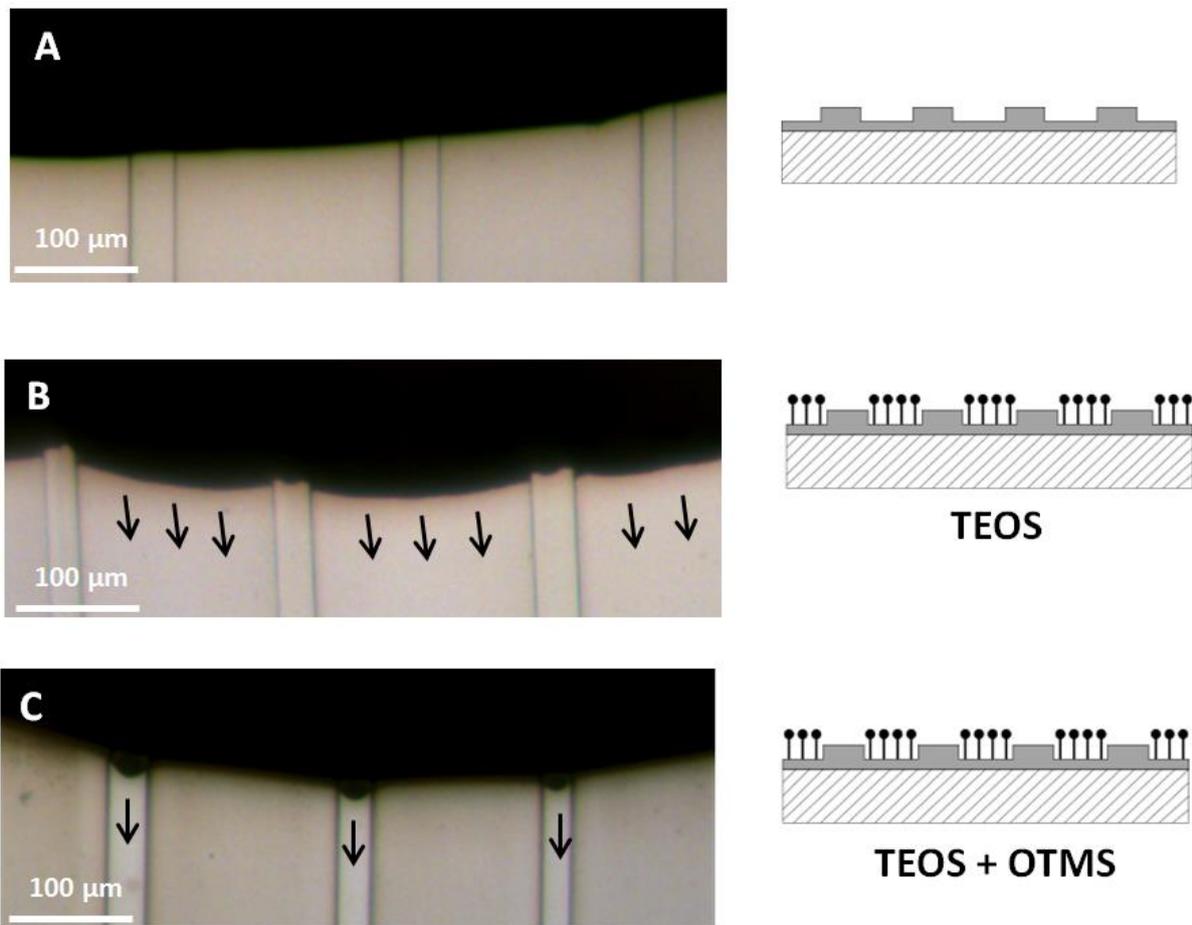


Figure C.10. Photographies optiques des fronts de contact d'une goutte d'eau déposée : sur un composant de référence non fonctionnalisé (A) ; sur un composant dont les zones entre les guides ont été fonctionnalisées avec le précurseur TEOS (B) ; et sur un composant dont les zones entre les guides ont été fonctionnalisées avec le mélange de précurseurs TEOS + OTMS (C).

Ces analyses de mouillabilité (mesure de l'angle de contact et observation du front de contact) démontrent que la fonctionnalisation des zones entre les guides avec le précurseur TEOS rend la surface globalement plus hydrophile, et que ce comportement hydrophile est en effet plus prononcé entre les guides d'ondes. A l'inverse, en utilisant le mélange de précurseurs TEOS + OTMS, la surface devient globalement plus hydrophobe, avec une hydrophobie plus prononcée entre les guides. Ces observations, certes rudimentaires, sont à même de valider le protocole de fonctionnalisation sélective présenté sur la Figure C.5.

(iii) Microscopie à fluorescence

Afin de consolider ce résultat, nous avons toutefois cherché une méthode plus probante, qui permette de valider définitivement le protocole de fonctionnalisation des zones entre les guides. Nous avons donc décidé de choisir un nouveau précurseur organosilane qui porte une fonction fluorescente [Echalier2016] : la fluorescéine (Figure C.11). La chimie de l'accrochage sur nos surfaces chalcogénures est identique : l'accrochage est covalent et préférentiellement via la formation de groupement Te-O-Si. Mais cette fois-ci, la partie fluorescente de la molécule va nous permettre de suivre localement l'immobilisation de l'organosilane, et donc de démontrer plus facilement la sélectivité de la fonctionnalisation.

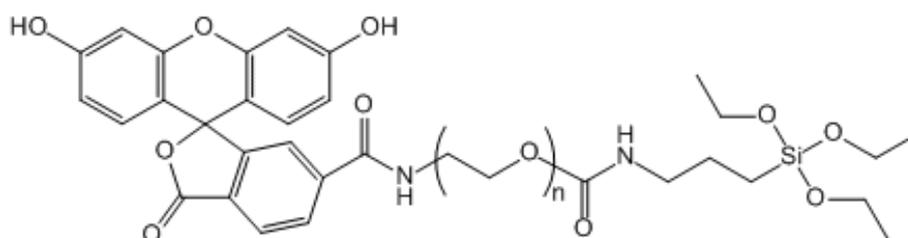


Figure C.11. Formule semi-développée du précurseur fluorescent silylé, portant une fonction fluorescéine

Pour préparer la solution colloïdale de dip coating, la fluorescéine silylée est dissoute à raison de 10 mg.ml⁻¹, soit environ à 1% massique, dans un mélange d'éthanol (90 % volumique) et d'acide chlorhydrique à pH 1,5 (10 % volumique). La vitesse de dip coating est augmentée par rapport à la vitesse utilisée pour les expériences décrites dans le chapitre B (de 10 à 20

centimètres par minutes) afin d'obtenir un dépôt plus épais [Crawford2006], et donc plus de signal fluorescent. Les spectres d'excitation et d'émission de la fluorescéine sont présentés sur la Figure C.12. Pour observer la surface, le microscope est équipé de filtres et d'un miroir dichroïque adaptés à ces spectres.

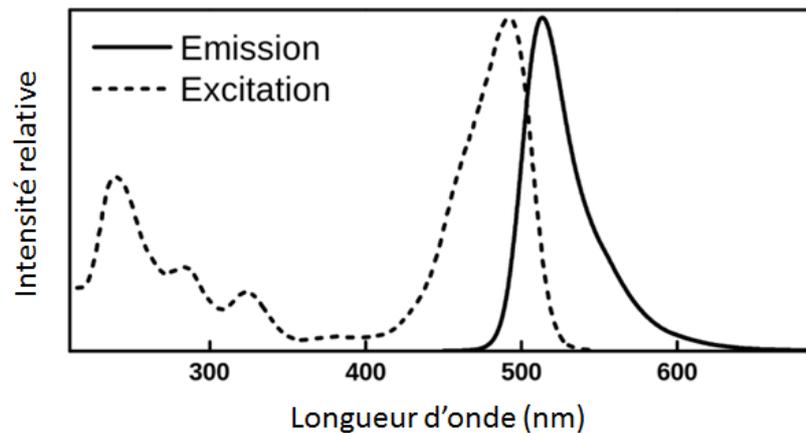


Figure C.12. Spectres d'excitation et d'émission de la fluorescéine.

Les images de microscopie à fluorescence sont présentées sur la Figure C.13. Comme on peut le constater, après fonctionnalisation la fluorescence est présente sur toute la surface, même sur la résine (Figure C.13.A). Il est donc possible que l'organosilane se soit physisorbé ou accroché chimiquement sur la résine, à supposer qu'il y ait des groupements hydroxyles. On peut aussi supposer que la résine est légèrement fluorescente, du fait de ses nombreux composés phénoliques.

Après nettoyage à l'acétone, la résine est dissoute et évacuée, laissant le chalcogénure à nu. Sur l'image en fluorescence correspondante (Figure C.13.B), les guides d'onde apparaissent alors noirs, sans marquage, tandis que les zones entre les guides restent lumineuses.

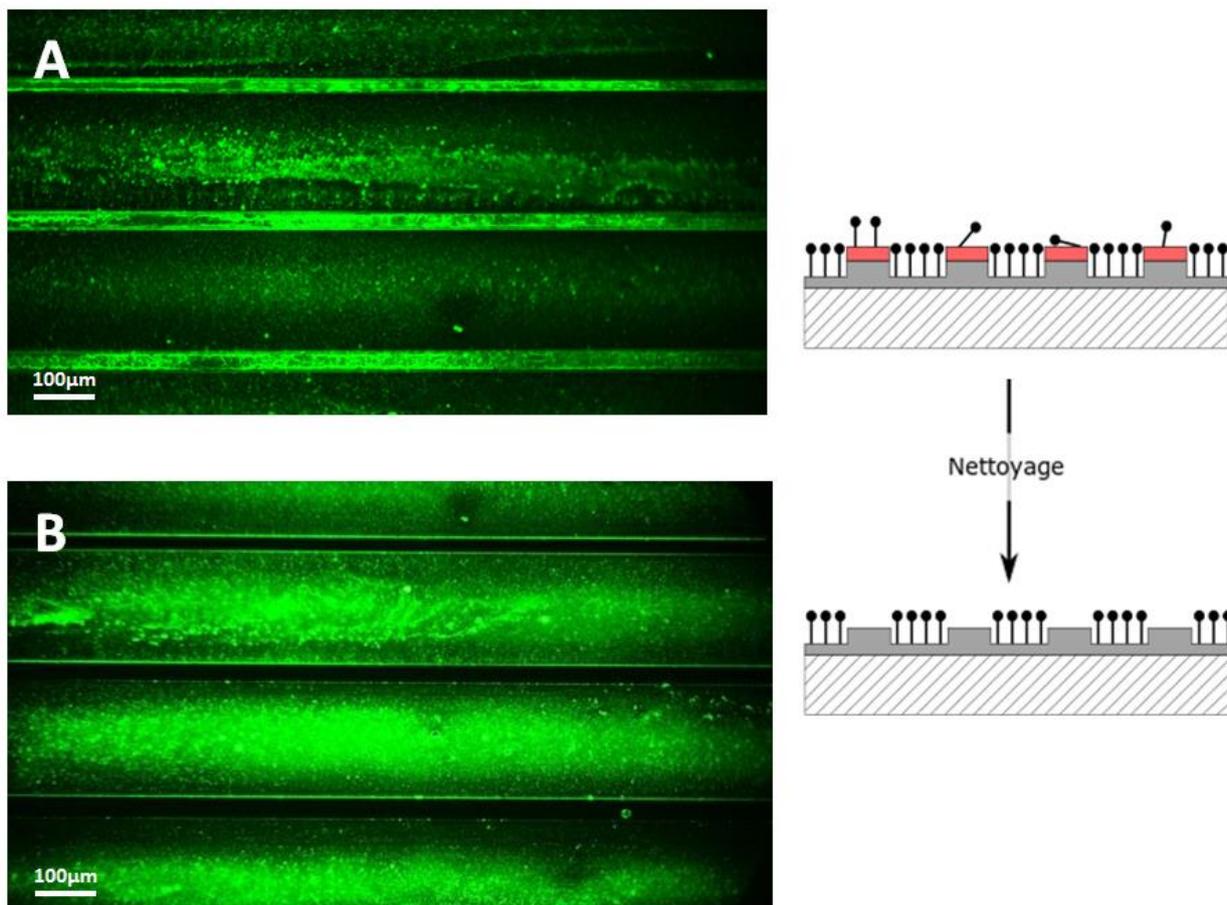


Figure C.13. Images de fluorescence des surfaces après fonctionnalisation (A) et après nettoyage à l'acétone (B). Sur chaque image, la luminosité et le contraste sont optimisés.

Pour compléter ces images, le profil d'intensité lumineuse est donné sur la Figure C.14. Ce profil permet de mieux mettre en évidence le contraste entre les zones fonctionnalisées et les zones non fonctionnalisées. L'intensité du signal fluorescent est effectivement concentrée entre les guides d'ondes. Les deux figures C.13 et C.14 démontrent donc explicitement la sélectivité de l'accrochage. L'organosilane est accroché uniquement sur les zones entre les guides d'onde.

A titre de référence, une surface sans résine est fonctionnalisée puis nettoyée à l'acétone. L'image de fluorescence et le profil d'intensité sont regroupés sur la Figure C.15 : toute la surface est caractérisée par la même intensité de fluorescence.

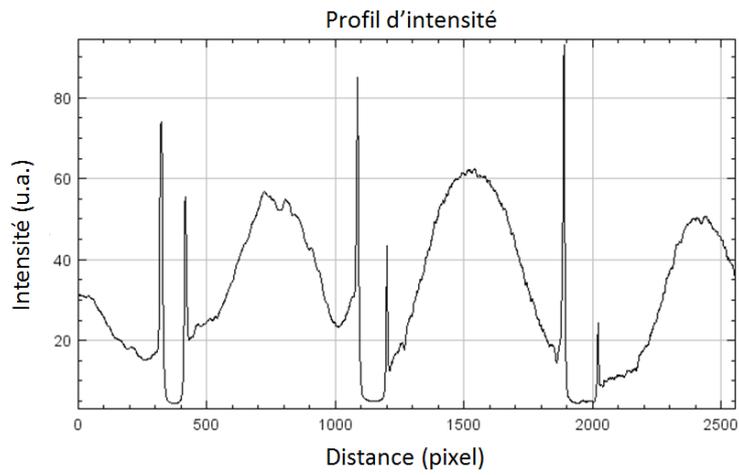


Figure C.14. Profil d'intensité de la surface fonctionnalisée entre les guides avec l'organosilane fluorescent. Les créneaux où l'intensité est quasiment nulle correspondent aux guides d'onde.

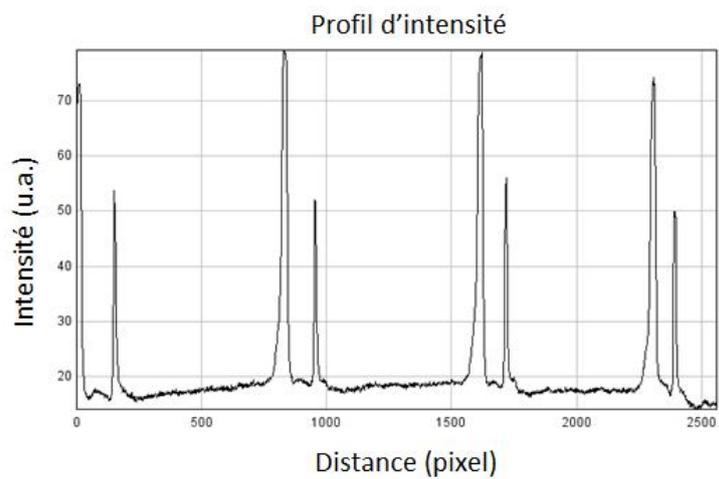
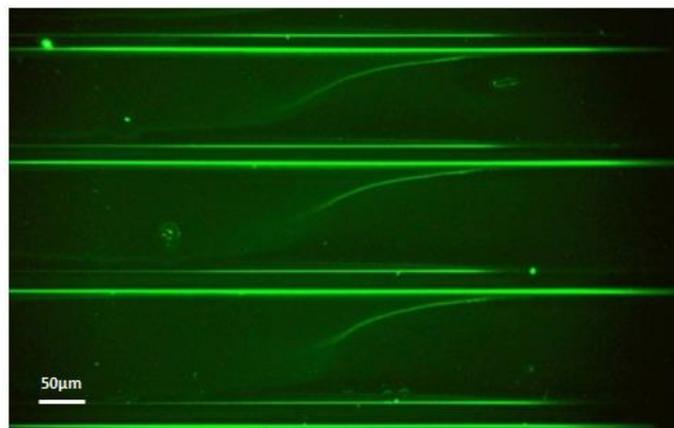


Figure C.15. En haut : image de microscopie à fluorescence d'une surface fonctionnalisée pleine plaque avec la fluorescéine. Remarque : la luminosité et le contraste sont optimisés. En bas : profil de l'intensité lumineuse correspondante.

Ces images et ces profils démontrent la faisabilité de notre stratégie de fonctionnalisation. On peut également remarquer sur toutes les images, et surtout sur les profils, la forte intensité du signal sur les flancs des guides. En effet, cette intensité est jusqu'à 4 fois plus importante sur le profil de la surface de référence (Figure C.15, en bas). Cette observation peut s'expliquer par plusieurs causes : (i) Les flancs des guides sont presque verticaux (65°), l'objectif du microscope intègre donc l'intensité lumineuse sur une plus grande surface, (ii) les flancs sont rugueux, de l'ordre de la centaine de nanomètres ; la surface spécifique est donc plus grande, et il y a plus de sites d'accrochage. Enfin, (iii) le dip coating sur des surfaces non planes n'est pas homogène. Lors du retrait de la surface, la solution de précurseur maximise le contact avec la surface, et se concentre sur les flancs.

L'utilisation de la fluorescéine comme précurseur s'avère un choix judicieux pour mettre en évidence la sélectivité de la fonctionnalisation. La fluorescence permet de suivre localement, à l'échelle microscopique, l'accrochage de l'organosilane. Ainsi, les zones entre les guides sont effectivement fonctionnalisées, tandis que les guides d'ondes restent à découvert. Cette stratégie de fonctionnalisation, qui consiste à ne fonctionnaliser que les zones entre les guides d'onde, peut être envisagée pour la détection des spores à condition d'utiliser un précurseur qui apporte de l'hydrophilie à la surface, comme le TEOS. En effet, si les zones entre les guides sont plus hydrophiles que les surfaces des guides d'onde, on peut espérer que les spores se déposeront préférentiellement sur les guides et seront donc plus à même d'être détectées.

Cette approche de modification de la surface s'intègre facilement dans le procédé de fabrication des guides d'onde. Elle présente en outre un autre intérêt : le dessus des guides n'est pas recouvert d'organosilanes. Cette fonctionnalisation s'affranchit donc en partie des éventuelles altérations des conditions de guidage de la lumière infrarouge.

C.II.2. Fonctionnalisation des guides d'onde

Une stratégie plus élégante consiste non plus en la fonctionnalisation des zones situées entre les guides d'onde mais en la fonctionnalisation des guides d'ondes eux-mêmes. Dans notre étude sur l'accrochage des spores, cela supposera d'utiliser le mélange de précurseurs TEOS + OTMS, de sorte à rendre les guides d'onde plus hydrophobes que les zones entre les guides.

Mais pour valider la voie de fonctionnalisation sélective choisie, le précurseur fluoroscéine a été utilisé.

C.II.3.a. Protocole

Pour réaliser une telle fonctionnalisation, nous avons adapté notre procédé de fabrication des guides. La résine résiduelle est toujours utilisée comme masque. Cependant, cette fois-ci, la résine permettra de réaliser un lift-off avec un second masque sacrificiel. Le masquage se retrouve alors inversé. La Figure C.16 résume les étapes d'une telle fabrication.

Les premières étapes de fabrication restent inchangées. Après la gravure ionique du Ge-Se-Te, une très fine couche métallique est déposée par évaporation. La résine est ensuite dissoute dans l'acétone, emportant avec elle le dépôt de métal au-dessus. Ce lift-off permet donc d'inverser le masque : les guides sont découverts, tandis que le reste de la surface est protégé par la couche métallique. La fonctionnalisation de la surface peut avoir lieu. Après fonctionnalisation, la couche métallique est enfin gravée, emportant avec elle les éventuels organosilanes. Finalement, seul le dessus des guides est fonctionnalisé.

Il est à noter que l'or, pour son inertie vis à vis de l'oxydation, a d'abord été privilégié. Toutefois, des groupements Au_2O_3 ont été identifiés sur des surfaces en or après plasma oxygène, et ce dans des conditions peu différentes des nôtres [Fush2009]. Ces groupements sont peu stables à température ambiante et pression atmosphérique [Fuchs2009][Tsai2003]. Une autre difficulté liée à l'utilisation de l'or est sa gravure avec l'iodure de potassium. Elle s'est en effet avérée néfaste pour les couches chalcogénures et les organosilanes. C'est pourquoi l'aluminium a finalement été privilégié. Ce métal s'oxyde et peut être fonctionnalisé, avec la formation de ponts Al-O-Si [Zhang2011b][Milosev2012]. La gravure de l'aluminium peut ensuite être réalisée avec de l'acide chlorhydrique [Oh2007][Yildiz2016]. L'acide est déjà utilisé dans la solution colloïdale, et il a donc été vérifié qu'il était inerte vis-à-vis de la couche fonctionnalisée.

Finalement, la couche sacrificielle métallique consiste donc en une vingtaine de nanomètres d'aluminium, déposés par évaporation. Cette couche mince sera gravée après fonctionnalisation avec de l'acide chlorhydrique à 1%, soit $0,3 \text{ mol.l}^{-1}$. Pour suivre le déroulement du lift-off, des observations au microscope optique ont été effectuées. Les images correspondantes sont données sur la Figure C.17.

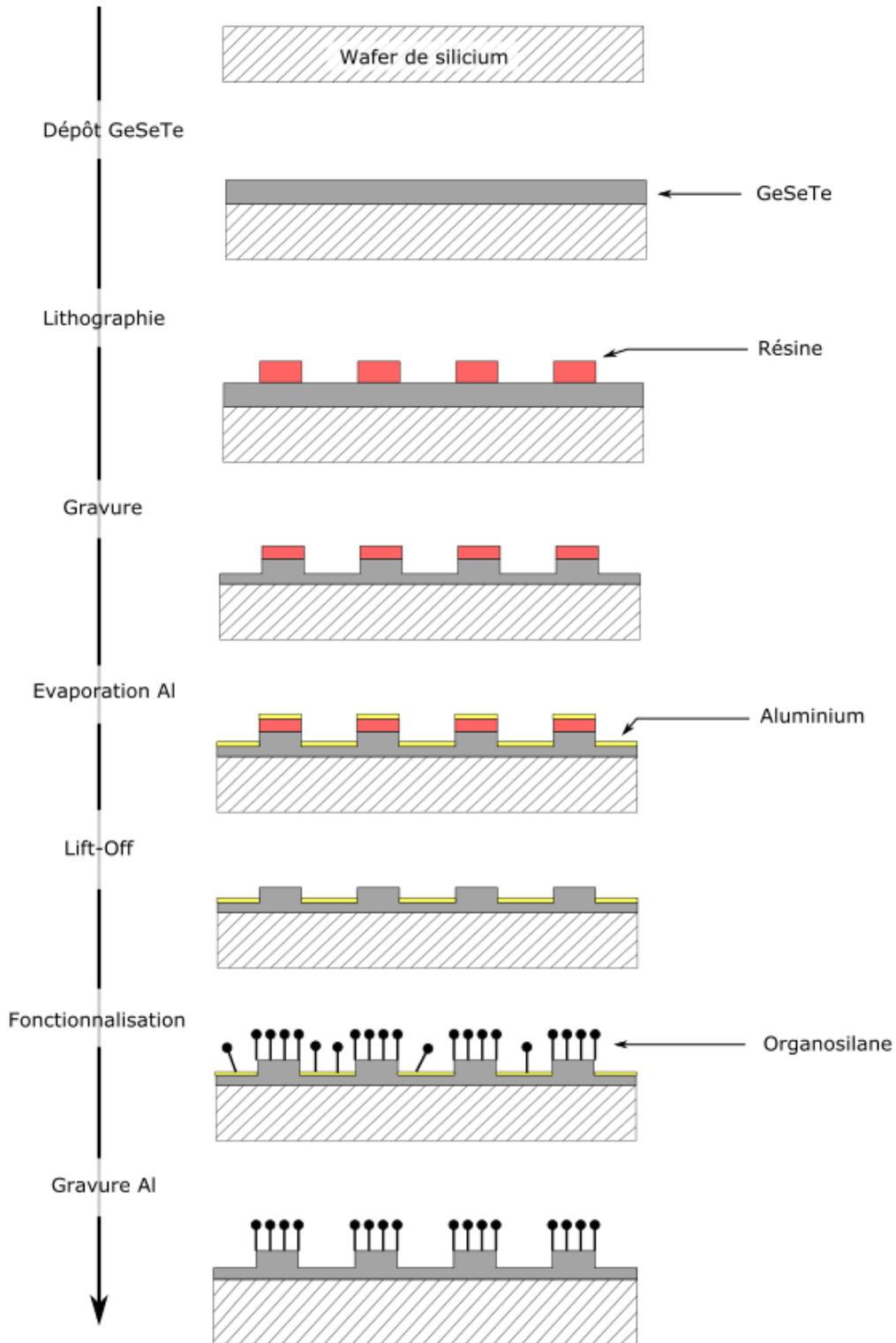


Figure C.16. Schéma résumant la fabrication des guides d'onde avec fonctionnalisation sur le dessus des guides. Dans ce schéma, le métal utilisé pour l'étape de lift-off est l'aluminium.

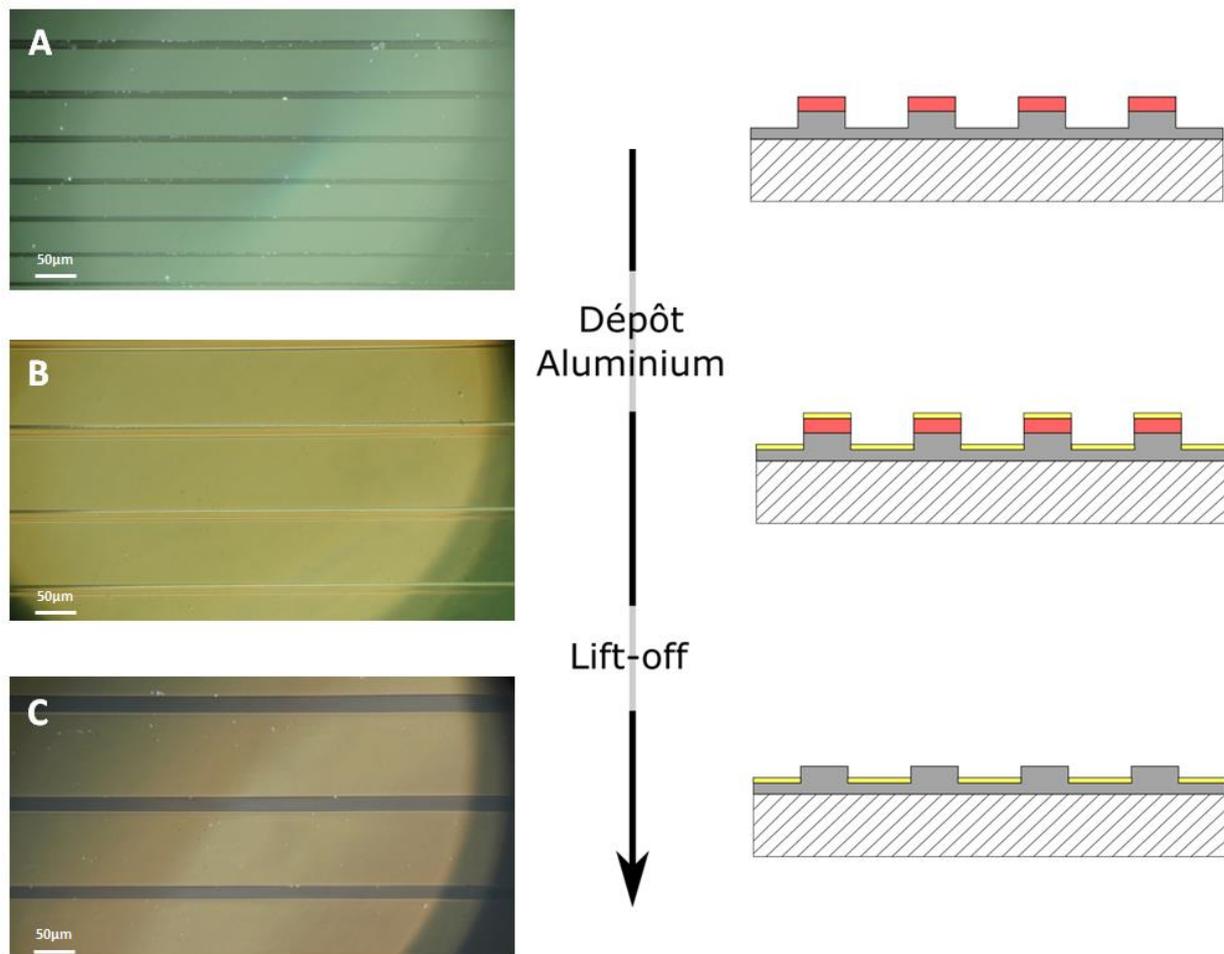


Figure C.17. Images de microscopie optique : (A) de la surface après usinage ionique avec la résine sur les guides ; (B) de la surface après évaporation de 20 nanomètres de métal, beaucoup plus réfléchissante et (C), de la surface après dissolution de la résine.

Une fois l'étape de lift-off réalisée, on obtient donc des surfaces recouvertes d'aluminium entre les guides d'onde et des guides d'onde à découvert (Figure C.17.C). On procède alors à l'étape de fonctionnalisation. Comme la fluorescéine a été utilisée comme précurseur, la seule caractérisation qui a été effectuée est de l'imagerie en spectroscopie de fluorescence.

C.II.3.b. Caractérisation

Les images de microscopie à fluorescence obtenues sont présentées sur la Figure C.18. Après fonctionnalisation, la surface entière est recouverte d'organosilanes (Figure C.18.A). La concentration en précurseurs est même plus importante entre les guides que sur les guides. Cette différence peut s'expliquer par les effets de mouillabilité pendant le retrait de la surface lors du dip coating : les creux sont plus remplis que les guides. Cette différence s'explique

aussi par l'effet de la couche métallique inférieure. En effet, là où le chalcogénure absorbe la lumière visible, la couche métallique la reflète. Ce phénomène optique est d'ailleurs fortuitement illustré plus haut par la Figure C.17.C.

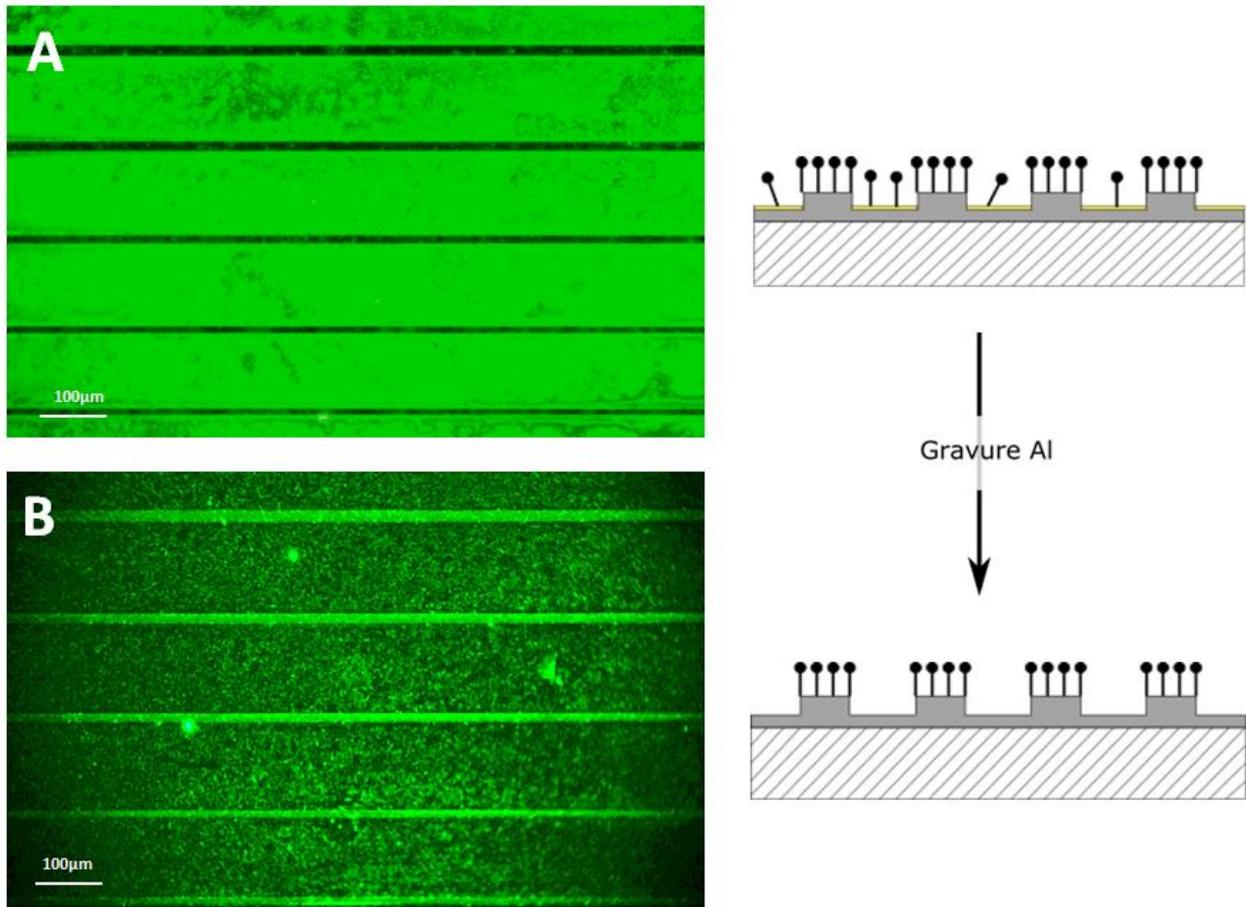


Figure C.18. Images de microscopie à fluorescence, avant gravure avec l'acide chlorhydrique (A), et après gravure (B). Sur les deux images, la luminosité et le contraste sont optimisés.

Après gravure de l'aluminium, la fluorescence se concentre effectivement sur le dessus des guides (Figure C.18.B). Le profil d'intensité de fluorescence correspondant à l'image C.18.B confirme le contraste d'intensité (Figure C.19). Les deux figures C.18 et C.19 démontrent explicitement la sélectivité de l'accrochage. L'intensité lumineuse est plus importante sur les guides d'onde, démontrant que l'accrochage covalent de l'organosilane est préféré sur ces zones. Si les zones entre les guides paraissent lumineuses, les valeurs d'intensité ne dépassent pas les valeurs du bruit de fond. En effet une surface chalcogénure de référence a été soumise à la même exposition sous le microscope, et les valeurs d'intensité obtenues étaient les

mêmes. Ce signal résiduel provient vraisemblablement du temps d'exposition long (30 secondes) qui permet à quelques photons d'atteindre la caméra.

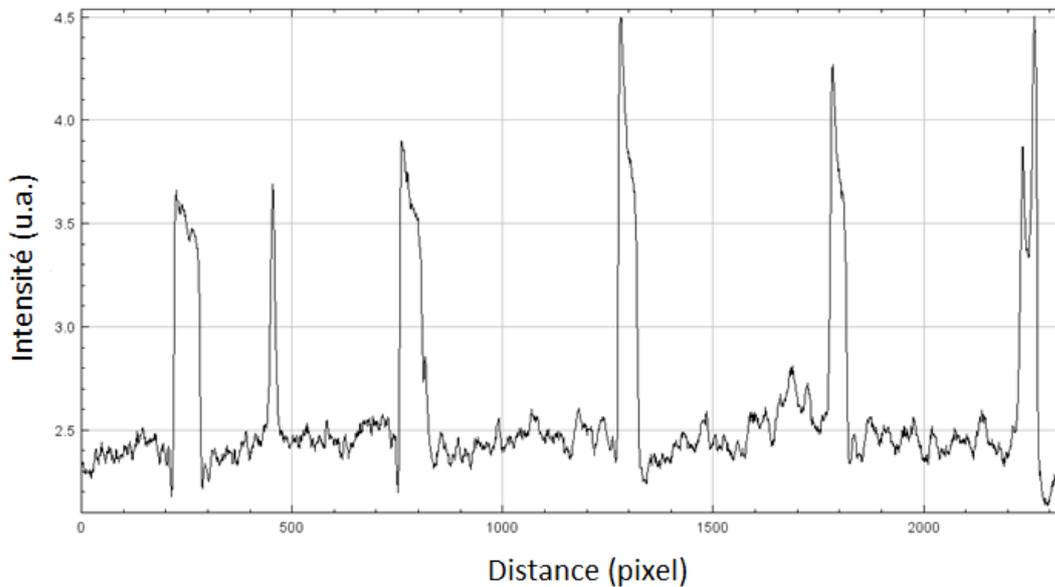


Figure C.19. Profil d'intensité de fluorescence pour la fonctionnalisation sur le dessus des guides. Les créneaux où l'intensité est la plus forte correspondent aux guides d'onde.

On peut constater sur la Figure C.19 que le contraste en intensité de fluorescence est relativement peu prononcé, notamment en comparaison avec ce qui avait été obtenu dans le cadre de la première stratégie de fonctionnalisation sélective (Figure C.14). Mais le protocole pourra sans doute être optimisé afin d'obtenir un contraste plus important. Il pourra par exemple être envisagé de se tourner vers un autre métal pour l'étape de lift-off, ou bien de changer le bain utilisé pour la gravure de l'aluminium. En effet, l'utilisation de l'aluminium comme masque sacrificiel n'est pas sans difficulté :

- l'épaisseur de la couche mince d'aluminium n'est pas homogène car trop fine. Déposer 20 nanomètres de métal par évaporation est à la limite de la technologie.

- la gravure de l'aluminium avec HCl est hétérogène [Yildiz2016]. Dans notre cas, nous avons quand même procédé à ce type de gravure car elle préserve les organosilanes et la fonction fluorescente. Les procédés standards de gravure de l'aluminium font généralement plutôt intervenir un mélange des acides nitrique, phosphorique et acétique [GmbH2013].

- la gravure de l'aluminium peut affecter la surface des couches Ge-Se-Te. Une chimie plus douce pourrait peut-être être envisagée.

La stratégie de fonctionnalisation adoptée, qui permet de ne fonctionnaliser que les guides d'onde, peut malgré tout être validée. Elle pourra être envisagée pour la détection des spores en utilisant un précurseur qui apportera de l'hydrophobie à la surface, comme le mélange TEOS + OTMS. En effet, si les guides d'onde sont plus hydrophobes que les zones entre les guides, on peut supposer que les spores se déposeront préférentiellement sur les guides.

C.III. Conclusion

Les travaux réalisés dans ce chapitre ont permis d'identifier, de réaliser, et de caractériser deux nouvelles stratégies de fonctionnalisation sélective spatialement. Ces deux stratégies impliquent la réutilisation de la résine résiduelle après gravure. Cette résine est utilisée pour réaliser le masquage pendant la fonctionnalisation. La première stratégie, très simple à mettre en œuvre, consiste en la fonctionnalisation des zones situées entre les guides d'ondes. La deuxième stratégie consiste, à l'inverse, en la fonctionnalisation des guides d'onde uniquement. Cette deuxième stratégie nécessite une étape de lift-off supplémentaire.

Les deux stratégies de fonctionnalisation ont pu être validées grâce à l'utilisation d'un précurseur fluorescent. La Figure C.20 résume les résultats obtenus : à gauche, les zones entre les guides sont fonctionnalisées ; à droite, à l'inverse, ce sont les guides qui ont été fonctionnalisés. Dans les deux cas, l'intensité de fluorescence est plus importante sur les zones fonctionnalisées, ce qui permet de valider les voies de fonctionnalisation utilisées.

On peut toutefois noter un léger décalage entre les résultats obtenus et le cas idéal : dans l'image en haut à gauche, on voit que les flancs des guides sont très fluorescents, alors qu'idéalement il aurait été préférable qu'ils ne soient pas fonctionnalisés. En effet, comme illustré sur la Figure C.1, le champ évanescent est présent aussi bien sur les guides que sur leurs flancs : les flancs font donc intégralement partie des zones dites « sensibles » des capteurs que l'on souhaite réaliser. De la même manière, on peut voir dans l'image de droite dans la Figure C.20 que les flancs ne sont pas aussi fluorescents que la surface des guides : cela signifie qu'ils n'ont pas été fonctionnalisés, alors qu'idéalement il aurait été préférable qu'ils

le soient. Ce résultat était toutefois prévisible : la résine résiduelle n'est présente qu'à la surface des guides.

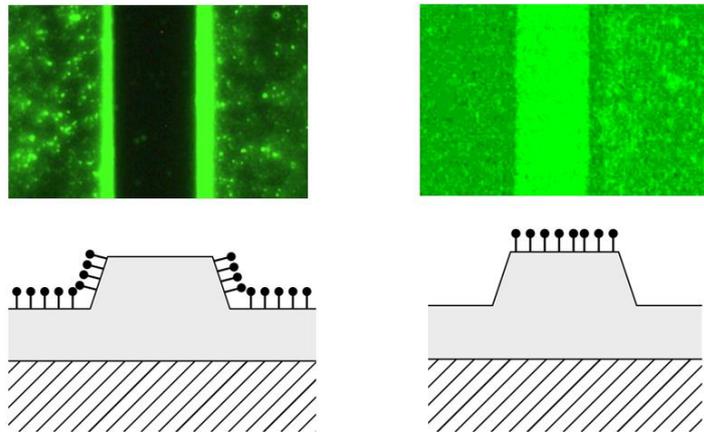


Figure C.20. En haut, images obtenues en spectroscopie de fluorescence pour les deux stratégies de fonctionnalisation utilisées ; en bas, schémas correspondant à la fonctionnalisation effective.

CHAPITRE D

-

Vers la détection des spores

Ce dernier chapitre est dédié aux travaux réalisés avec les spores des champignons phytopathogènes. Nous avons principalement travaillé avec le Fungi *Magnaporthe oryzae* (aussi appelé *Pyricularia oryzae*), de la famille des ascomycètes. Ce champignon est responsable de la pyriculariose, la principale maladie du riz. La souche en question, *Magnaporthe oryzae* pv. *FR94*, a été prélevée dans la région, sur du riz infecté (voir Figure D.1.A). Sa manipulation et son déplacement entre laboratoires ne comportent aucun risque épidémiologique. La culture de ce Fungi en laboratoire est par ailleurs facile, et conduit à une production très importante de spores.

La première partie de ce chapitre est consacrée à l'immobilisation des spores sur les couches minces chalcogénures fonctionnalisées, ainsi que sur les guides d'onde partiellement ou intégralement fonctionnalisés. La seconde partie porte sur les mesures optiques. Des premiers tests ont été réalisés avec des spectromètres de laboratoire. Ces caractérisations permettent d'appréhender les phénomènes optiques survenant lors de l'interaction entre les spores et la lumière infrarouge. La réponse spectrale des guides d'onde a ensuite été étudiée : ces mêmes spores ont été déposées sur les guides d'onde Ge-Se-Te, et les spectres en sortie de guide ont été enregistrés. Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour isoler l'impact du dépôt des spores sur les spectres.

D.1. Immobilisation des spores sur les surfaces chalcogénures Ge-Se-Te

L'étude bibliographique sur l'accrochage des spores, exposée dans le chapitre A de ce manuscrit, a permis d'identifier la mouillabilité comme étant un des paramètres déterminants de l'immobilisation des spores. Nous avons donc modifié nos surfaces chalcogénures Ge-Se-Te pour les rendre plus hydrophiles ou plus hydrophobes, en les fonctionnalisant avec le précurseur TEOS ou un mélange des précurseurs TEOS et OTMS, respectivement (chapitre B). Nous nous sommes ensuite intéressés dans le chapitre C à la fonctionnalisation partielle ou intégrale des structures guidantes rectilignes, identiques à nos guides d'onde fonctionnant dans l'infrarouge. Nous avons testé la fonctionnalisation des zones gravées uniquement (zones entre les guides d'onde dans un composant) et au contraire la fonctionnalisation sélective des zones non gravées (constituant donc les guides d'onde). Dans ce paragraphe, nous allons maintenant étudier l'accrochage des spores sur ces surfaces : couches minces

Ge-Se-Te fonctionnalisées d'abord, puis guides d'onde partiellement ou intégralement gravés ensuite.

D.I.1. Protocole

Avant de réaliser les tests d'accrochage des spores, nous nous sommes tournés vers la littérature. Les spores étant hydrophobes, les solutions de spores déposées sur les surfaces étudiées contiennent un surfactant tel que du Tween®80 [Arreola2016][Arreola2017] ou du PBS [Nugaeva2007] ; elles peuvent également être diluées dans de l'éthanol [Braun1994]. Après un certain temps d'incubation, les surfaces inoculées par ces solutions sont rincées, éventuellement dans un bain à ultrasons [Arreola2016][Arreola2017][Braun1994]. Les spores décrochées peuvent être récupérées dans un milieu de culture et comptées par unité formant colonie [Braun1994][Oberlaender2018]. Les spores peuvent être également comptées directement sur la surface d'étude à l'aide d'un simple microscope optique [Nugaeva2007].

Dans ce travail, nous avons voulu réaliser les dépôts de spores sur nos surfaces Ge-Se-Te dans des conditions se rapprochant au plus près des conditions réelles. Nous avons donc préféré travailler uniquement avec de l'eau sans surfactant. Néanmoins, pour permettre une bonne dispersion de ces espèces hydrophobes, et éviter l'agglomération de celles-ci, nous avons utilisé un pulvérisateur. Le protocole utilisé est donc le suivant.

Les spores phytopathogènes (de Magnaporthe dans notre cas) provenant du Cirad ont été décongelées, puis mises en culture dans des boîtes de pétri. Le milieu de culture consiste en une farine de riz gélosé permettant une croissance rapide du pathogène. Cette croissance est réalisée sous éclairage artificiel dans une chambre tempérée pendant une dizaine de jours. Passée cette incubation, les spores recouvrent la surface des boîtes de pétri (Figure D.1.B) mais restent fixées sur le mycélium. Pour récupérer uniquement les spores, la surface est grattée avec quelques ml d'eau distillée. La solution obtenue est récupérée puis filtrée pour en retirer le mycélium (Figure D.1.C). La solution finale présente une concentration en spores de plusieurs millions par millilitre d'après le comptage avec une cellule de Malassez ; elle est placée dans un petit pulvérisateur (Figure D.1.D).

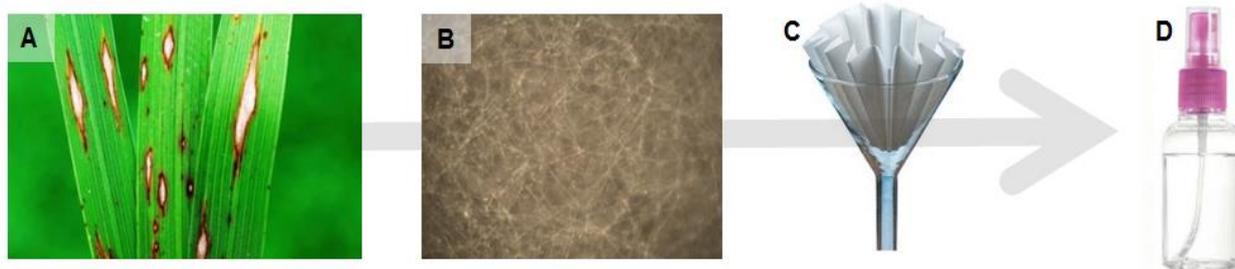


Figure D.1. Schéma du protocole de préparation des solutions pour réaliser les tests d'accrochage des spores de *Magnaporthe* sur nos surfaces chalcogénures.

Ce petit pulvérisateur est enfin utilisé pour disperser des spores sur les surfaces chalcogénures. Après pulvérisation, les surfaces sont ainsi recouvertes de spores, avec une répartition homogène, à raison d'une cinquantaine de spores par mm^2 (Figure D.2.B). Vingt minutes après la pulvérisation, les surfaces sont rincées en y faisant ruisseler 3 millilitres d'eau grâce à une pipette (Figure D.2.C). Ce rinçage s'apparente à l'action de l'eau de pluie sur les feuilles, et est suffisant pour distinguer les différentes affinités. Pour caractériser l'immobilisation, les spores sont comptées avant et après rinçage [Nugaeva2007]. Le nombre de spores toujours viables n'est pas accessible [Arreola2019][Oberlaender2018], mais l'imagerie permet de localiser les spores. Dans le cas d'une pulvérisation sur des composants, l'imagerie permettra donc de différencier les spores détectables (situées sur les guides ou sur les flancs des guides) des spores non détectables (situées entre les guides). Une dizaine d'images de microscopie optique des surfaces est prise après pulvérisation et après rinçage. Ainsi il est possible d'établir combien de spores se sont décrochées, et combien sont restées immobilisées sur les différentes surfaces.

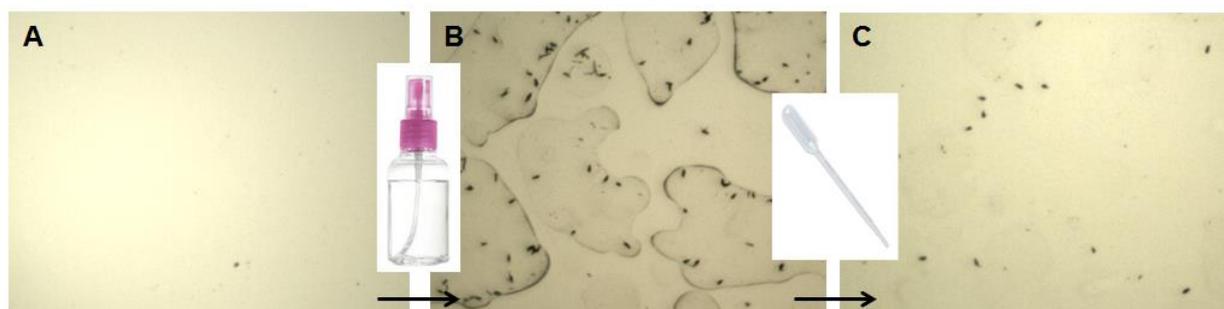


Figure D.2. Images optiques : (A) de la surface chalcogénure Ge-Se-Te fonctionnalisée, (B) de la même surface après pulvérisation des spores et (C) de la même surface après rinçage. Le comptage des spores sur les images (B) et (C) permet d'estimer le pourcentage de spores immobilisées.

D.1.2. Pulvérisation des spores sur les couches minces Ge-Se-Te

Les premiers tests d'accrochage ont été réalisés avec des couches minces de composition $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{15}$; ce matériau correspond aux couches de cœur des guides d'onde étudiés dans le cadre de ce travail de thèse. Ces couches minces ont été utilisées directement après dépôt, afin d'avoir une référence, tandis que d'autres ont été fonctionnalisées : avec le précurseur TEOS pour les rendre plus hydrophiles d'une part, et avec le mélange de précurseurs TEOS + OTMS pour les rendre plus hydrophobes d'autre part. La Figure D.3 rassemble les résultats obtenus pour ces trois surfaces : (i) l'angle de contact pour vérifier l'effet de la fonctionnalisation, et (ii) le pourcentage de spores immobilisées après application du protocole explicité dans le paragraphe précédent. On peut voir sur cette figure que la surface $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{15}$ non fonctionnalisée permet d'immobiliser 59% des spores déposées. Lorsque la surface est rendue plus hydrophile (et donc fonctionnalisée avec le précurseur TEOS), seules 20% des spores sont immobilisées. Lorsque la surface est au contraire rendue plus hydrophobe (c'est-à-dire fonctionnalisée avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS), 82% des spores sont immobilisées. Cette tendance est donc en accord avec la littérature évoquée dans le premier chapitre : les spores, hydrophobes elles-mêmes, sont plus facilement immobilisées sur les surfaces hydrophobes, et l'énergie nécessaire pour les décrocher est donc plus importante.

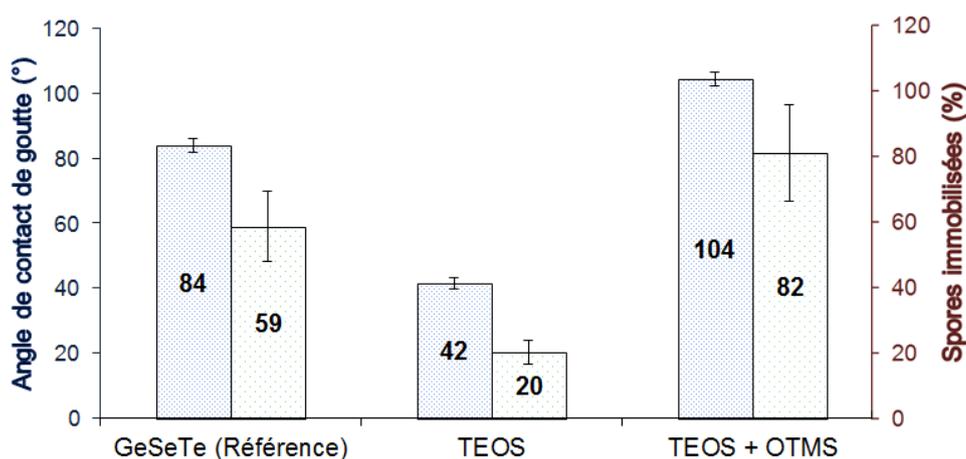


Figure D.3. Angle de contact et immobilisation des spores sur trois surfaces : une couche mince Ge-Se-Te de référence, la même couche mince mais fonctionnalisée avec le précurseur TEOS et la même couche mince fonctionnalisée avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS.

Afin de confirmer ce résultat et de s'affranchir des problèmes liés au rinçage (qui peut ne pas être effectué strictement de la même manière d'une couche à l'autre), nous avons refait ces expériences en travaillant avec deux couches minces fonctionnalisées seulement sur la moitié de leur surface. Nous avons pour cela utilisé deux échantillons : (i) une première couche pour moitié « brute » et pour moitié fonctionnalisée avec le précurseur TEOS, (ii) ainsi qu'une deuxième couche pour moitié « brute » et pour moitié fonctionnalisée avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS. L'avantage de ce nouvel échantillonnage est que la référence (la moitié non fonctionnalisée) subit exactement le même rinçage que les moitiés de couche fonctionnalisées. Les résultats obtenus sont regroupés sur la Figure D.4. Ils dénotent bien de la même tendance.

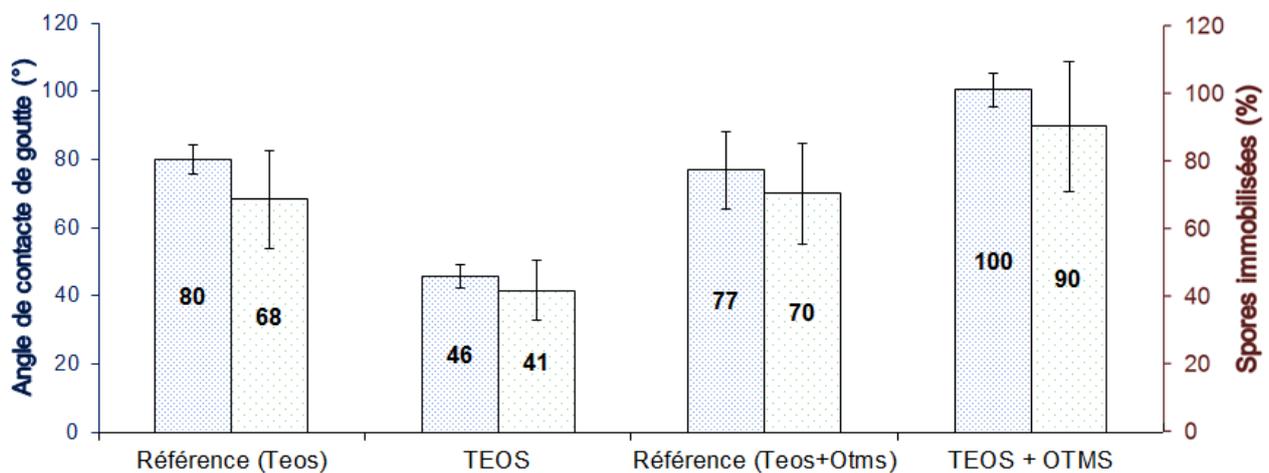


Figure D.4. Angle de contact et immobilisation des spores sur deux échantillons fonctionnalisés sur la moitié de leur surface : avec TEOS pour le premier échantillon et avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS pour le deuxième.

D.I.3. Pulvérisation des spores sur les guides d'onde fonctionnalisés sélectivement

La suite de l'étude est consacrée aux couches minces chalcogénures structurées avec des guides d'onde droits de 4 μm de hauteur. Les deux voies de fonctionnalisation décrites dans le chapitre C leur ont été appliquées, afin d'obtenir une fonctionnalisation dans des zones bien définies. Premièrement, nous avons utilisé le protocole permettant de ne fonctionnaliser que les zones situées entre les guides. Dans ce cas, nous avons utilisé le précurseur TEOS, avec pour objectif de rendre ces zones plus hydrophiles que les guides d'onde eux-mêmes : les

spores devraient alors être préférentiellement immobilisées sur les guides. Ensuite, nous avons utilisé le deuxième protocole décrit dans le chapitre C qui permet de ne fonctionnaliser que les guides d'onde. Pour cette expérience, nous avons utilisé le mélange de précurseurs TEOS et OTMS, en vue de rendre les guides plus hydrophobes. Là encore, cela doit permettre une meilleure immobilisation des spores sur les guides d'onde plutôt que dans les zones entre les guides d'onde.

Le protocole de pulvérisation des spores décrit dans le paragraphe D.1.1 a donc été appliqué sur 3 surfaces : (i) sur les couches minces structurées non fonctionnalisées (qui servent de référence), (ii) sur les couches minces structurées dont les zones entre les guides ont été fonctionnalisées avec le précurseur TEOS et (iii) sur les couches minces structurées dont les guides ont été fonctionnalisés avec le mélange des précurseurs TEOS et OTMS. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux surfaces dans leur globalité, et avons compté toutes les spores immobilisées, indépendamment du fait qu'elles soient situées entre des guides ou sur des guides.

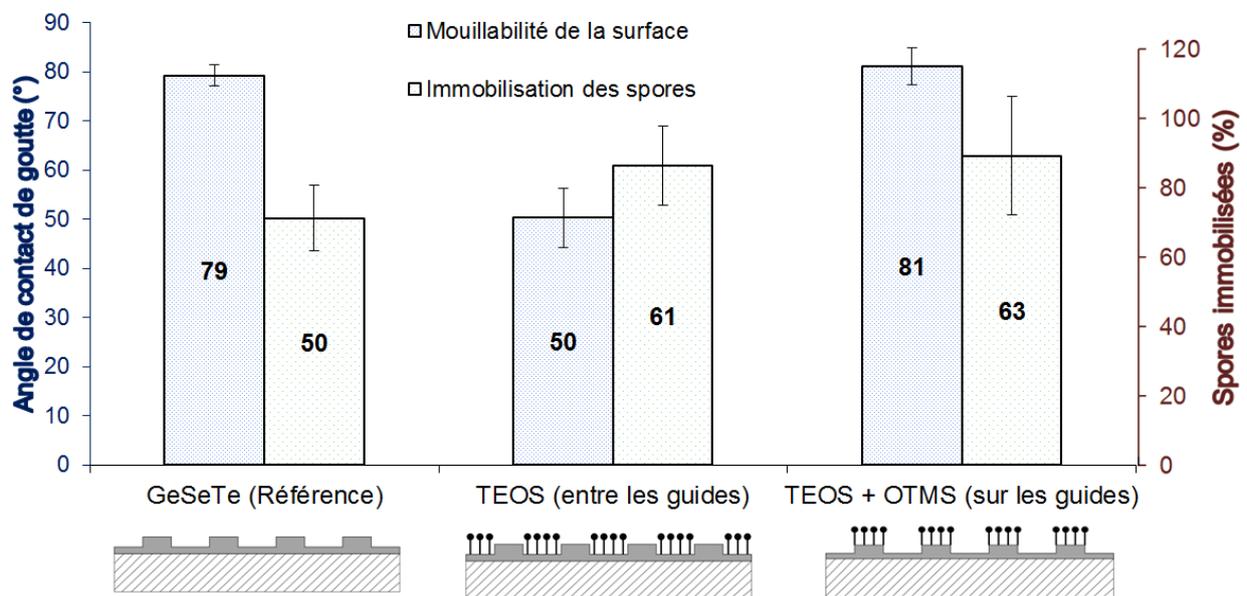


Figure D.5. Angle de contact et immobilisation des spores sur les guides d'onde : à gauche, une surface structurée non fonctionnalisée ; au centre, une surface dont les zones entre les guides d'onde ont été fonctionnalisés avec le précurseur TEOS et à droite, une surface dont les guides d'onde ont été fonctionnalisés avec le mélange des précurseurs TEOS et OTMS.

Les résultats obtenus pour les différentes surfaces sont rassemblés sur la Figure D.5. Les angles de contact mesurés sur les trois surfaces sont également donnés sur la même figure. Il est à noter que dans le cas des surfaces partiellement fonctionnalisées, les gouttes recouvrent à la fois des guides d'onde et les zones entre les guides.

On constate, toujours sur cette figure, que les surfaces structurées par des guides d'onde non fonctionnalisés permettent d'immobiliser 50 % des spores, soit un peu moins que les surfaces dont les zones entre les guides ont été fonctionnalisées avec TEOS (61 %) et que les surfaces dont les guides d'onde ont été fonctionnalisées avec TEOS + OTMS (63 %). Les deux stratégies de fonctionnalisation permettent donc une immobilisation plus importante. Dans le cas des surfaces dont les zones situées entre les guides d'onde ont été fonctionnalisées par le précurseur TEOS, ce résultat est plutôt contre-intuitif : la surface globale étant plus hydrophile que celle de référence.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation des spores immobilisées sur les différentes surfaces. Nous avons en effet fait la distinction entre les spores immobilisées sur les guides ou sur les flancs des guides - celles-là seront détectées optiquement puisque recouvrant le champ évanescent (Figure D.6 : zone encadrée par le rectangle en pointillés) - et les spores immobilisées dans les zones situées entre les guides d'onde - et donc non détectables.

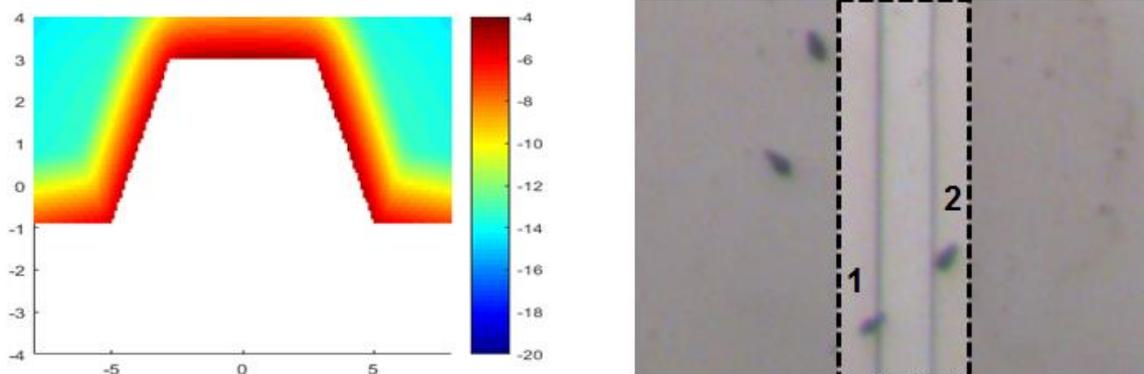


Figure D.6. A gauche : mise en évidence du champ évanescent par simulation. A droite : image optique d'un guide d'onde vu du dessus. Le rectangle en pointillés met en évidence la zone où les spores immobilisées pourront être détectées optiquement, puisque recouvrant le champ évanescent. En l'occurrence, sur l'image, seules deux spores seront détectables.

Sur les mêmes images que celles exploitées pour la Figure D.5, nous avons donc cette fois-ci calculé le pourcentage de spores « détectables », c'est-à-dire le nombre de spores immobilisées sur les guides ou sur les flancs des guides divisé par le nombre total de spores immobilisées. Ce calcul a tout d'abord été effectué juste après pulvérisation : cela donne lieu à des premières valeurs (hauteurs des rectangles de gauche sur la Figure D.7). On peut constater qu'après pulvérisation, environ 30 % des spores sont a priori détectables, quelle que soit la surface. Ce résultat est cohérent car les spores ne sont pas motiles et que la pulvérisation est homogène. A titre de comparaison, le champ évanescent recouvre environ 25 % de la surface des composants : cela correspond environ au taux de surface occupé par les guides d'onde.

Le calcul a ensuite été effectué après rinçage. Cela donne lieu à de nouvelles valeurs : les hauteurs des rectangles du milieu dans la Figure D.7. Comme indiqué précédemment, le rinçage a pour conséquence le décrochage d'une bonne partie des spores (Figure D.2). En revanche la Figure D.7 met en évidence le fait qu'après rinçage, le taux de spores immobilisées dans la zone de détection augmente, et ce quelle que soit la surface analysée. On peut intuitivement supposer que cela est en partie dû à la géométrie des guides : avec le rinçage, les spores qui se décrochent se retrouvent probablement immobilisées contre les flancs des guides d'onde. Effectivement, la hauteur des guides est de $4\mu\text{m}$, dimension qui est à comparer à celle des spores ($5\text{-}20\ \mu\text{m}$). Il est vraisemblable que le relief des guides participe à l'immobilisation des spores. Cette tendance est plus prononcée pour la surface dont les zones entre les guides ont été fonctionnalisées avec le précurseur TEOS, pour laquelle 36 % des spores restantes sont localisées sur les guides ou sur les flancs des guides. Cela s'explique par l'hydrophilie des zones fonctionnalisées, qui facilite le rinçage et augmente le déplacement des spores de ces zones hydrophiles vers les guides d'onde plus hydrophobes.

Pour terminer, nous nous sommes intéressés au nombre de spores immobilisées dans la zone de détection après rinçage par rapport au nombre total de spores juste après pulvérisation. Cela a donné lieu à d'autres valeurs, représentées par les hauteurs des rectangles de droite sur la Figure D.7. On peut constater que sur le composant de référence non fonctionnalisé, seules 15,9 % des spores pulvérisées restent détectables après ce rinçage.

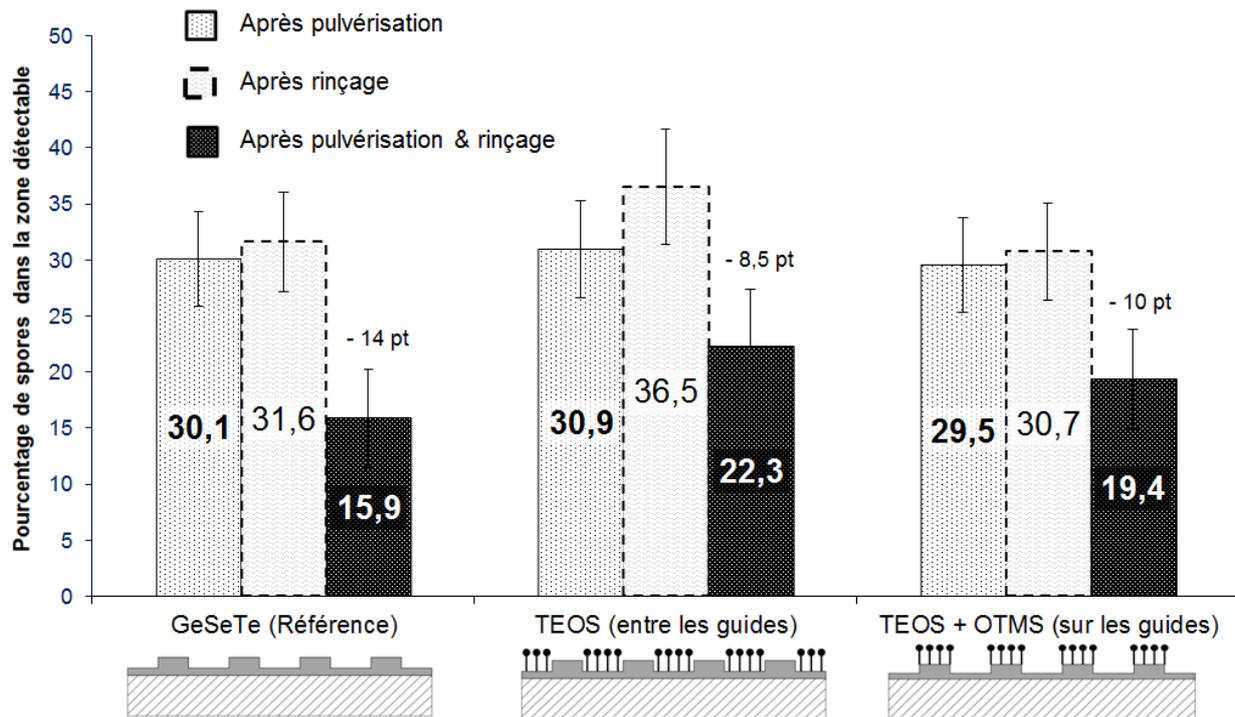


Figure D.7. Pourcentage des spores présentes dans la zone de détection après pulvérisation (rectangles de gauche). Pourcentage des spores immobilisées dans la zone de détection après rinçage (rectangles du milieu). Rectangle de droite : pourcentage de spores immobilisées dans la zone de détection après rinçage par rapport aux nombre total de spore pulvérisées initialement.

Cette proportion augmente et atteint 22,3 % pour la surface dont les zones entre les guides ont été fonctionnalisées avec le précurseur TEOS, et 19,4 % pour la surface dont les guides d'onde ont été fonctionnalisés avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS. Les deux stratégies de fonctionnalisation utilisées permettent donc d'immobiliser plus de spores dans la zone de détection, et donc d'augmenter la sensibilité. A ce titre, la meilleure stratégie consisterait finalement en la fonctionnalisation sélective autour des guides avec le précurseur TEOS. Ces zones non sensibles (car ne recouvrant pas le champ évanescent) deviennent alors hydrophiles. Les spores hydrophobes ont donc moins d'affinité pour ces zones, et sont plus facilement décrochées. Lors d'une perturbation, telle que le ruissellement d'eau, on peut donc supposer que les spores déposées sur les composants par le vent se déplaceraient et seraient pour certaines immobilisées grâce aux reliefs que représentent les guides d'onde. Globalement, le taux de spores se retrouvant dans la zone de détection augmenterait.

D.I.4. Pulvérisation des spores sur des guides intégralement fonctionnalisés

A titre de comparaison, nous avons réalisé le même type d'expériences sur des composants fonctionnalisés intégralement. Les deux mêmes précurseurs ont été utilisés : le précurseur TEOS et le mélange de précurseurs TEOS et OTMS. Sur la Figure D.8 sont regroupés les angles de contact, et le pourcentage de spores immobilisées sur les trois surfaces : la surface non fonctionnalisée de référence, la surface intégralement fonctionnalisée avec le précurseur TEOS et la surface intégralement fonctionnalisée avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS. Comme on peut le voir sur la Figure D.8, 50 % des spores sont immobilisées sur la surface non fonctionnalisée. Lorsque la même surface est intégralement fonctionnalisée avec le précurseur TEOS, le taux de spores immobilisées chute à 38 % : cela est dû au caractère hydrophile de la surface qui facilite l'évacuation des spores durant le rinçage. A l'inverse, lorsque la surface est fonctionnalisée avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS, le taux de spores immobilisées augmente et devient égal à 101 % (un pourcentage supérieur à 100 % s'explique par l'incertitude importante sur le comptage des spores). La surface fonctionnalisée avec le mélange TEOS + OTMS est en effet extrêmement hydrophobe, le rinçage devient inefficace et les spores restent immobilisées. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents (Figure D.5) et avec la littérature.

Pour rappel et en guise de remarque, les surfaces patternées avec des guides d'onde présentent deux angles de contact, selon l'axe de l'observation (Figure D.9). L'angle de contact indiqué sur la Figure D.8 (103° pour la surface fonctionnalisée avec le mélange TEOS+OTMS) correspond à celui mesuré selon l'axe 1. Le caractère hydrophobe de la surface fonctionnalisée avec le mélange TEOS+OTMS est plus marqué selon l'axe 2, avec une valeur de l'angle de contact de 138°.

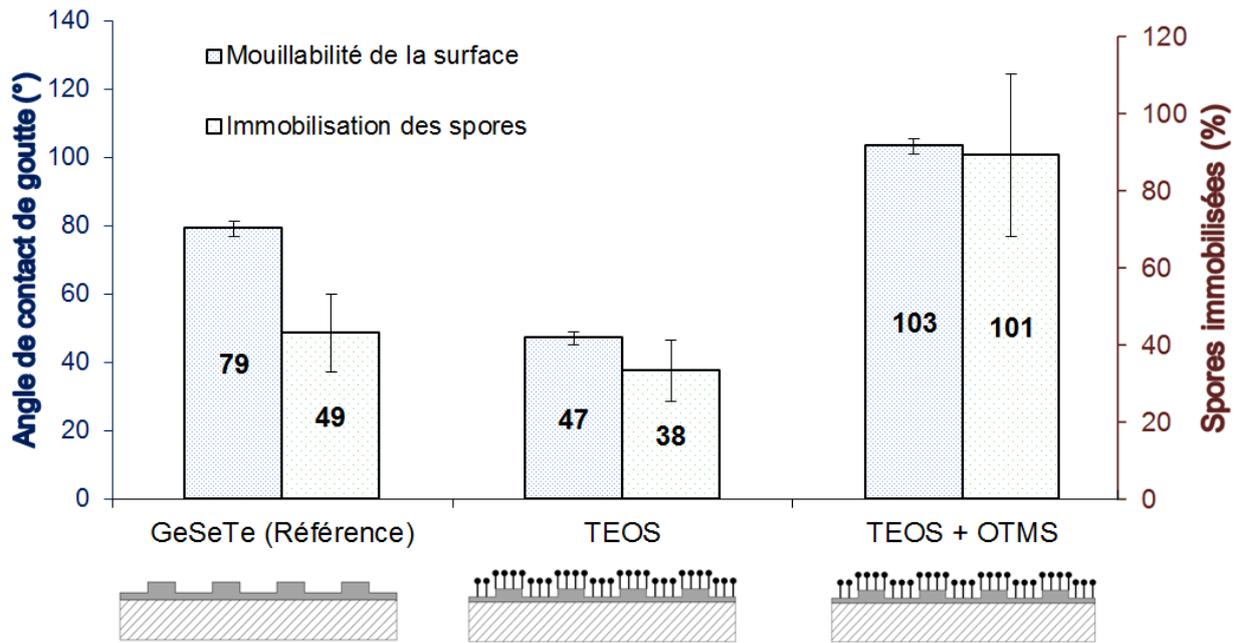


Figure D.8. Angle de contact et immobilisation des spores sur des guides d'onde : à gauche, une surface structurée non fonctionnalisée ; au centre, la même surface structurée, mais entièrement fonctionnalisée avec le précurseur TEOS et à droite, la surface structurée intégralement fonctionnalisée avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS.

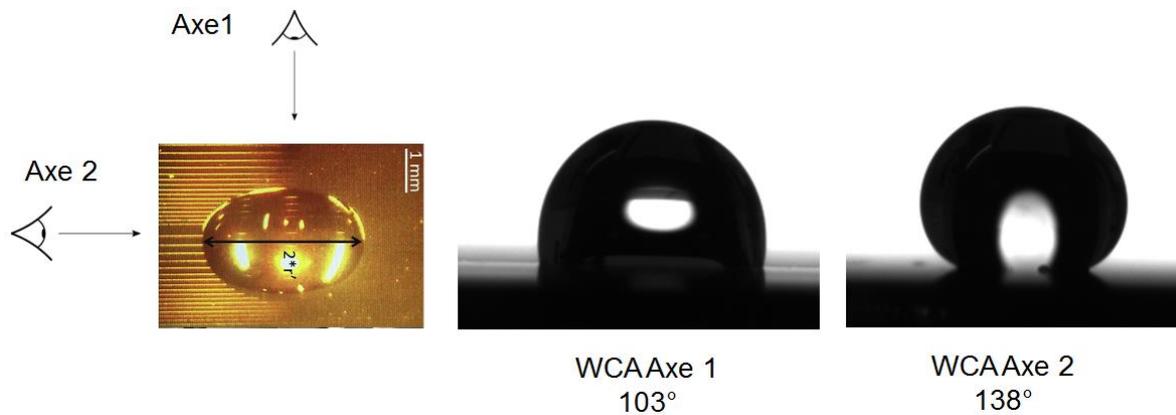


Figure D.9. Angle de contact de la surface avec guide fonctionnalisée intégralement avec le mélange de précurseurs TEOS + OTMS.

Comme dans le paragraphe précédent, après nous être intéressés au taux global de spores immobilisées sur les différentes surfaces, nous avons repris les calculs en distinguant les zones où les spores seront détectables (sur les guides et les flancs des guides) des zones où elles ne seront pas détectables (entre les guides d'onde). Sur la Figure D.10 sont ainsi regroupés les pourcentages de spores immobilisées sur les zones de détection d'après les images prises à

l'aide du microscope. Sur les images prises après pulvérisation des spores, environ 33 % de celles-ci sont déjà détectables (hauteurs des rectangles de gauche dans la Figure D.10), et ceci quelle que soit la surface. Sur les images prises après rinçage, 29,5 % des spores immobilisées se situent dans la zone de détection pour la surface de référence (Figure D.10). Ce taux de spores immobilisées sur les guides ou sur les flancs des guides augmente considérablement lorsque la surface est intégralement fonctionnalisée avec le précurseur TEOS (47,7 % sur la Figure D.10). Ce résultat est tout à fait concordant avec ce qui a été vu précédemment. Il est expliqué par la forte mobilité des spores sur la surface hydrophile, et leur « piégeage » contre les guides, du fait de la hauteur des marches qu'ils créent. Lorsque la surface est fonctionnalisée avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS, le taux de spores immobilisées dans la zone dite de détection est également plus important que pour la surface non fonctionnalisée, mais dans une moindre mesure (38,3 % sur la Figure D.10).

Comme dans le paragraphe précédent, nous nous sommes enfin intéressés au nombre de spores immobilisées dans la zone de détection après rinçage par rapport au nombre total de spores juste après pulvérisation. Les taux obtenus sont représentés par les hauteurs des rectangles de droite dans la Figure D.10. On peut constater que seuls 14,4 % des spores pulvérisées sont dans la zone de détection après rinçage de la surface non fonctionnalisée. Pour les deux surfaces fonctionnalisées intégralement, cette proportion augmente et atteint 17,9 % avec le précurseur TEOS et 38,5 % avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS. Les deux fonctionnalisations « pleine plaque » permettent donc d'immobiliser plus de spores dans la zone de détection, et donc d'augmenter la sensibilité. Ce résultat est particulièrement vrai pour la fonctionnalisation avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS, qui rend la surface plus hydrophobe. Le rinçage avec les 3 ml d'eau ne permet pas aux spores d'être évacuées, et les quelques spores mobiles finissent par être immobilisées au niveau des flancs des guides d'onde.

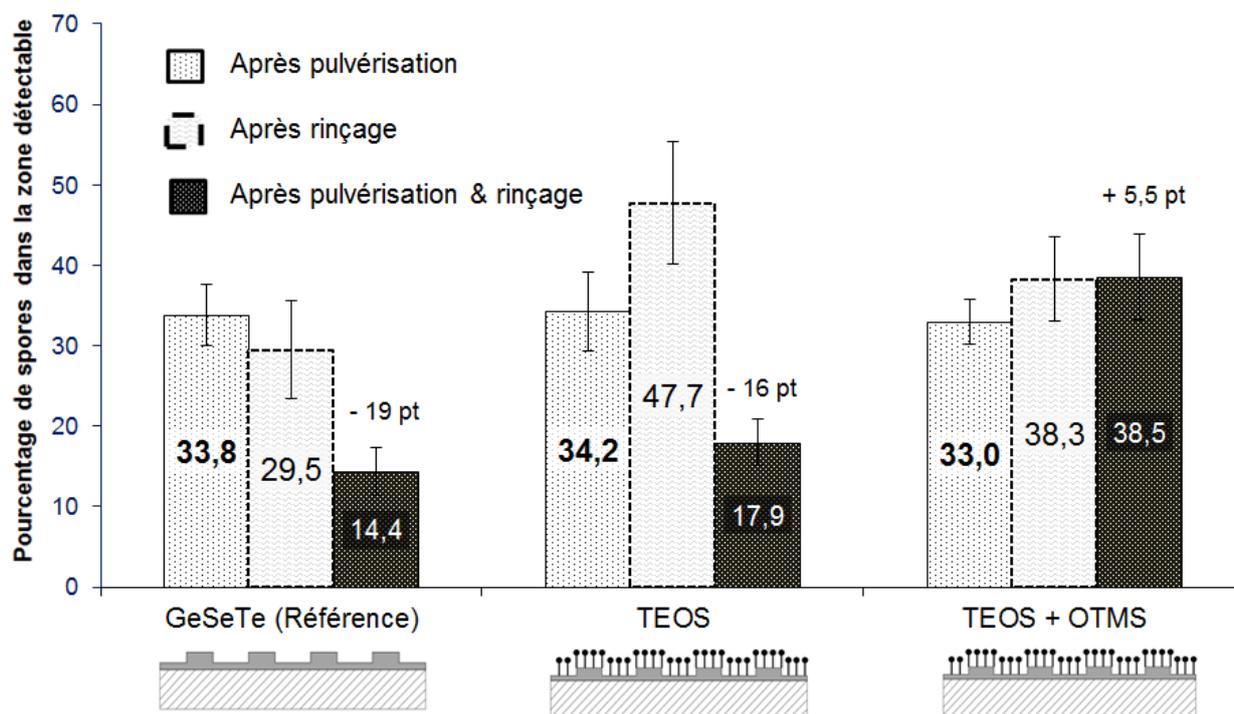


Figure D.10. Pourcentage des spores présentes dans la zone de détection après pulvérisation (rectangles de gauche). Pourcentage des spores immobilisées dans la zone de détection après rinçage (rectangles du milieu). Rectangle de droite : pourcentage de spores immobilisées dans la zone de détection après rinçage par rapport au nombre total de spore pulvérisées initialement.

D.1.5. Bilan

Dans le cas des couches minces chalcogénures non structurées, la silanisation à l'aide du précurseur TEOS donne lieu à une surface plus hydrophile, sur laquelle les spores sont plus difficilement immobilisées. L'ajout du précurseur OTMS apporte de l'hydrophobie à la surface chalcogénure, sur laquelle les spores sont à l'inverse plus facilement immobilisées. Les images AFM des surfaces fonctionnalisées ont montré des rugosités tout à fait négligeables (de l'ordre du nanomètre). Comparée à la taille des spores (de l'ordre du micromètre), la rugosité ne participe vraisemblablement pas au mécanisme d'immobilisation des spores. Ces résultats avec des surfaces planes indiquent que la longue chaîne carbonée portée par le précurseur OTMS apporte l'hydrophobie nécessaire à cette l'immobilisation.

Dans le cas des couches minces chalcogénures structurées, c'est-à-dire dans le cas des couches modifiées géométriquement de sorte à obtenir des séries de bandes de 4 µm de

profondeur, le caractère plus ou moins hydrophobe de la surface n'est plus le seul paramètre à prendre en compte. Le relief joue en effet aussi un rôle important dans l'immobilisation des spores. En effet, les « marches » favorisent l'immobilisation des spores, qui lorsqu'elles se décrochent, rencontrent ces obstacles et restent immobilisées.

Finalement, les quatre stratégies de fonctionnalisation envisagées (à savoir : fonctionnalisation sélective des zones entre les guides avec TEOS, fonctionnalisation sélective des guides avec TEOS + OTMS, fonctionnalisation pleine plaque avec TEOS et fonctionnalisation pleine plaque avec TEOS + OTMS) permettraient d'augmenter la sensibilité du capteur. Il y a en effet compétition entre deux phénomènes a priori contradictoires : l'hydrophilie et l'hydrophobie de la surface favorisent l'immobilisation des spores dans la zone de détection du composant. D'un côté (i) l'hydrophilie de la surface favorise le décrochage des spores et leur mobilité, mais celles-ci se trouvent finalement immobilisées contre les flancs des guides. D'un autre côté (ii) l'hydrophobie de la surface favorise l'immobilisation des spores.

D'après les données quantitatives, la meilleure option parmi les quatre stratégies testées consisterait à fonctionnaliser intégralement le composant avec le mélange de précurseurs TEOS et OTMS. Le taux d'immobilisation des spores dans la zone de détection, constituée par les guides et les flancs des guides, serait de 38,5 % (Figure D.10) - taux calculé en divisant le nombre de spores immobilisées dans cette zone après rinçage par le nombre total de spores pulvérisées sur la surface. Ce taux est 2,7 fois plus important que celui obtenu pour un composant non fonctionnalisé (14,4 % sur la Figure D.10). On peut supposer que la sensibilité de la sonde vis-à-vis de la détection des spores serait augmentée d'un facteur comparable.

D.II. Vers la détection optique des spores

L'objectif final dans lequel s'inscrit ce travail de thèse est la réalisation de micro-capteurs optiques pour la détection précoce des maladies des plantes. Cette dernière section du manuscrit est consacrée aux mesures optiques, et tente de répondre aux deux questions suivantes :

(i) A quoi ressemble un spectre d'absorption des spores de *Magnaporthe* ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des spectromètres de laboratoire dans la gamme

infrarouge : de 1 à 15 μm . Ces longueurs d'onde correspondent à la gamme de transparence des chalcogénures du ternaire Ge-Se-Te. Cette étude spectroscopique en espace libre fait l'objet du paragraphe D.II.1.

(ii) Les spores de Magnaporthe sont-elles détectables avec nos composants optiques Ge-Se-Te ? Comme explicité dans le premier chapitre, les guides d'onde utilisés dans le cadre de cette étude ont été fabriqués selon le design optimisé par Anis TALEB BENDIAB [TalebBendiad2020]. Nous avons donc étudié leurs réponses vis-à-vis du dépôt de spores sur leur surface (paragraphe D.II.2).

D.II.1. Spectres d'absorption des spores dans l'infrarouge

La réponse optique des spores a été enregistrée avec deux spectromètres. Le premier est un spectromètre pré-dispersif JASCO V-700, fonctionnant dans la gamme proche infrarouge, de 1 à 2,5 μm . Cette gamme de longueurs d'onde est intéressante car les matériels optiques (lasers, lentilles, spectromètres...) sont abordables pour des applications en agriculture. C'est par ailleurs cette gamme de longueurs d'onde qui sera utilisée pour caractériser les guides d'onde sur le banc spectrophotométrique (paragraphe D.II.2 suivant). Le deuxième spectromètre utilisé est un spectromètre Brücker à transformée de Fourier, fonctionnant dans la gamme moyen-infrarouge 4000-700 cm^{-1} (soit 2,5-15 μm). Cette deuxième gamme de longueurs d'onde est également intéressante car les matériaux chalcogénures Ge-Se-Te sont aussi transparents dans ce domaine. Même si dans le cadre de ce travail nous n'avons pas caractérisé optiquement les guides d'onde aussi loin dans l'infrarouge, cela reste une gamme de longueurs d'onde très attractive. En effet, de nombreuses molécules possèdent des signatures spectrales caractéristiques dans ce domaine. Il est donc intéressant de regarder ce qu'il en est des spores des champignons phytopathogènes.

D.II.1.a. Gamme de longueurs d'onde 1 – 2,5 μm

Afin de faciliter l'approvisionnement en spores pour ces expériences, nous avons conservé plusieurs eppendorfs de solutions de spores à -80°C . En revanche, pour que les spores puissent supporter le stress induit par ce mode de conservation, les spores doivent être

placées dans un solvant appelé STC, constitué de 0,5 M de Sorbitol, 25 mM de Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane chlorhydrate et 25 mM de CaCl₂. Juste avant d'effectuer les mesures spectrométriques, les solutions sont décongelées et le STC est retiré par plusieurs cycles de centrifugation-dilution. On obtient alors des solutions aqueuses de spores de concentration 5.10⁶ spores.ml⁻¹. La ligne de base du spectrophotomètre est obtenue en plaçant la cuve en quartz vide.

Le spectre d'absorption entre 1 et 2,5 µm de ces solutions aqueuses de spores est donné sur la Figure D.11.A. Ce spectre est très fortement marqué par la présence d'eau. A titre de comparaison, le spectre de l'eau (c'est-à-dire du solvant) est donné sur la Figure D.11.B. Dans les deux cas, l'absorption vers 2 µm et au-delà de 2,5 µm est telle qu'aucun photon n'atteint la photodiode : l'absorption plafonne à 7. Dans cette gamme de longueurs d'onde, l'eau absorbe autour de 1,45 µm et 1,94 µm avec des coefficients d'absorption maximaux de 26 cm⁻¹ et 114 cm⁻¹, respectivement [Curcio1951] : on retrouve ces mêmes bandes sur le spectre des solutions de spores. Du fait de leurs fortes intensités, l'information spectrale issue des spores est potentiellement masquée.

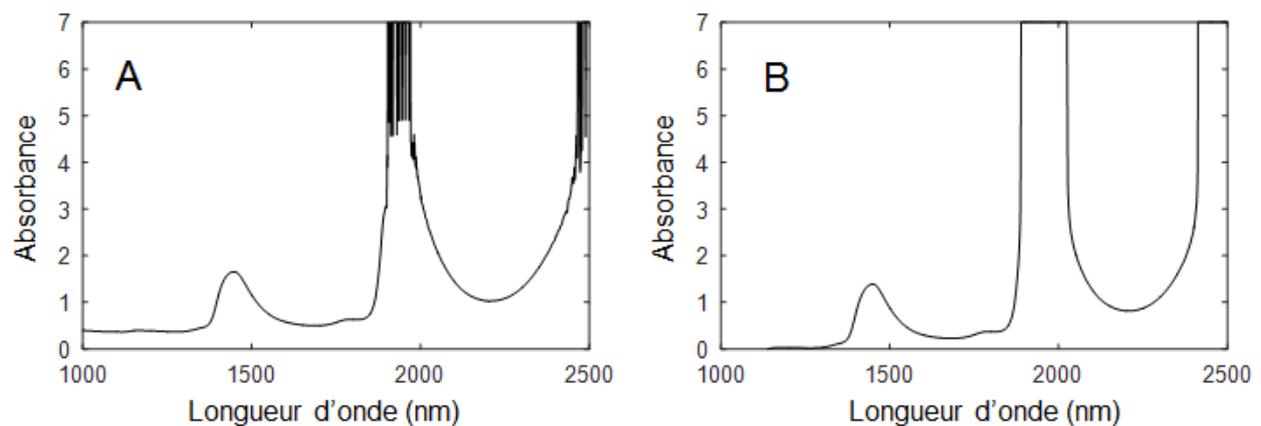


Figure D.11. Spectres d'absorption dans le proche infrarouge : (A) des spores de *Magnaporthe oryzae* en solution dans l'eau, et (B) de l'eau.

Pour d'isoler la contribution spectrale des spores, nous avons soustrait les deux spectres (A et B) de la figure D.11. Le spectre obtenu est sur la Figure D.12.A. Ce spectre n'est marqué par aucune absorption particulière. Ce constat est plutôt contre-intuitif. On remarque par ailleurs sur ce spectre une baisse de signal aux fréquences d'absorption de l'eau. Lorsque que les spores sont dispersées dans l'eau, elles occupent un certain volume. Ajouter des spores dans

la cuve du spectromètre s'accompagne nécessairement d'un volume d'eau moins important. Ceci explique les baisses d'absorption à 1,45 μm , 1,94 et 2,5 μm . Finalement, les analyses spectrales dans la gamme du proche-infrarouge sont rapidement perturbées par le milieu de dispersion : la présence d'eau est problématique. Pour le reste, on observe une décroissance générale de l'intensité vers les plus grandes longueurs d'onde. Cette observation est révélatrice d'un phénomène de diffusion de la lumière [Piazza2005]. Mais le calcul montre rapidement qu'elle n'est pas inversement proportionnelle à λ^4 . Elle ne correspond donc pas à de la diffusion Rayleigh [Piazza2005].

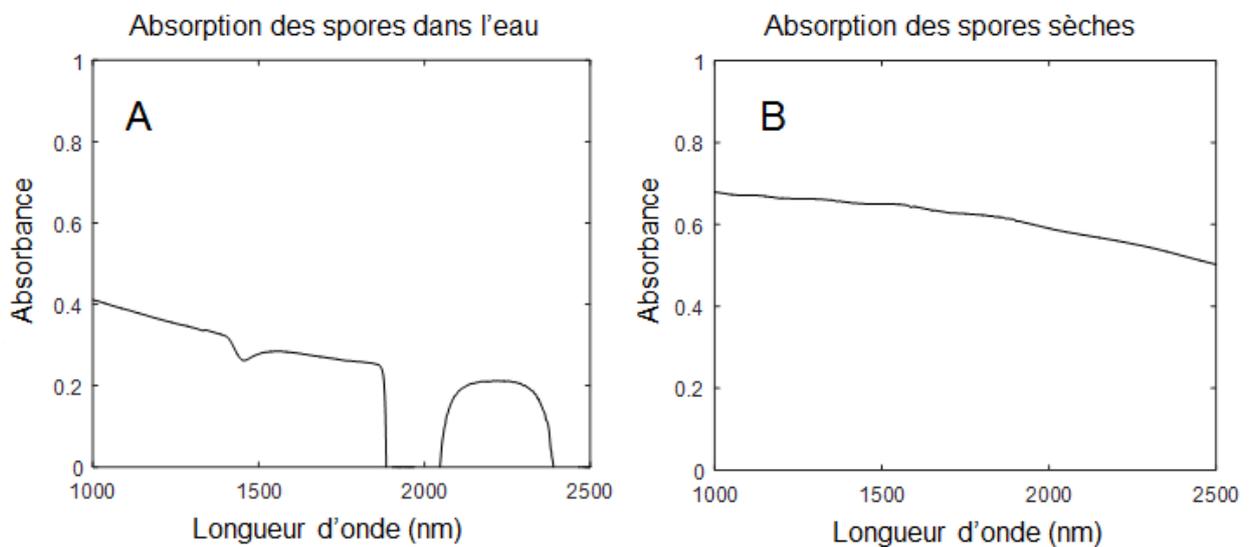


Figure D.12. Spectres d'absorption des spores. (A) : en milieu liquide avec soustraction de l'eau, et (B) : les spores sèches après évaporation du solvant.

Une autre méthode permettant d'obtenir la réponse spectrale des spores est de les analyser « sèches ». Pour cela, nous avons disposé quelques centaines de microlitres d'une solution aqueuse de spores sur la cuve en quartz utilisée pour les mesures de spectrométrie, et nous avons attendu que toute l'eau se soit évaporée. Une fois l'eau évaporée, la cuve est recouverte de spores sèches et un nouveau spectre est enregistré. Le spectre obtenu est donné sur la Figure D.12.B. Sur ce spectre, les bandes d'absorption de l'eau n'apparaissent plus, comme souhaité. On remarque toujours une ligne de base liée à un phénomène de diffusion. Cependant, l'allure de cette ligne de base n'est pas similaire, malgré le fait que la caractérisation ait été réalisée avec les mêmes spores. Cette différence est facilement expliquée par les paramètres de la diffusion. Ce phénomène macroscopique est très

dépendant de l'échantillonnage, l'organisation spatiale des spores entre elles, et aussi du milieu de dispersion, qui est différent pour les deux modes d'acquisitions utilisés.

Pour comprendre l'origine de la diffusion observée sur le spectre des spores, nous devons considérer leur taille. Les spores sont des capsules ovoïdes tri-cellulaires dont la taille globale est proche de 10 μm . Les tailles de ces spores, de leurs cellules, et même de leurs organites sont donc du même ordre de grandeur voire plus grandes que les longueurs d'onde sondées (1-2,5 μm). La théorie de la diffusion Rayleigh ne s'applique en effet plus dans ce cas. Les tailles des particules étant comparables, voire supérieures aux longueurs d'onde, la théorie qui s'applique est la diffusion de Mie [Xu2007]. En effet, cette théorie est largement rapportée dans la littérature pour expliquer la diffusion dans l'infrarouge de différentes cellules biologiques [Mohlenhoff2005][Bassan2010][Romeo2006]. La diffusion de Mie permet donc d'expliquer les phénomènes observés sur les spectres de la Figure D.12 : les photons ne sont pas absorbés, mais diffusés ; ils n'atteignent donc pas le photodétecteur placé à une dizaine de centimètres.

Sur les spectres obtenus dans la gamme de longueurs d'onde allant de 1 à 2,5 μm , seule la diffusion de Mie est donc observée et il n'y a aucune information sur la composition chimique des spores. Pourtant, les spores sont composées des briques élémentaires du vivant qui absorbent dans cette gamme [Osborne2006][Rosic2016][Ingle2016]. Pour notre étude, la non observation des bandes d'absorption des spores dans la gamme 1-2,5 μm peut paraître préjudiciable. Cependant, cette absence d'absorption est également liée à la configuration du spectromètre et de notre échantillonnage.

Même si cette diffusion seule paraît insuffisante pour permettre une discrimination entre différentes souches fongiques, elle permet toutefois de remonter à certaines informations sur les cellules biologiques [YuWan2021]. Elle est par exemple fonction de la taille, de la forme ou de la rugosité des bio-particules [YuWan2021]. Certains travaux proposent d'ailleurs d'exploiter la diffusion de Mie pour déterminer la distribution en taille des particules présentes dans le milieu dispersant [Ye2012]. Une autre étude démontre que les cellules de différentes souches de Fungi donnent lieu à des spectres de diffusion différents [Beauvoit1993]. Ces mêmes auteurs rapportent également une relation linéaire entre la concentration en cellules fongiques et les coefficients de diffusion.

A titre exploratoire, nous avons enregistré les spectres des spores sèches de deux autres genres de champignons (*Fusarium* et *Botrytis*). Ils sont superposés au spectre des spores sèches de *Magnaporthe oryzae* sur la Figure D.13.

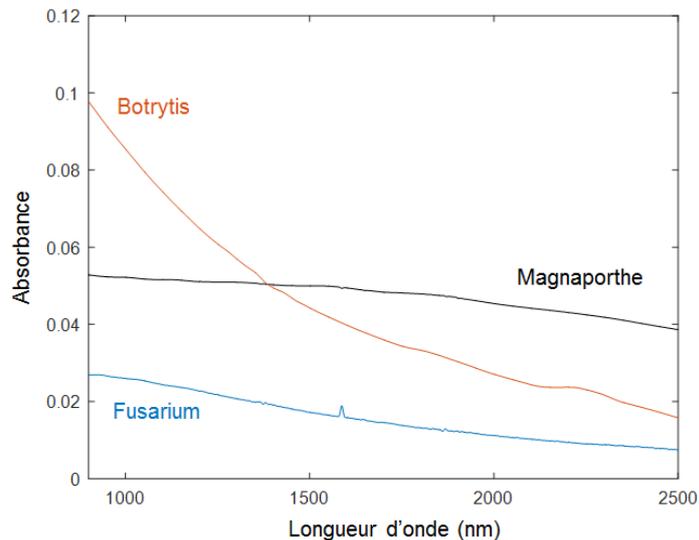


Figure D.13. Spectres enregistrés entre 1 et 2,5 μm pour des spores sèches de *Magnaporthe oryzae*, *Fusarium* et *Botrytis*.

Le spectre de diffusion des spores de *Fusarium solani* (en bleu sur la Figure D.13) est ressemblant au spectre de diffusion des spores de *Magnaporthe oryzae* (en noir sur la Figure D.13). Les spores de *Fusarium solani* sont effectivement d'une taille et forme similaire. Ce sont des capsules pluricellulaires (3 à 5 cellules), de forme ellipsoïdale ou allongée (5 x 30 μm) [Debourgogne2013][Padvi2018]. Une différenciation entre ces deux phytopathogènes paraît difficile. Par contre, le spectre de diffusion des spores de *Botrytis cinerea* est relativement différent (en orange sur la Figure D.13). Ceci peut s'expliquer par la morphologie de ces spores. Elles sont effectivement unicellulaires, de forme sphérique à ovoïde, et mesurent entre 8 et 12 μm [Romanazzi2014][Pezet1990]. La différenciation des souches fongiques par spectroscopie proche-infrarouge pourrait donc être envisagée, mais le risque d'obtenir des spectres très semblables est très important. En effet, les spores de différentes souches phytopathogènes peuvent adopter des tailles et formes très proches.

D.II.1.b. Gamme de longueurs d'onde 2,5 – 15 μm

Pour une discrimination plus aisée et directe, les phénomènes d'absorption dans le moyen-infrarouge sont plus adaptées, car les spectres sont plus riches en informations. Le premier chapitre de ce manuscrit avait en effet permis d'identifier cette gamme de longueurs d'onde comme plus propice pour l'étude spectroscopique des spores phytopathogènes [Zervakis2012][Erukhimovitch2010][Tralamazza2013]. Nous avons donc travaillé dans la gamme de longueurs d'onde allant de 2,5 à 15 μm (soit dans la gamme de nombres d'onde 4000-500 cm^{-1}). Cette analyse a été réalisée en mode réflexion totale atténuée.

Au vu des difficultés à utiliser l'eau comme milieu de dispersion, nous avons travaillé avec des spores sèches. Le spectre des spores sèches *Magnaporthe oryzae* est donné sur la Figure D.14. Sur le spectre, nous pouvons observer une ligne de base due à la diffusion : cette ligne de base est plus importante aux faibles longueurs d'onde et quasi inexistante aux grandes longueurs d'onde. En revanche, il y a cette fois-ci de multiples bandes d'absorption assez caractéristiques des biomolécules présentes dans ces cellules fongiques : protéines, carbohydrates, chitine... A titre non exhaustif, il est possible d'identifier les groupements $-\text{OH}$ et $-\text{NH}$ vers 3 μm (3000 cm^{-1}), les amides vers 6 μm (1600 cm^{-1}) ou encore les éthers vers 9 μm (1100 cm^{-1}). Ce spectre est en tout point semblable à ceux rencontrés dans la littérature [Subbiah2017]. Les spectres des spores dans cette gamme de longueurs d'onde sont donc, comme attendu, beaucoup plus riches en informations que les spectres enregistrés entre 1 et 2,5 μm .

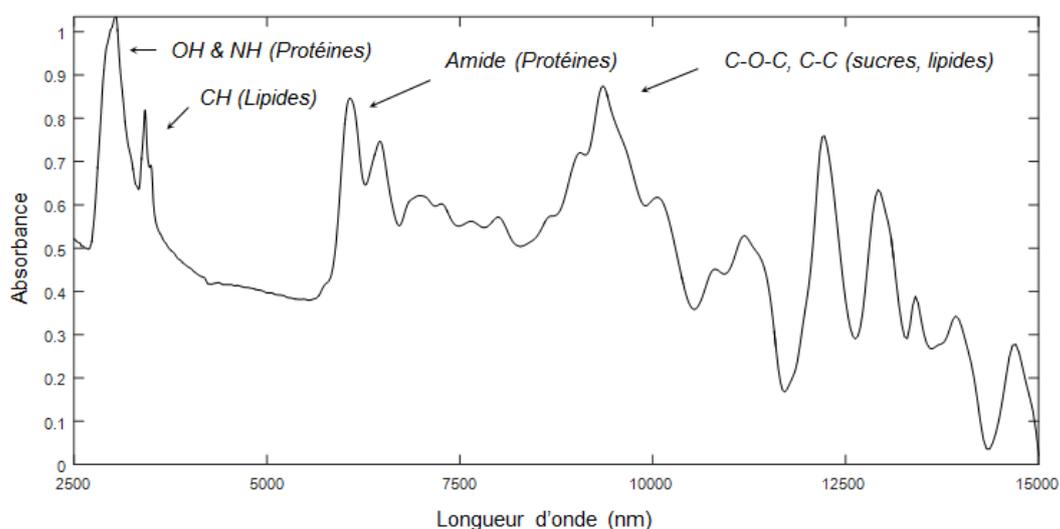


Figure D.14. Spectre d'absorption dans la gamme 2,5 – 15 μm des spores sèches de *Magnaporthe oryzae*.

D.II.1.c. Bilan

Sur toute la gamme infrarouge (1-15 μm), les spectres des spores séchées sont marqués par un phénomène de diffusion. Entre 1 et 2,5 μm , domaine où cette diffusion de Mie est particulièrement importante, aucune absorption moléculaire n'est visible avec le spectromètre de laboratoire. Les seules informations que l'on peut espérer obtenir sur les spores sont alors morphologiques (tailles, forme, rugosité...). La littérature montre par ailleurs que l'exploitation de la théorie de Mie permet d'identifier et de doser la concentration en cellules fongiques. Mais cette technique est rapidement limitée par les similarités morphologiques des spores, et donc des spectres.

Dans la gamme du moyen-infrarouge allant de 2,5 à 15 μm , cette diffusion est moins importante. Les spectres des spores sèches présentent les raies d'absorption caractéristiques des modes de vibrations des molécules qui les constituent : lipides, protéines, sucres, chitine... L'utilisation du moyen infrarouge est donc plus propice pour discriminer les spores d'une poussière ou du pollen par exemple, et permettre in fine de distinguer les spores de différentes maladies fongiques.

D.II.2. Détection des spores avec nos guides d'onde

Pour aller plus loin et essayer de montrer la faisabilité de micro-capteurs optiques pour la détection des spores des champignons phytopathogènes, nous avons enfin cherché à vérifier si les guides d'onde chalcogénures étaient sensibles au dépôt de spores sur leur surface, et ce dans la gamme du proche-infrarouge. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous n'avons en effet eu accès qu'à un banc opérant de 1,2 à 2 μm .

L'hypothèse de départ est que les spores immobilisées sur les guides ou sur les flancs des guides devraient interagir avec le champ évanescent, et donc perturber la propagation de la lumière. La théorie de Mie s'appliquant toujours dans cette configuration [Bekshaev2013][Sigel2009], les spores devraient en effet diffuser une partie de l'onde évanescente et provoquer l'atténuation du signal transmis au travers le guide d'onde interrogé.

Pour cette dernière étape du travail, les spores utilisées sont toujours des spores de *Magnaporthe oryzae*. Il est par ailleurs important de préciser que les expériences ont été conduites exclusivement avec des guides d'onde non fonctionnalisés. La fonctionnalisation pourra apporter plus de sensibilité, mais pour l'étape de démonstration, elle a en effet été jugée trop prématurée.

D.II.2.a. Banc de mesure utilisé

Le banc optique a été conçu et optimisé lors de précédents travaux [TalebBendiab2019] [TalebBendiab2020] ; il est schématisé sur la Figure D.15. Ce montage est équipé d'une source laser supercontinuum proche-infrarouge (SM-100 NIR ; LEUKOS) combinée à un générateur de signal (4422 ; SEFRAM). Un filtre passe-haut (FELH1150nm ; Thorlabs) permet de couper la fréquence de pompage du laser. Une densité optique neutre (ND30A, Thorlabs) permet de diminuer la puissance incidente. Pour coupler la lumière en espace libre dans un guide d'onde, une lentille de distance focale 3,5 mm (87-127 AR ; optique Edmund) est utilisée pour focaliser le signal sur la face d'entrée. L'échantillon est maintenu grâce à une pompe à vide sur une plate-forme de translation 3 axes. Pour collecter la lumière en sortie du guide, une lentille convexe (AL1815-C ; Thorlabs), servant de collimateur, est placée à 11 mm de la sortie des guides. Le faisceau passe ensuite par un séparateur (BSF10-C, THORLABS) où 10 % de la lumière est réfléchi sur une caméra (WDY SMR S320-VS ; NIT) qui permet de contrôler l'injection dans le guide d'onde. Les 90 % de l'intensité restante sont transmis à travers une dernière lentille (AL1225 M-C ; Thorlabs) pour injecter la lumière dans un spectromètre à transformée de Fourier (UV-VIS-NIR TF ; ARCOptix). La plage spectrale de fonctionnement du banc est optimisée entre 1,2 et 2 μm .

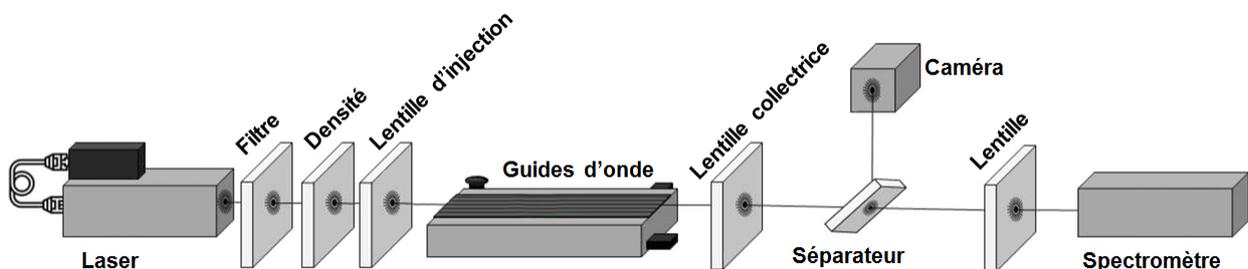


Figure D.15. Banc optique utilisé pour tester la sensibilité des guides d'onde vis-à-vis de la présence de spores sur leur surface.

D.II.2.b. Protocole de dépôt des spores sur les guides d'onde

L'étude spectroscopique exposée dans la section précédente a montré que la détection des spores en solution aqueuse était complexe dans le proche infrarouge, due à la forte absorption de l'eau. Nous avons donc choisi de travailler sans aucun milieu de dispersion. Pour déposer les spores de *Magnaporthe oryzae* sur le composant formé de plusieurs séries de guides d'onde et positionné sur le banc de mesure, nous avons utilisé un pinceau. Nous avons tout d'abord chargé le pinceau en spores en le frottant à la surface d'une boîte de pétri dans laquelle est cultivé *Magnaporthe oryzae*, puis nous l'avons délicatement frotté à la surface du composant, maintenu par aspiration sous vide pour limiter les perturbations mécaniques. Les spores sont alors dispersées sur la surface du composant. Comme illustré par la Figure D.16, de nombreuses spores recouvrent les guides ou les flancs des guides et sont donc a priori détectables. Il est par contre nécessairement difficile de réaliser des dépôts reproductibles ou même répétables. C'est seulement une fois les mesures optiques terminées qu'un comptage des spores sous microscope est possible. Sur toute la longueur du guide, nous avons compté plus d'une centaine de spores après chaque étude.

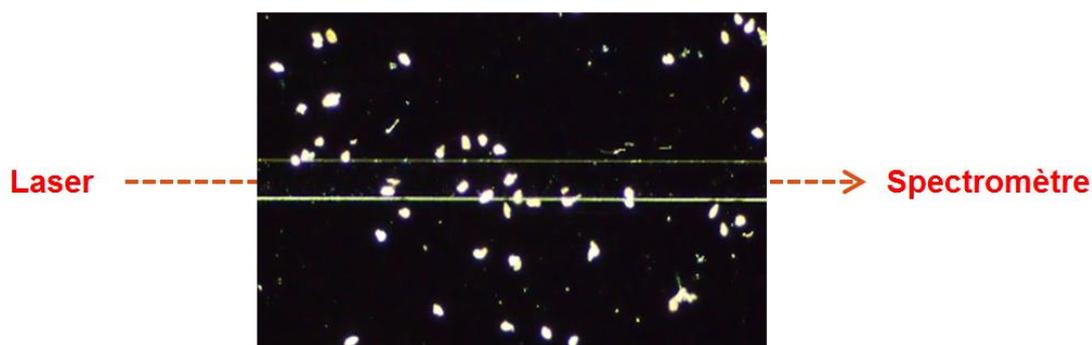


Figure D.16. Image au microscope optique d'une portion du guide d'onde de travail après dépôt des spores et enregistrement des spectres. Sur cette image, plus d'une dizaine de spores sont présents dans la zone de détection, c'est-à-dire sont sur le guide ou les flancs du guide.

D.II.2.c. Réponse des guides d'onde vis-à-vis du dépôt des spores

Comme explicité précédemment les composants fabriqués sont constitués de plusieurs séries de guides d'onde de largeurs différentes. En nous appuyant sur les travaux antérieurs [TalebBendiad2020], nous avons décidé de travailler avec des guides d'onde de 40 μm de large. Ces guides multimodes permettent en effet de récupérer un signal d'intensité optimale. Nous avons ensuite procédé au dépôt des spores en suivant le protocole exposé dans le

paragraphe 2. Pour évaluer la perturbation du signal lors du dépôt des spores, nous avons enregistré l'intensité lumineuse (en nombre de coups) en fonction du temps, durant une quinzaine de minutes. Pendant ce laps de temps, 5 dépôts successifs de spores ont été réalisés sur des endroits différents, sur toute la longueur du guide d'onde. Après chaque dépôt, plus de spores sont donc a priori détectables. Il devrait alors être possible de corrélérer les éventuelles variations d'intensité à l'ajout de spores sur le guide interrogé. Une quinzaine de spectres en intensité ont finalement été enregistrés : ces spectres sont superposés sur la Figure D.17.

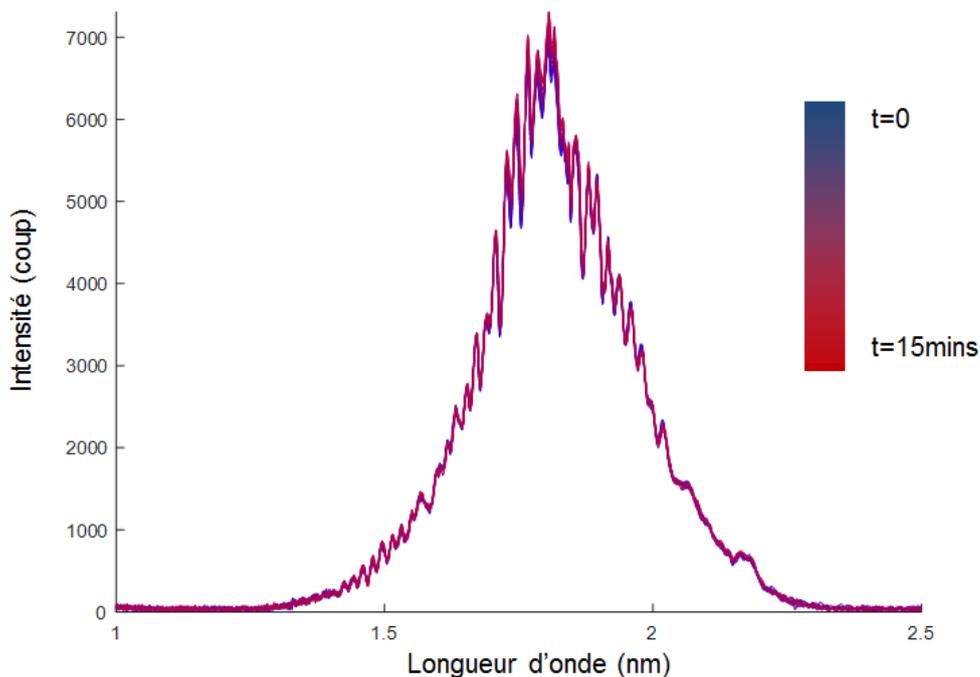


Figure D.17. Intensités brutes transmises et enregistrées en sortie du guide d'onde interrogé. Les spectres sont de couleur bleue ($t = 0$) à rouge ($t = 15$ min).

Dans cette plage spectrale, les spores devraient diffuser la lumière évanescente à la surface du guide. Cependant, comme on peut le constater, les signaux sont quasiment tous superposés, ce qui rend très difficile leur exploitation directe. L'ajout de spores à cinq reprises durant les 15 minutes ne paraît pas apporter de changements significatifs sur l'intensité lumineuse enregistrée en sortie de guide d'onde.

Nous nous sommes donc orientés vers une méthode d'analyse multivariée : l'ACP (Analyse en Composantes Principales). L'ACP est un outil d'analyse multivariée adapté à des études de spectroscopie infrarouge [Ritz2011]. Cette méthode a déjà été utilisée pour exploiter la réponse vis-à-vis du dépôt de gouttelettes d'eau à la surface des guides d'onde Ge-Se-Te [Talebbendiab2019]. Elle a également déjà été éprouvée pour l'identification de Fungi [Oberle2015][Ergin2013]. La méthode ACP est explicitée en détail en Annexe D.1, mais le paragraphe suivant permet d'en saisir les grandes lignes :

Cette méthode consiste à décorréler les variables qui sont initialement liées entre elles. L'intensité du signal à 2000 nm est par exemple proche de l'intensité à 1999 ou 2001 nm. Pour décorréler et réduire le nombre de variables, l'ACP permet de créer de nouvelles variables à partir de combinaisons de variables existantes. Ces nouvelles variables sont dites décorrélées ou orthogonales entre elles. Les nouvelles variables formées sont appelées composantes principales, d'où le nom ACP, comme Analyse en Composantes Principales. Les composantes principales sont générées selon leur impact décroissant sur la variation des données. Ainsi les premières composantes représentent les variables qui contribuent à la variation majoritaire du jeu de données.

Pour comprendre et appréhender le contenu de ces variables artificielles, une composante est visualisée à partir de ce que l'on nomme les *loadings*. Ces « loadings » sont les charges de la composante principale dans l'espace initial. Ils sont représentés sur le nouvel espace réduit, avec à chaque composante, une nouvelle intensité, appelée *score*.

Une analyse ACP a donc été appliquée sur notre jeu de données, constitué des quinze spectres en intensité enregistrés et superposés sur la Figure D.17. Dans notre cas, les « loadings » s'apparentent à des spectres, et l'espace initial est constitué des mêmes longueurs d'onde. Les résultats de l'analyse correspondante sont donnés sur la Figure D.18. Les deux premières composantes principales sont présentées et permettent d'expliquer la quasi-totalité des différences observées entre les spectres.

La première composante (dont les « loadings » et les scores sont donnés sur les Figures D.18.A et C, respectivement) explique à elle seule plus de 99,9 % de la variance du jeu de spectres. Elle correspond au niveau de signal, et est très ressemblante à l'allure des spectres bruts (voir Figure D.17).

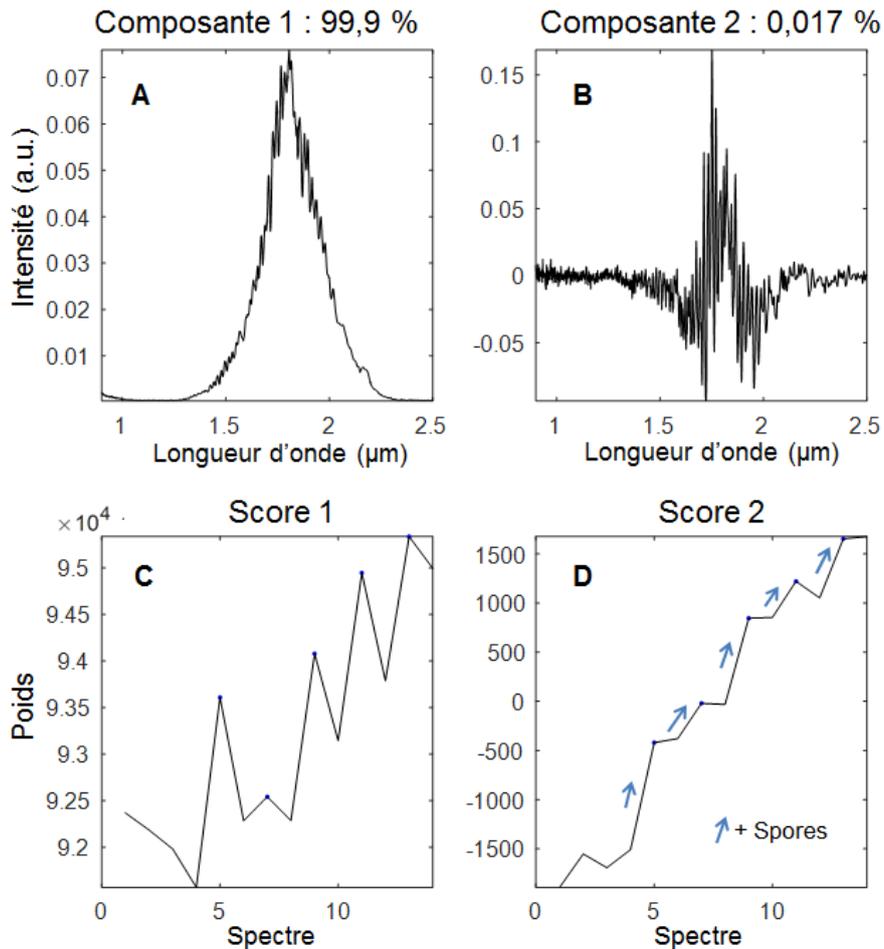


Figure D.18. Résultats de l'analyse en composantes principales effectuée à partir des signaux bruts enregistrés en sortie de guide et présentés sur la Figure D.17. En haut (A et B) sont présentés les « loadings » correspondant aux deux composantes principales identifiées. En bas (C et D), sont donnés les scores respectifs des deux « loadings ».

On peut constater sur la Figure D.18.C que le score associé à cette première composante principale n'est pas constant. L'injection n'est en effet pas stable dans le temps. On remarque également sur cette même figure que le dépôt de spores semble perturber ce niveau de signal. L'application du pinceau sur le composant n'est donc pas sans effet. Le guide a des dimensions micrométriques et la lentille d'injection une focale très petite. Le déplacement d'une centaine de nanomètres peut donc se répercuter sur le couplage à l'entrée du guide d'onde.

Le score de la deuxième composante principale (Figure D.18.D) semble être corrélé à la quantité de spores immobilisées dans la zone de détection du guide. En effet, le score augmente par paliers, et chaque augmentation est concomitante d'un nouveau dépôt de

spores. A l'inverse, lorsqu'aucune spore n'est ajoutée, le score reste stable. Il est à noter que cette deuxième composante principale, qui est vraisemblablement corrélée au dépôt des spores, n'explique que 0,017 % de la variance entre les spectres bruts. Cela justifie les difficultés à travailler visuellement sur les signaux bruts (Figure D.17). Par ailleurs, si l'on s'intéresse au « loading » de cette deuxième composante principale (Figure D.19.B), il s'apparente plutôt à du bruit. Par ailleurs, le dépôt de spores ne paraît pas atténuer le signal transmis, comme supposé par les phénomènes de diffusion mis en évidence dans les paragraphes précédents.

Afin de vérifier la pertinence de ces résultats d'ACP, nous avons réitéré l'expérience : une quinzaine de spectres ont de nouveau été enregistrés pendant une quinzaine de minutes. Cependant nous avons été plus prudents lors du dépôt des spores, pour réduire les perturbations observées sur la première composante. Nous avons également espacé temporellement les dépôts. Les résultats de l'analyse ACP effectuée à partir des spectres bruts correspondants sont donnés sur la Figure D.19. La première composante principale explique encore une fois plus de 99,9 % des différences entre les spectres et son « loading » correspond au niveau de signal (Figure D.19.A). Cette fois-ci, le dépôt de spores ne semble pas perturber le niveau de signal. La deuxième composante principale de cette deuxième ACP permet encore une fois de suivre le dépôt des spores : le score correspondant augmente en effet à chaque nouveau dépôt de spores (Figure D.19.D). Cette deuxième composante principale explique 0,012 % de la variance, résultat du même ordre de grandeur que lors de la première expérience.

Cette deuxième expérience montre la répétabilité de la mesure. Les guides d'onde Ge-Se-Te sont effectivement sensibles au dépôt de spores : ce dépôt peut être suivi sur la deuxième composante principale. Toutefois, le « loading » de cette deuxième composante ne paraît toujours pas être lié à des phénomènes de diffusion, mais semble bruité comme précédemment.

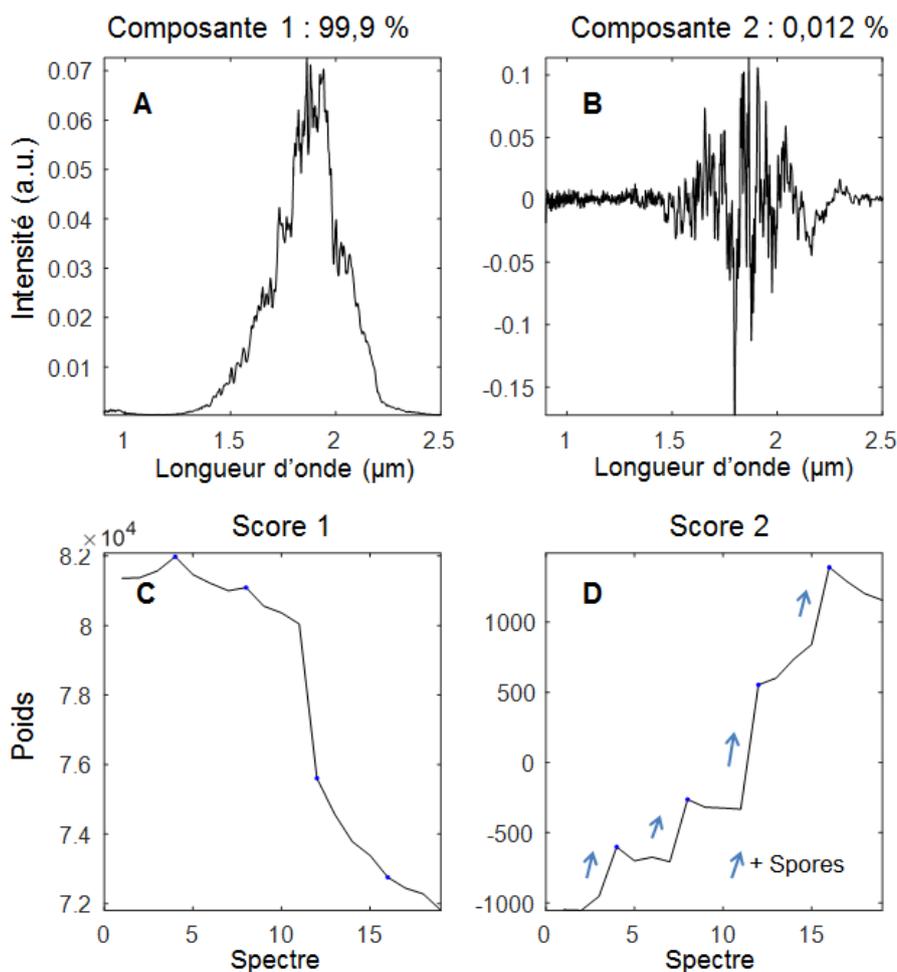


Figure D.19. Résultats de l'analyse en composantes principales effectuée à partir de la deuxième série de signaux bruts enregistrés en sortie d'un nouveau guide. En haut (A et B) sont présentés les « loadings » correspondant aux deux composantes principales identifiées. En bas (C et D), sont donnés les scores respectifs des deux « loadings ».

B.II.3. Bilan

Ces deux tests optiques exploratoires valident la sensibilité des guides d'onde vis-à-vis d'un dépôt de spores. Sur les signaux bruts, l'information est noyée par l'instabilité mécanique du matériel optique (cf. composante 1 de l'ACP). La quasi-intégralité de la variance entre les spectres bruts est alors expliquée par des variations du niveau de signal. Toujours sur ces signaux bruts, l'ACP permet tout de même de suivre le dépôt de spores grâce à la deuxième composante. Cette composante n'explique qu'environ 0,015 % de la variance, et dénote de la difficulté à travailler sans outils statistiques. En effet, ces différences ne sont pas décelables directement.

Si l'ACP a permis de mettre en évidence le fait que le dépôt des spores perturbe bien la transmission du signal, a priori via l'interaction des spores avec le champ évanescent, la contribution spectrale (« loading » de la deuxième composante principale) ne correspond pas à une atténuation du signal en fonction de la longueur d'onde. Elle ne semble donc pas traduire un phénomène de diffusion. Ce qu'on observe relève surtout du bruit, et ceci pour les deux tests réalisés.

Pour expliquer la faible contribution apportée par le dépôt des spores et le fait que le « loading » ne s'apparente pas à un spectre de diffusion comme attendu, nous pouvons émettre quelques hypothèses :

- La quantité d'analytes interagissant avec le champ évanescent est trop faible. Même si une centaine de spores sont potentiellement détectables d'après le comptage effectué après les 5 dépôts successifs, une quantité plus importante de spores pourrait peut-être permettre d'observer le phénomène de diffusion de Mie.

- Les spores immobilisées sur le guide d'onde et ses flancs se traduisent par une modification locale de la rugosité des guides d'onde. Une modification de la rugosité des guides d'onde modifie le signal transmis et pourrait expliquer l'obtention d'un signal plus bruité.

Pour conclure, ces premiers résultats optiques sont encourageants, mais nécessitent des études plus approfondies et l'optimisation des protocoles. La mesure réalisée dans la région spectrale allant de 1,2 à 2 μm n'a pas permis de mettre en évidence la signature spectrale des spores de Magnaporthe. A ce stade, et dans cette région spectrale en tous les cas, il ne paraît donc pas encore possible de discriminer une spore d'une autre bio-particule (bactérie, pollen), ou encore d'une poussière inorganique. Plusieurs pistes peuvent toutefois être proposées pour améliorer la détection :

- L'information sur les spores explique moins de 0,02 % des différences spectrales. L'instabilité du signal masque ces différences. Pour stabiliser ces mesures, il conviendrait de connecter les faces d'entrée et de sortie directement à des fibres optiques.

- La gamme du proche infrarouge donne lieu à un phénomène de diffusion de Mie très important, masquant les absorptions des molécules présentes dans les spores. La première partie de ce chapitre a révélé que la gamme du moyen-infrarouge est marquée par de

nombreuses raies d'absorption. Les chalcogénures Ge-Se-Te choisis pour cette étude étant transparents jusque 16 μm environ, une détection des spores dans le moyen-infrarouge pourra être envisagée et devrait donner des résultats plus probants.

- Envisager des structures guidantes avec des géométries plus complexes permettant d'augmenter l'intensité du champ évanescent pourrait améliorer la détection. Dans notre configuration, la fraction de l'intensité lumineuse se propageant sous forme évanescente est en effet seulement de l'ordre de 10^{-5} [TalebBendiad2020].

D.III. Conclusion

Ce dernier chapitre était dédié aux premières expérimentations avec les spores. Nous avons pu vérifier que les spores de *Magnaporthe oryzae* s'immobilisaient préférentiellement sur les couches chalcogénures Ge-Se-Te fonctionnalisées avec le mélange de précurseurs TEOS + OTMS. Les longues chaînes carbonées de l'OTMS rendent en effet la surface Ge-Se-Te plus hydrophobe, et donc plus favorable à l'immobilisation des spores, elles-mêmes hydrophobes. Cette tendance peut être expliquée à la fois par une affinité surface-spore plus importante, mais aussi par l'inefficacité du rinçage à l'eau d'une surface hydrophobe. Lorsque la surface est modifiée géométriquement de sorte à obtenir des créneaux rectilignes (qui constituent les guides d'onde), ceux-ci participent à l'immobilisation. Finalement, la meilleure stratégie de fonctionnalisation consisterait à fonctionnaliser intégralement le composant constitués de plusieurs guides d'onde avec le mélange de précurseurs TEOS + OTMS. Le taux d'immobilisation des spores dans la zone de détection, constituée par les guides et les flancs des guides, serait alors de 38,5 %. Ce taux est 2,7 fois plus important que celui obtenu pour un composant non fonctionnalisé (14,4 %). On peut supposer que la sensibilité de la sonde vis-à-vis de la détection des spores serait augmentée d'un facteur comparable.

L'interaction des spores avec la lumière infrarouge donne lieu à un important phénomène de diffusion de Mie. En effet, les tailles des spores et des ondes électromagnétiques sont du même ordre de grandeur. Cette diffusion est plus prononcée dans le proche infrarouge, gamme dans laquelle nous n'avons pas pu observer de phénomène d'absorption. En exploitant finement les phénomènes de diffusion observés, il devrait être possible de récupérer des informations sur la taille, la forme et l'indice de réfraction des particules. Mais

comme établi par l'étude bibliographique de ce manuscrit, la gamme du moyen-infrarouge est beaucoup plus riche en informations. C'est donc en travaillant dans le moyen infrarouge qu'à terme la discrimination entre une spore fongique de tout autre particule présente dans l'aérosol devrait être rendue possible. Mais aujourd'hui la technologie n'est pas encore développée, ou du moins n'est pas accessible à des coûts raisonnables pour des applications agricoles.

Enfin, nous avons testé la détection de spores via nos guides d'onde dans la gamme du proche infrarouge (entre 1,2 et 2 μm). Lorsque que les spores sont déposées sur nos guides d'onde Ge-Se-Te, le signal transmis est perturbé. Grâce aux analyses en composantes principales, il est possible de suivre le dépôt des spores. Toutefois, ces résultats encourageants restent exploratoires : le dépôt des spores n'est responsable que de 0,02 % des variations de l'intensité transmise, et il n'a pas été possible de mettre en évidence une signature spectrale spécifique aux spores de Magnaporthe. Plusieurs pistes ont été évoquées pour poursuivre ces travaux, à commencer par la stabilisation du système de détection.

Conclusion générale & Perspectives

Le travail de cette thèse s'est inscrit dans un contexte de réduction de l'usage des produits fongicides en agriculture. L'utilisation de ces produits chimiques, destinés à protéger les espèces végétales cultivées contre les maladies fongiques, s'accompagne en effet d'impacts préjudiciables pour l'environnement et la santé.

La stratégie que nous avons privilégiée pour réduire la quantité de produits utilisés est une détection précoce des maladies fongiques des plantes. Détecter les maladies le plus tôt possible, c'est en effet éviter de répandre des produits en préventif. C'est donc répandre uniquement au bon moment et au bon endroit. Ces maladies fongiques étant causées par des champignons ou pseudo-champignons, leur détection précoce passe par la détection de leurs spores. Ce sont en effet ces spores qui, via leur dispersion passive dans l'espace, sont responsables de la propagation des maladies. Dans ce travail de thèse, nous avons étudié la faisabilité d'une détection précoce des spores par voie optique, en utilisant des guides d'onde chalcogénures comme sondes. La sélectivité des capteurs étant primordiale pour discriminer les spores des poussières ou les spores de différentes maladies par exemple, deux solutions ont été envisagées : la fonctionnalisation des guides d'onde en vue d'une captation spécifique et le recours à la spectroscopie infrarouge.

Dans la Chapitre A de ce manuscrit, une étude bibliographique portant sur la détection des maladies fongiques, les guides d'ondes infrarouges pour la détection et la fonctionnalisation des matériaux, a permis de confirmer le besoin en méthodes de détection précoce des maladies et l'intérêt des micro-capteurs optiques. Elle a également permis d'identifier deux voies de fonctionnalisation pertinentes pour les couches minces chalcogénures : la voie peptidique et la silanisation. Elle a enfin mis en évidence le fait que les spores des champignons phytopathogènes adhèrent préférentiellement sur les surfaces hydrophobes. En revanche, il semble difficile de trouver des précurseurs qui permettraient une capture réellement sélective des spores. La fonctionnalisation telle qu'elle avait été imaginée au départ n'est donc pas une solution envisageable pour réaliser des capteurs spécifiques à un type de spores donné. En revanche elle pourrait permettre de gagner en sensibilité.

Le chapitre B a ensuite été consacré à la fonctionnalisation des couches minces chalcogénures de composition $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$. Les deux voies de fonctionnalisation identifiées dans le chapitre A ont été testées. Pour s'assurer de la fonctionnalisation effective des couches, il a été choisi de travailler avec des peptides et des organosilanes biotinylés, puis de vérifier la présence des groupements biotines à la surface des couches par la capture spécifique des molécules de streptavidine. En effet, la biotine et la streptavidine présentent une très grande affinité. Quelle que soit la voie de fonctionnalisation utilisée, la streptavidine a pu être fixée à la surface des couches chalcogénures, validant ainsi les protocoles utilisés.

Il est à noter que les peptides s'adsorbent sur les couches chalcogénures via de multiples interactions faibles, favorisées par une affinité hydrophobe-hydrophobe. L'utilisation de précurseurs organosilanes permet quant à elle d'établir de nouvelles liaisons covalentes à la surface des couches $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$. L'étude par XPS a permis de mettre en évidence la rupture des liaisons Te-Te, la formation de nouvelles liaisons Te-O, et donc la formation de groupements Te-O-Si. Pour continuer cette étude, il pourrait être intéressant de modifier la stœchiométrie de la couche de cœur. En effet, dans la composition retenue dans le cadre des travaux précédents et conservée pour cette étude, à savoir $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$, le tellure est l'élément en quantité la plus faible. Augmenter son taux permettrait d'augmenter la quantité de liaisons Te-Te et de rendre la fonctionnalisation encore plus efficace. Cependant, une modification de la stœchiométrie de la couche de cœur s'accompagnerait d'une modification de son indice de réfraction et impliquerait une modification globale du design choisi. Une autre astuce consisterait à tirer profit du procédé de co-évaporation utilisé pour déposer les couches : la composition des matériaux Ge-Se-Te est directement déterminée par la vitesse d'évaporation de chaque élément. A défaut de modifier la stœchiométrie des couches $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$, il serait possible d'enrichir la couche en tellure en toute fin du procédé de co-évaporation. L'extrême surface serait donc plus riche en tellure, et la formation de liaisons Te-O-Si plus quantitative.

Pour favoriser l'immobilisation des spores sur les couches minces Ge-Se-Te, la modification de leur caractère hydrophile-hydrophobe a été une stratégie privilégiée. Pour ce faire, la voie organosilane a été retenue et deux précurseurs différents ont été étudiés : l'un (le tétraéthoxysilane ou TEOS) permet de rendre la surface plus hydrophile (de 85 à 50°) et l'autre (un mélange d'octyl-triméthoxysilane et de tétraéthoxysilane, ou OTMS + TEOS)

permet de rendre la surface plus hydrophobe (de 85 à 110°). Les tests d'immobilisation ont, comme attendu, démontré une plus forte affinité des spores pour les couches minces rendues hydrophobes. Ce résultat a motivé un travail sur la fonctionnalisation sélective des guides d'onde, travail faisant l'objet du Chapitre C de ce manuscrit.

Les composants sur lesquels le travail a été mené sont constitués de plusieurs séries de guides d'onde droits, espacés de quelques centaines de micromètres. L'idée a été d'essayer de fonctionnaliser sélectivement soit les zones situées entre les guides, soit les guides d'onde uniquement. Ces deux zones correspondent respectivement aux zones passive et active du futur capteur. Deux protocoles ont été élaborés puis testés avec succès, à chaque fois avec les deux types de précurseurs, TEOS d'une part et OTMS + TEOS d'autre part. Il a été démontré qu'il est tout-à-fait possible de fonctionnaliser de manière sélective les composants. Cela étant, le protocole de fonctionnalisation du dessus des guides pourrait être amélioré : la gravure à l'acide chlorhydrique de la couche sacrificielle d'aluminium n'est pas sans effet sur la fonctionnalisation et l'intégrité de la couche chalcogénure. L'utilisation d'un autre matériau sacrificiel pourrait permettre d'obtenir un meilleur contraste et/ou une plus forte densité de précurseurs accrochés.

Les tests d'immobilisation des spores sur les composants ont été concluants : le taux de spores immobilisées sur les guides d'onde est plus important quand les zones entre les guides sont plus hydrophiles, ou au contraire quand les guides d'onde sont plus hydrophobes. Mais finalement le taux d'immobilisation de spores le plus important a été obtenu en fonctionnalisant la totalité du composant avec le mélange de précurseurs OTMS + TEOS. En effet, en plus d'une forte affinité hydrophobe-hydrophobe entre spores et surface, le rinçage à l'eau des surfaces hydrophobes est parfaitement inefficace. Ces résultats sont très encourageants et laissent espérer un gain en sensibilité d'un facteur 2,7 environ. Pour aller vers des capteurs sélectifs, l'intérêt a enfin été porté sur la réponse spectrale des spores.

Les différentes particules en suspension dans l'aérosol ayant des spectres d'absorption différents, utiliser la spectroscopie infrarouge devrait en effet permettre de discriminer une spore potentiellement nuisible d'une autre particule inoffensive. Dans ce contexte, le Chapitre D a porté sur l'étude de la réponse optique des spores d'une part, puis sur la réponse des guides d'onde vis-à-vis du dépôt de spores sur leur surface d'autre part. Concernant l'étude spectrale des spores, une forte diffusion a été observée dans la gamme du proche infrarouge

(0,8-2,5 μm). Cette diffusion de Mie est sensible à la morphologie et à la structure des particules (taille, forme, rugosité, organites) : une étude plus poussée des spectres de diffusion pourrait donc permettre de discriminer des spores de différentes espèces, mais la gamme du moyen infrarouge, entre 2,5 et 20 μm , serait plus propice. En effet, dans cette gamme, les absorptions des molécules constitutives des spores peuvent facilement être identifiées. Les matériaux chalcogénures choisis pour réaliser les guides d'onde étant transparents jusque 16 μm environ, il sera donc, à terme, judicieux d'étudier la réponse spectrale en sortie des guides entre 2,5 et 16 μm . Mais dans le cadre de cette thèse, les guides d'onde n'ont pu être éprouvés que dans la gamme allant de 1 à 2 μm environ. Il est à noter que la technologie n'est de toute façon pas mûre dans le moyen infrarouge où sources et détecteurs peu onéreux font encore défaut. Travailler dans le moyen infrarouge se traduirait donc par des coûts très importants, incompatibles avec les applications agricoles.

Pour conclure ce travail de thèse, des spores de *Magnaporthe* ont été déposées sur la surface d'un guide d'onde de façon répétée, et les spectres en sortie du guide ont été enregistrés. Comme attendu, étant donné que la diffusion domine dans cette gamme de longueurs d'onde, aucune information directe n'a pu être obtenue. En revanche, grâce à l'analyse multivariée, il a été possible de corrélérer la réponse optique des guides avec les dépôts des spores. Il a donc été montré que les guides d'onde étaient sensibles au dépôt de spores sur leur surface, ce qui constitue un premier résultat encourageant.

Ces premiers tests de détection ouvrent de nombreuses perspectives : (i) l'instabilité du banc de mesure a pu être identifié. Plus de 99% des variations d'intensité sont en effet provoquées par des instabilités mécaniques entre les différentes optiques. Connecter les faces d'entrée et de sortie des guides d'onde permettrait une amélioration majeure du système de détection. (ii) La gravure des guides d'onde s'accompagne d'une rugosité sur les flancs des guides. Cette rugosité, de l'ordre de 0,3 μm d'après les analyses AFM, est modifiée lorsque des spores sont immobilisées sur les flancs. Cela induit une modification du signal transmis, qui se traduit par une augmentation du bruit. Réduire la rugosité des flancs des guides, mais aussi comprendre les phénomènes induits par ces rugosités sur le signal transmis pourrait permettre d'optimiser la réponse des guides vis-vis du dépôt des spores. (iii) Envisager des structures guidantes avec des géométries plus complexes permettant d'augmenter l'intensité du champ évanescent

pourrait améliorer la détection. Dans notre configuration, la fraction de l'intensité lumineuse se propageant sous forme évanescente est en effet seulement de l'ordre de 10^{-5} .

Des questions restent par ailleurs en suspens. Les guides d'onde fonctionnalisés n'ont en effet pas encore été testés. Il reste donc à vérifier que la silanisation de surface ne compromet pas le bon guidage des guides. Il faudra ensuite vérifier si l'augmentation du taux d'immobilisation des spores sur les guides fonctionnalisés permettra effectivement d'augmenter la sensibilité.

Liste des figures

<i>Figure A.1. Cycle de vie du phytopathogène.</i>	<i>8</i>
<i>Figure A.2. Structures chimiques de quelques COVs émis par les plantes sous stress biotique ou non biotique</i>	<i>9</i>
<i>Figure A.3. Photographie de feuilles de riz atteintes de la Pyriculariose, maladie provoquée par le champignon phytopathogène appelé Magnaporthe grisea</i>	<i>10</i>
<i>Figure A.4. Représentation schématique de différentes spores fongiques et autres bio-particules communément présentes dans l'aérosol</i>	<i>11</i>
<i>Figure A.5. Spectres de réflexion visible-proche-infrarouge de feuilles de citron saines (en vert), et infectées par la maladie du dragon jaune (en rouge)</i>	<i>14</i>
<i>Figure A.6. Evolution de la concentration de COVs émis par le maïs, après inoculation avec le Fusarium graminearum (fusariose)</i>	<i>16</i>
<i>Figure A.7. Tailles en micromètre des particules communément présentes dans l'aérosol</i>	<i>18</i>
<i>Figure A.8. Le caractère hydrophobe des feuilles.....</i>	<i>19</i>
<i>Figure A.9. Pourcentage de spores fixées sur différentes surfaces en fonction de leur mouillabilité.....</i>	<i>20</i>
<i>Figure A.10. Images optiques (295 µm x 225 µm) de spores de Phanerochaete chrysosporium sur une surface en polycarbonate non traitée (NT), et fonctionnalisée avec des polycations (PEI ou PAA).....</i>	<i>21</i>
<i>Figure A.11. Spectres d'absorption infrarouge d'aérosols biologiques. Les spectres des spores (à gauche) sont différents des spectres des pollens (à droite).....</i>	<i>23</i>
<i>Figure A.12. L'analyse multivariée, telle que l'ACP (Analyse en Composantes Principales), permet d'identifier des aérosols grâce à leurs spectres d'absorption infrarouge</i>	<i>24</i>
<i>Figure A.13. Confinement de la lumière dans la couche de cœur par réflexions totales internes aux interfaces avec le substrat et le superstrat.....</i>	<i>27</i>
<i>Figure A.14. Profils de différents modes de propagation.</i>	<i>28</i>
<i>Figure A.15. Mise en évidence de l'interaction de l'onde évanescente, dont la profondeur de pénétration est dév, avec le milieu extérieur dans un guide d'onde en technologie planaire. ..</i>	<i>29</i>

<i>Figure A.16. Interaction des analytes et de l'onde évanescente, phénomène à la base de la détection par spectroscopie infrarouge.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure A.17. Résonateur à anneaux en silicium pour la détection de protéines.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure A.18. Illustration du principe de détection d'analytes en solution aqueuse par dépôt d'une couche barrière hydrophobe sur un guide d'onde.....</i>	<i>34</i>
<i>Figure A.19. Illustration de la fonctionnalisation d'un guide d'onde par des récepteurs spécifiques.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure A.20. Exemple d'un procédé de fonctionnalisation nécessitant plusieurs étapes.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure A.21. Processus de fonctionnalisation d'une surface par l'APTES.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure A.22. Vitesse des réactions d'hydrolyse et de condensation en fonction du pH lors de la fonctionnalisation.....</i>	<i>42</i>
<i>Figure A.23. Liste des 21 acides aminés à partir desquels sont construits les peptides.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure A.24. Image de microscopie à fluorescence d'une surface en silice avec un motif en nitrure de gallium.....</i>	<i>46</i>
<i>Figure B.1. Schémas récapitulatifs des deux voies de fonctionnalisation utilisées.....</i>	<i>55</i>
<i>Figure B.2. Illustrations de la pointe AFM OMCL-AC240TS utilisée pour nos analyses en microscopie à force atomique.....</i>	<i>57</i>
<i>Figure B.3. Images de la topographie ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$) et profils de la surface d'une couche $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$: (a) juste après dépôt, (b) après incubation avec le peptide LLA biotinylé, et (c) après incubation avec le BSA et la streptavidine.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure B.4. Images de la topographie ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$) et profils de la surface d'une couche $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$: (a) juste après dépôt, (b) après incubation avec le peptide SVS biotinylé, et (c) après incubation avec le BSA et la streptavidine.....</i>	<i>59</i>
<i>Figure B.5. Images de la topographie ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$) et profils de la surface d'une couche $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$: (a) juste après dépôt, (b) après incubation avec l'APTES biotinylé, et (c) après incubation avec le BSA et la streptavidine.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure B.6. Rugosités (moyennes quadratiques) des couches minces $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$ avant et après incubation avec les précurseurs biotinylés, et après incubation avec le BSA et la STV</i>	<i>62</i>

<i>Figure B.7. Diamètres du cerce équivalent (DCE), (b) hauteur et (c) circularité des particules visibles sur les images AFM après incubation avec les protéines BSA puis STV.....</i>	<i>63</i>
<i>Figure B.8. Angles de contact mesurés sur les couches minces Ge-Se-Te juste après dépôt (à gauche), après incubation avec les précurseurs non biotinylés (en pointillés), après incubation avec les précurseurs biotinylés, et après incubation avec les protéines BSA et STV (à droite)...</i>	<i>65</i>
<i>Figure B.9. Séquences des peptides LLA (a) et SVS (b) avec les caractères hydrophobes-hydrophiles de chaque acide aminé les constituant.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure B.10. Spectres FTIR-ATR des couches minces Ge-Se-Te fonctionnalisées avec les peptides ou l'APTES biotinylés, après incubation avec la protéine BSA (en pointillés) et après incubation avec la streptavidine STV (en traits continus).....</i>	<i>69</i>
<i>Figure B.11. Déconvolution des bandes d'absorption Amide I vers 1650 cm^{-1} : après incubation avec BSA (en haut) et après incubation avec STV (en bas).....</i>	<i>70</i>
<i>Figure B.12. Structures secondaires des protéines BSA et STV</i>	<i>72</i>
<i>Figure B.13. Formules semi-développées des précurseurs utilisés.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure B.14. Protocole utilisé (dip coating) pour fonctionnaliser les couches Ge-Se-Te.....</i>	<i>76</i>
<i>Figure B.15. En haut : profil des gouttes déposées sur les différentes surfaces. En bas : angles de contact correspondants.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure B.16. Images topographiques AFM des surfaces Ge-Se-Te avant fonctionnalisation (A), puis après fonctionnalisation avec le TEOS (B) et le mélange TEOS + OTMS (C)</i>	<i>78</i>
<i>Figure B.17. Spectres XPS d'une couche chalcogénure $\text{Ge}_{25}\text{Se}_{55}\text{Te}_{20}$ avant fonctionnalisation (Référence), puis après fonctionnalisation avec l'APTES (bleu), avec OTMS+TEOS (vert foncé) et avec TEOS (rouge).....</i>	<i>80</i>
<i>Figure B.18. Spectres XPS de l'orbitale 2p du silicium pour les trois surfaces fonctionnalisées (à gauche), et déconvolution de cette orbitale pour la surface OTMS+TEOS (à droite).....</i>	<i>83</i>
<i>Figure B.19. Déconvolution de l'orbitale Te3d de la surface Ge-Se-Te sans fonctionnalisation.</i>	<i>85</i>
<i>Figure B.20. Spectres XPS des orbitales Te3d_{5/2} et Te3d_{3/2} des couches Ge-Se-Te avant et après fonctionnalisation</i>	<i>86</i>
<i>Figure B.21. Scan et déconvolution de l'orbitale Ge3d pour une couche Ge-Se-Te avant fonctionnalisation.....</i>	<i>88</i>

Figure B.22. A gauche : schématisation des surfaces Ge-Se-Te obtenues après fonctionnalisation avec les différents précurseurs (en haut : TEOS ; au milieu : TEOS + OTMS ; en bas : APTES). A droite : propriétés et caractéristiques correspondantes89

Figure C.1. A gauche : profil de champ du mode fondamental guidé au sein d'un guide d'onde. A droite : mise en évidence du champ évanescents par « extinction » des fortes intensités.....93

Figure C.2. Schéma résumant les étapes de fabrication des guides d'onde à base de couches minces Ge-Se-Te94

Figure C.3. A gauche, schéma du guide d'onde avec ses dimensions caractéristiques. A droite : image par microscopie électronique à balayage d'un guide d'onde RIB.....96

Figure C.4. A gauche : image AFM en 3D d'un guide d'onde après gravure par usinage ionique, avec les nouvelles conditions de dépôt de la résine positive. A droite, histogramme des hauteurs97

Figure C.5. Schéma résumant le protocole de fabrication des composants fonctionnalisés dans les zones séparant les différents guides d'onde98

Figure C.6. Images AFM : en haut à gauche, topographie de la surface d'un guide d'onde, zone non fonctionnalisée ; en haut à droite, topographie de la zone située entre deux guides d'onde, fonctionnalisée avec le précurseur TEOS100

Figure C.7. Images AFM : en haut à gauche topographie de la surface d'un guide d'onde, zone non fonctionnalisée ; en haut à droite, topographie de la zone située entre deux guides d'onde, fonctionnalisée avec le mélange de précurseurs TEOS + OTMS.....101

Figure C.8. Sur une surface structurée avec les guides droits, la goutte adopte une forme de demi-ellipsoïde, donnant lieu à deux angles de contact différents102

Figure C.9. Valeurs des angles de contact obtenues en analysant la surface : des composants non fonctionnalisés (croix noires), des composants fonctionnalisés entre les guides (croix bleues) et des composants fonctionnalisés pleine plaque (croix vertes) ; à gauche en utilisant le précurseur TEOS, et à droite en utilisant le mélange de précurseurs TEOS + OTMS.....103

Figure C.10. Photographies optiques des fronts de contact d'une goutte d'eau déposée104

Figure C.11. Formule semi-développée du précurseur fluorescent silylé.....105

Figure C.12. Spectres d'excitation et d'émission de la fluorescéine106

<i>Figure C.13. Images de fluorescence des surfaces après fonctionnalisation (A) et après nettoyage à l'acétone (B).....</i>	<i>107</i>
<i>Figure C.14. Profil d'intensité de la surface fonctionnalisée entre les guides avec l'organosilane fluorescent.....</i>	<i>108</i>
<i>Figure C.15. En haut : image de microscopie à fluorescence d'une surface fonctionnalisée pleine plaque avec la fluorescéine.....</i>	<i>108</i>
<i>Figure C.16. Schéma résumant la fabrication des guides d'onde avec fonctionnalisation sur le dessus des guides.....</i>	<i>111</i>
<i>Figure C.17. Images de microscopie optique : (A) de la surface après usinage ionique avec la résine sur les guides ; (B) de la surface après évaporation de 20 nanomètres de métal, beaucoup plus réfléchissante et (C), de la surface après dissolution de la résine.....</i>	<i>112</i>
<i>Figure C.18. Images de microscopie à fluorescence, avant gravure avec l'acide chlorhydrique (A), et après gravure (B).....</i>	<i>113</i>
<i>Figure C.19. Profil d'intensité de fluorescence pour la fonctionnalisation sur le dessus des guides.....</i>	<i>114</i>
<i>Figure C.20. En haut, images obtenues en spectroscopie de fluorescence pour les deux stratégies de fonctionnalisation utilisées ; en bas, schémas correspondant à la fonctionnalisation effective.....</i>	<i>116</i>
<i>Figure D.1. Schéma du protocole de préparation des solutions pour réaliser les tests d'accrochage des spores de Magnaporthe sur nos surfaces chalcogénures.....</i>	<i>121</i>
<i>Figure D.2. Images optiques : (A) de la surface chalcogénure Ge-Se-Te fonctionnalisée, (B) de la même surface après pulvérisation des spores et (C) de la même surface après rinçage.....</i>	<i>121</i>
<i>Figure D.3. Angle de contact et immobilisation des spores.....</i>	<i>122</i>
<i>Figure D.4. Angle de contact et immobilisation des spores sur deux échantillons fonctionnalisés sur la moitié de leur surface.....</i>	<i>123</i>
<i>Figure D.5. Angle de contact et immobilisation des spores sur les guides d'onde.....</i>	<i>124</i>
<i>Figure D.6. A gauche : mise en évidence du champ évanescent par simulation. A droite : image optique d'un guide d'onde vu du dessus.....</i>	<i>125</i>
<i>Figure D.7. Pourcentage des spores présentes dans la zone de détection après pulvérisation.....</i>	<i>127</i>

<i>Figure D.8. Angle de contact et immobilisation des spores sur des guides d'onde.....</i>	<i>129</i>
<i>Figure D.9. Angle de contact de la surface avec guide fonctionnalisée intégralement avec le mélange de précurseurs TEOS + OTMS.....</i>	<i>129</i>
<i>Figure D.10. Pourcentage des spores présentes dans la zone de détection après pulvérisation</i>	<i>131</i>
<i>Figure D.11. Spectres d'absorption dans le proche infrarouge : (A) des spores de Magnaporthe oryzae en solution dans l'eau, et (B) de l'eau</i>	<i>134</i>
<i>Figure D.12. Spectres d'absorption des spores. (A) : en milieu liquide avec soustraction de l'eau, et (B) : les spores sèches après évaporation du solvant</i>	<i>135</i>
<i>Figure D.13. Spectres enregistrés entre 1 et 2,5 μm pour des spores sèches de Magnaporthe oryzae, Fusarium et Botrytis.....</i>	<i>137</i>
<i>Figure D.14. Spectre d'absorption dans la gamme 2,5 – 15 μm des spores sèches de Magnaporthe oryzae</i>	<i>138</i>
<i>Figure D.15. Banc optique.....</i>	<i>140</i>
<i>Figure D.16. Image au microscope optique d'une portion du guide d'onde de travail après dépôt des spores et enregistrement des spectres</i>	<i>141</i>
<i>Figure D.17. Intensités brutes transmises et enregistrées en sortie du guide d'onde interrogé</i>	<i>142</i>
<i>Figure D.18. Résultats de l'analyse en composantes principales effectuée à partir des signaux bruts enregistrés en sortie de guide et présentés sur la Figure D.17</i>	<i>144</i>
<i>Figure D.19. Résultats de l'analyse en composantes principales effectuée à partir de la deuxième série de signaux bruts enregistrés en sortie d'un nouveau guide</i>	<i>146</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau A.1. Méthodes de détection de maladie sur site.....</i>	<i>12</i>
<i>Tableau A.2. Etat des lieux des publications impliquant l'utilisation de guides d'onde chalcogénures pour la détection de molécules de gaz ou de liquide</i>	<i>31</i>
<i>Tableau A.3. Travaux portant sur la fonctionnalisation covalente et spécifique de matériaux chalcogénures.....</i>	<i>38</i>
<i>Tableau A.4. Travaux portant sur la fonctionnalisation des matériaux chalcogénures par dépôt d'une couche de polymère ou métallique</i>	<i>39</i>
<i>Tableau A.5. Travaux portant sur la fonctionnalisation de matériaux chalcogénures riches en sélénium</i>	<i>40</i>
<i>Tableau A.6. Energie des liaisons possibles dans les couches minces chalcogénures du système ternaire Ge-Se-Te (haut du tableau) et énergie des liaisons des différents éléments des couches Ge-Se-Te avec l'oxygène (bas du tableau)</i>	<i>44</i>
<i>Tableau B.1. Propriétés physico-chimiques de ces deux séquences peptidiques LLA et SVS</i>	<i>67</i>
<i>Tableau B.2. Résultats issus des déconvolutions des bandes d'absorption Amide I après incubation avec la protéine BSA.....</i>	<i>71</i>
<i>Tableau B.3. Résultats issus des déconvolutions des bandes d'absorption Amide I après incubation de la protéine STV.....</i>	<i>71</i>
<i>Tableau B.4. Rapports stœchiométriques calculés à partir des spectres XPS et rapports théoriques, pour les trois surfaces fonctionnalisées avec l'APTES, le mélange OTMS + TEOS et le TEOS</i>	<i>81</i>
<i>Tableau B.5. Energies d'ionisation des orbitales Te3d5/2 et Te3d3/2 des surfaces avant (colonne Ge-Se-Te) et après fonctionnalisation avec les différents précurseurs (colonnes APTES, OTMS + TEOS et TEOS, respectivement)</i>	<i>86</i>

Bibliographie

[Abrosimova2016]

ABROSIMOVA, K. V., SHULENINA, O. V. & PASTON, S. V., FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin, *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 769, 2016, 012016

[Agbe2020]

AGBE, H., SARKAR, D. K. & CHEN, X.-G., Tunable Superhydrophobic Aluminum Surfaces with Anti-Biofouling and Antibacterial Properties, *Coatings*, vol. 10, 2020, Nr. 10

[Alberto2015]

ALBERTO, A. A., LAZZARA, V., CAPPELLIN, L., BIANCHEDI, P. L., SCHUHMACHER, R., WOHLFAHRT, G., PERTOT, I., BIASIOLI, F. & PERAZZOLLI, M., Emission of volatile sesquiterpenes and monoterpenes in grapevine genotypes following *Plasmopara viticola* inoculation in vitro, *Journal of Mass Spectrometry* 50, vol., 2015, Nr. 8, 1013-1022

[Ali2013]

ALI, M., CARTER, E., SORRELL, T., POWER, D., LAY, P., ALI, C. & AL-SAAD, K., Infrared spectroscopy as an ultrastructure bio-probe for fungal cellular characterization, *International Journal of Applied Chemistry*, vol. 9, 2013, 219-233

[Ali2019]

ALI, M. M., BACHIK, N. A., MUHADI, N. 'A., NORIZAN, T. & GOMES, C., Non-destructive techniques of detecting plant diseases: A review, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 108, 2019, 101426

[Alimaghham2019]

ALIMAGHAM, F., PLATKOV, M., PRESTAGE, J., BASOV, S., IZAKSON, G., KATZIR, A., ELLIOTT, S. R. & HUTTER, T., Mid-IR evanescent-field fiber sensor with enhanced sensitivity for volatile organic compounds, *RSC Adv.*, vol. 9, 2019, 21186-21191

[Alwis2013]

ALWIS, L., SUN, T. & GRATTAN, K. T. V., Optical fibre-based sensor technology for humidity and moisture measurement: Review of recent progress, *Measurement*, vol. 46, 2013, Nr. 10, 4052-4074

[Amalric2011]

AMALRIC, J. & MARCHAND-BRYNAERT, J., Surface modification of amorphous substrates by disulfide derivatives: A photo-assisted route to direct functionalization of chalcogenide glasses, *Surface Science*, vol. 605, 2011, Nr. 23, 2006-2016

[Amalric2012]

AMALRIC, J., POLEUNIS, C., DELCORTE, A. & MARCHAND-BRYNAERT, J., Static SIMS study on surfaces of chalcogenide glasses modified by an organic layer, *Surface Science*, vol. 606, 2012, Nr. 13, 1071-1077

[Amalric2014]

AMALRIC, J., HAMMAECHER, C., GOORMAGHTIGH, E. & MARCHAND-BRYNAERT, J., Surface photografting

of arylazide derivatives on chalcogenide glasses, *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 387, 2014, 148-154

[Arreola2016]

ARREOLA, J., MÄTZKOW, M., DURÁN, M. P., GREEFF, A., KEUSGEN, M. & SCHÖNING, M. J., Optimization of the immobilization of bacterial spores on glass substrates with organosilanes, *physica status solidi (a)*, vol. 213, 2016, Nr. 6, 1463-1470

[Arreola2017]

ARREOLA, J., OBERLÄNDER, J., MÄTZKOW, M., KEUSGEN, M. & SCHÖNING, M. J., Surface functionalization for spore-based biosensors with organosilanes, *Electrochimica Acta*, vol. 241, 2017, 237-243

[Arreola2019]

ARREOLA, J., KEUSGEN, M. & SCHÖNING, M. J., Toward an immobilization method for spore-based biosensors in oxidative environment, *Electrochimica Acta*, vol. 302, 2019, 394-401

[Arshak2004]

ARSHAK, K., MOORE, E., ÓLAIGHIN, G., HARRIS, J. & CLIFFORD, S., A Review of Gas Sensors Employed in Electronic Nose Applications, *Sensor Review*, vol. 24, 2004, 181-198

[Barth2007]

BARTH, A., Infrared spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1767, 2007, Nr. 9, 1073-1101

[Bassan2010]

BASSAN, P., KOHLER, A., MARTENS, H., LEE, J., BYRNE, H. J., DUMAS, P., GAZI, E., BROWN, M., CLARKE, N. & GARDNER, P., Resonant Mie Scattering (RMieS) correction of infrared spectra from highly scattering biological samples, *Analyst*, vol. 135, 2010, 268-277

[Bastert1999]

BASTERT, J., C KORTING, H., TRAENKLE, P. & SCHMALRECK, A., Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), *Mycoses*, vol. 42, 1999, 525-528

[Baudet2016]

BAUDET, E., GUTIERREZ-ARROYO, A., NEMEC, P., BODIOU, L., LEMAITRE, J., SAGAZAN, O. D., LHERMITTE, H., RINNERT, E., MICHEL, K., BUREAU, B., CHARRIER, J. & NAZABAL, V., Selenide sputtered films development for MIR environmental sensor, *Opt. Mater. Express*, vol. 6, 2016, Nr. 8, 2616-2627

[Beauvoit1993]

BEAUVOIT, B., LIU, H., KANG, K., KAPLAN, P. D., MIWA, M. & CHANCE, B., Characterization of absorption and scattering properties for various yeast strains by time-resolved spectroscopy, *Cell Biophysics*, vol. 23, 1993, Nr. 1, 91-109

[Becker2014]

BECKER, E.-M., HERRFURTH, C., IRMISCH, S., KÖLLNER, T. G., FEUSSNER, I., KARLOVSKY, P. & SPLIVALLO, R., Infection of Corn Ears by *Fusarium* spp. Induces the Emission of Volatile Sesquiterpenes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, 2014, Nr. 22, 5226-5236

[Bekshaev2013]

BEKSHAEV, A. Y., BLOKH, K. Y. & NORI, F., Mie scattering and optical forces from evanescent fields: a complex-angle approach, *Optics express*, vol. 21, 2013, Nr. 6, 7082-7095

[Belanger2008]

BÉLANGER, M., ROGER, J., CARTOLARO, P., VIAU, A. A. & BELLON-MAUREL, V., Detection of powdery mildew in grapevine using remotely sensed UV-induced fluorescence, *International Journal of Remote Sensing*, vol. 29, 2008, Nr. 6, 1707-1724

[Bendiab2019]

BENDIAB, A., RYCKEWAERT, M., HERAN, D., ESCALIER, R., KRIBICH, R., VIGREUX, C. & BENDOULA, R., Coupling Waveguide-Based Micro-Sensors and Spectral Multivariate Analysis to Improve Spray Deposit Characterization in Agriculture, *Sensors*, vol. 19, 2019, 4168

[Bombalska2011]

BOMBALSKA, A., MULARCZYK-OLIWA, M., KWAŚNY, M., WŁODARSKI, M., KALISZEWSKI, M., KOPCZYŃSKI, K., SZPAKOWSKA, M. & TRAFNY, E. A., Classification of the biological material with use of FTIR spectroscopy and statistical analysis, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 78, 2011, Nr. 4, 1221-1226

[Bouhekkka2012]

BOUHEKKA, A. & BÜRGI, T., In situ ATR-IR spectroscopy study of adsorbed protein: Visible light denaturation of bovine serum albumin on TiO₂, *Applied Surface Science*, vol. 261, 2012, 369-374

[Braun1994]

BRAUN, E. J. & HOWARD, R. J., Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces, *Protoplasma*, vol. 181, 1994, Nr. 1, 202-212

[Brown1992]

BROWN, S., Brown, S., Engineering iron oxide-adhesion mutants of Escherichia coli phage receptor. Proc. Natl Acad. Sci. USA 89, 8651-8655, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, 1992, 8651-8655

[Buck1999]

BUCK, J. W. & ANDREWS, J. H., Localized, positive charge mediates adhesion of rhodosporidium toruloides to barley leaves and polystyrene., *Applied and environmental microbiology*, vol. 65, 1999, 2179-2183

[Buerling2012]

BÜRLING, K., HUNSCHE, M. & NOGA, G., Pre symptomatic detection of wheat leaf rust in the susceptible cv Skalmeje and the resistant cv Esket by means of UV laser-induced fluorescence, *Communications in agricultural and applied biological sciences*, vol. 75, 2012, 27-34

[CamardoLeggieri2020]

CAMARDO LEGGIERI, M., MAZZONI, M., FODIL, S., MOSCHINI, M., BERTUZZI, T., PRANDINI, A. & BATTILANI, P., An electronic nose supported by an artificial neural network for the rapid detection of aflatoxin B1 and fumonisins in maize, *Food Control*, vol. 123, 2020, 107722

[Cernosek2017]

CERNOSEK, Z., CERNOSKOVA, E., HEJDOVA, M., HOLUBOVA, J. & TODOROV, R., The properties and structure of Ge-Se-Te glasses and thin films, *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 460, 2017, 169-177

[Claes2009]

CLAES, T., GIRONÈS, J., VOS, K., SCHACHT, E., BAETS, R. & BIENSTMAN, P., Label-Free Biosensing With a

Slot-Waveguide-Based Ring Resonator in Silicon on Insulator, *Photonics Journal, IEEE*, vol. 1, 2009, 197-204

[ClaverieMartin1986]

CLAVERIE-MARTIN, F., DIAZ-TORRES, M. R. & GEOGHEGAN, M. J., Chemical composition and electron microscopy of the rodlet layer of *Aspergillus nidulans* conidia, *Current Microbiology*, vol. 14, 1986, Nr. 4, 221-225

[Clement1993]

CLEMENT, J. A., MARTIN, S. G., PORTER, R., BUTT, T. M. & BECKETT, A., Germination and the role of extracellular matrix in adhesion of urediniospores of *Uromyces viciae-fabae* to synthetic surfaces, *Mycological Research*, vol. 97, 1993, Nr. 5, 585-593

[Consani2018]

CONSANI, C., RANACHER, C., TORTSCHANOFF, A., GRILLE, T., IRSIGLER, P. & JAKOBY, B., Mid-infrared photonic gas sensing using a silicon waveguide and an integrated emitter, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 274, 2018, 60-65

[Corni2015]

CORNI, S., Affinity and Selectivity of Peptides for Inorganic Materials: A Thermodynamic Discussion of the Role of Conformational Flexibility, *JOM*, vol. 67, 2015, 781-787

[Corres2007]

CORRES, J. M., ARREGUI, F. J. & MATÍAS, I. R., Sensitivity optimization of tapered optical fiber humidity sensors by means of tuning the thickness of nanostructured sensitive coatings, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 122, 2007, Nr. 2, 442-449

[Crawford2006]

CRAWFORD, L. J. & EDMONDS, N. R., Calculation of film thickness for dip coated antireflective films, *Thin Solid Films*, vol. 515, 2006, Nr. 3, 907-910

[Curcio1951]

CURCIO, J. A. & PETTY, C. C., The Near Infrared Absorption Spectrum of Liquid Water, *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 41, 1951, Nr. 5, 302-304

[Dancojocari2010]

DANCOJOCARI, Amino Acids, 2010
https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_amin%C3%A9#/media/Fichier:Amino_Acids.svg

[Dean2012]

DEAN, R., KAN, J., PRETORIUS, Z., HAMMOND-KOSACK, K., PIETRO, A., SPANU, P., RUDD, J., DICKMAN, M., KAHMANN, R., ELLIS, J. & FOSTER, G., The Top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology, *Molecular plant pathology*, vol. 13, 2012, 414-430

[Debourgogne2013]

A. DEBOURGOGNE: Typage moléculaire du complexe d'espèces *Fusarium solani* et détermination de son mécanisme de résistance au voriconazole, Bericht, Université de Lorraine, Thèse, Université de Lorraine, Nr. 2013LORR0021, 2013

[Delalieux2007]

DELALIEUX, S., VAN AARDT, J., KEULEMANS, W., SCHREVEENS, E. & COPPIN, P., Detection of biotic stress (*Venturia inaequalis*) in apple trees using hyperspectral data: Non-parametric statistical

approaches and physiological implications, *European Journal of Agronomy*, vol. 27, 2007, Nr. 1, 130-143

[Devouge2009]

DEVOUGE, S., CONTI, J., GOLDSZTEIN, A., GOSSELIN, E., BRANS, A., VOUÉ, M., CONINCK, J. D., HOMBLÉ, F., GOORMAGHTIGH, E. & MARCHAND-BRYNAERT, J., Surface functionalization of germanium ATR devices for use in FTIR-biosensors, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 332, 2009, Nr. 2, 408-415

[Dixit2014]

DIXIT, V., CHO, B. K., OBENDORF, K. & TEWARI, J., Identifications of household's spores using mid infrared spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 123, 2014, 490-496

[Doss1993]

DOSS, R. P., POTTER, S. W., CHASTAGNER, G. A. & CHRISTIAN, J. K., Adhesion of Nongerminated *Botrytis cinerea* Conidia to Several Substrata, *Applied and environmental microbiology*, vol. 59, 1993, Nr. 16348954, 1786-1791

[Doss1995]

DOSS, R. P., POTTER, S. W., SOELDNER, A. H., CHRISTIAN, J. & FUKUNAGA, L. E., Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*, *Applied and environmental microbiology*, vol. 61, 1995, Nr. 1, 260-265

[Doss1999]

DOSS, R., Composition and Enzymatic Activity of the Extracellular Matrix Secreted by Germlings of *Botrytis cinerea*, *Applied and environmental microbiology*, vol. 65, 1999, 404-408

[Du2018]

DU, Q., LUO, Z., ZHONG, H., ZHANG, Y., HUANG, Y., DU, T., ZHANG, W., GU, T. & HU, J., Chip-scale broadband spectroscopic chemical sensing using an integrated supercontinuum source in a chalcogenide glass waveguide, *Photon. Res.*, vol. 6, 2018, Nr. 6, 506-510

[Echalier2016]

ECHALIER, C., PINESE, C., GARRIC, X., VAN DEN BERGHE, H., JUMAS BILAK, E., MARTINEZ, J., MEHDI, A. & SUBRA, G., Easy Synthesis of Tunable Hybrid Bioactive Hydrogels, *Chem. Mater*, vol. 28, 2016, Nr. 5, 1261-1265

[Epstein2016]

L. EPSTEIN AND R. NICHOLSON: Adhesion and Adhesives of Fungi and Oomycetes, SPRINGER (Hrsg.): *Springer International*, 2016, 25-55

[Ergin2013]

ERGIN, Ç., İLKIT, M., GÖK, Y., ÖZEL, M. Z., ÇON, A. H., KABAY, N., SÖYLEYİCİ, S. & DÖĞEN, A., Fourier transform infrared spectral evaluation for the differentiation of clinically relevant *Trichophyton* species, *Journal of Microbiological Methods*, vol. 93, 2013, Nr. 3, 218-223

[Erukhimovitch2010]

ERUKHIMOVITCH, V., TSROR, L., HAZANOVSKY, M., TALYSHINSKY, M., MUKMANOV, I., SOUPRUN, Y. & HULEIHEL, M., Identification of fungal phyto-pathogens by Fouriertransform infrared (FTIR) microscopy, *Spectroscopy*, vol. 24, 2010

[Estephan2008]

ESTEPHAN, E., LARROQUE, C., CUISINIER, F. J. G., BALINT, Z. & GERGELY, C., Tailoring GaN

semiconductor surfaces with biomolecules, *The journal of physical chemistry B*, vol. 112, 2008, 8799-8805

[Estephan2009]

ESTEPHAN, E., LARROQUE, C., BEC, N., MARTINEAU, P., CUISINIER, F. J. G., CLOITRE, T. & GERGELY, C., Selection and mass spectrometry characterization of peptides targeting semiconductor surfaces, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 104, 2009, Nr. 6, 1121-1131

[Estephan2011b]

ESTEPHAN, E., SAAB, M.-B., MARTIN, M., LARROQUE, C., CUISINIER, F., BRIOT, O., RUFFENACH, S., MORET, M. & GERGELY, C., Phages recognizing the Indium Nitride semiconductor surface via their peptides, *Advanced Funtional Materials*, vol. 17, 2011, 143-147

[Estephan2012]

ESTEPHAN, E., DAO, J., SAAB, M.-B., PANAYOTOV, I., MARTIN, M., LARROQUE, C., GERGELY, C., CUISINIER, F. & LEVALLOIS, B., SVSVGMPKSPRP: a broad range adhesion peptide, *Biomedizinische Technik. Biomedical engineering*, vol. 57, 2012, 1-9

[Falasconi2005]

FALASCONI, M., GOBBI, E., PARDO, M., TORRE, M. D., BRESCIANI, A. & SBERVEGLIERI, G., Detection of toxigenic strains of *Fusarium verticillioides* in corn by electronic olfactory system, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 108, 2005, Nr. 1, 250-257

[Farber2019]

FARBER, C., MAHNKE, M., SANCHEZ, L. & KUROUSKI, D., Advanced spectroscopic techniques for plant disease diagnostics - A review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 118, 2019, 43-49

[Farsund2012]

FARSUND, O., RUSTAD, G. & SKOGAN, G., Standoff detection of biological agents using laser induced fluorescence—a comparison of 294 nm and 355 nm excitation wavelengths, *Biomedical optics express*, vol. 3, 2012, 2964-2975

[Filho2019]

FILHO, O. O. C., MORAIS, F. V., BHATTACHARJEE, T., CASTILHO, M. L. & RANIERO, L., Rapid identification of *Paracoccidioides lutzii* and *P. Brasiliensis* using Fourier Transform Infrared spectroscopy, *Journal of Molecular Structure*, vol. 1177, 2019, 152-159

[Fischer2006]

FISCHER, G., BRAUN, S., THISSEN, R. & DOTT, W., FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi, *Journal of Microbiological Methods*, vol. 64, 2006, Nr. 1, 63-77

[Frascella2013]

F. FRASCELLA AND C. RICCIARDI: Functionalization Protocols of Silicon Micro/Nano-mechanical Biosensors, P. BERGESE AND K. HAMAD-SCHIFFERLI (Hrsg.), Totowa, NJ: *Humana Press, Nanomaterial Interfaces in Biology: Methods and Protocols*, 2013, 109-115

[Fuchs2009]

FUCHS, P., Low-pressure plasma cleaning of Au and PtIr noble metal surfaces, *Applied Surface Science*, vol. 256, 2009, Nr. 5, 1382-1390

[Gaikwad2019]

GAIKWAD, A., JOSHI, M., PATIL, K., SATHAYE, S. & RODE, C., Fluorescent Carbon-Dots Thin Film for

Fungal Detection and Bio-labeling Applications, *ACS Appl. Bio Mater*, vol. 2, 2019, Nr. 12, 5829-5840

[Ganjoo2008]

GANJOO, A., JAIN, H., YU, C., IRUDAYARAJ, J. & PANTANO, C. G., Detection and fingerprinting of pathogens: Mid-IR biosensor using amorphous chalcogenide films, *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 354, 2008, Nr. 19, 2757-2762

[Garon2010]

GARON, D., EL KADDOUMI, A., CARAYON, A. & AMIEL, C., FT-IR Spectroscopy for Rapid Differentiation of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* and Characterization of Aflatoxigenic Isolates Collected from Agricultural Environments, *Mycopathologia*, vol. 170, 2010, Nr. 2, 131-142

[Gerin1995]

GERIN, P., BELLON-FONTAINE, M. N., ASTHER, M. & ROUXHET, P. G., Immobilization of fungal spores by adhesion, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 47, 1995, Nr. 6, 677-687

[Ghaffari2011]

R. GHAFFARI; F. ZHANG; D. ILIESCU; E. HINES; M. LEESON AND R. NAPIER: The Analysis of Plant's Organic Volatiles Compounds with Electronic Nose and Pattern Recognition Techniques, *Applied Signal and Image Processing: Multidisciplinary Advancements*, R. QAHWAJI (Hrsg.), Hershey, PA, USA: IGI Global., 2011, 115-126

[Gindro1997]

GINDRO, K. & PEZET, R., Evidence for a constitutive cytoplasmic cutinase in ungerminated conidia of *Botrytis cinerea* Pers., Fr., *FEMS Microbiology Letters* 149, 1997, Nr. 1, 89-92

[GmbH2013]

M. GMBH: Aluminium Etching, Bericht, MicroChemicals, Dissertation (Application notes), MicroChemicals, 2013

[Golan2017]

GOLAN, J. J. & PRINGLE, A., Long-Distance Dispersal of Fungi, *Microbiology Spectrum*, vol. 5, 2017, Nr. 4

[Gomes1995]

GOMES, M. C., FERNANDES, A. C., ALMEIDA, B. S. & ALMEIDA, R. M., Influence of the wettability of silicon substrates on the thickness of sol-gel silica films, *Journal of materials science*, vol. 30, 1995, Nr. 15, 3893-3896

[Gonzalez1997]

GONZÁLEZ, M., BAGATOLLI, L., ECHABE, I., L. R. ARRONDO, J., ARGARAÑA, C., CANTOR, C. & FIDELIO, G., Interaction of Biotin with Streptavidin, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, 1997, 11288-11294

[Gould1985]

GOULD, E. A., BUCKLEY, A. & CAMMACK, N., Use of the biotin streptavidin interaction to improve flavivirus detection by immunofluorescence and elisa tests, *Journal Of Virological Methods*, vol. 11, 1985, Nr. 1, 41-48

[Graham1864]

GRAHAM, T., On the properties of silicic acid and other analogous colloidal substances, *Proceedings of the Royal Society of London*, vol. 13, 1864, 335-341

[Groth]

D. GROTH, Blast lesions on leaves, Louisiana State University AgCenter, Bugwood.org <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/pmdg/20167800288>

[Haas2018]

HAAS, J., CATALÁN, E., PIRON, P., NIKOLAJEFF, F., OSTERLUND, L., KARLSSON, M. & MIZAIKOFF, B., Polycrystalline Diamond Thin-Film Waveguides for Mid-Infrared Evanescent Field Sensors, *ACS Omega*, vol. 3, 2018, 6190-6198

[Hamer1988]

HAMER, J. E., HOWARD, R. J., CHUMLEY, F. G. & VALENT, B., A Mechanism for Surface Attachment in Spores of a Plant Pathogenic Fungus, *Science*, vol. 239, 1988, Nr. 4837, 288-290

[Han2016]

HAN, Z., LIN, P., SINGH, V., KIMERLING, L., HU, J., RICHARDSON, K., AGARWAL, A. & TAN, D. T. H., On-chip mid-infrared gas detection using chalcogenide glass waveguide, *Applied Physics Letters*, vol. 108, 2016, Nr. 14, 141106

[Hansen2005]

HANSEN, K. M. & THUNDAT, T., Microcantilever biosensors, *Methods*, vol. 37, 2005, Nr. 1, 57-64

[Hausling1991]

HAUSSLING, L., KNOLL, W., RINGSDORF, H., SCHMITT, F. J. & YANG, J., Surface functionalization and surface recognition: Plasmon optical detection of molecular recognition at self-assembled monolayers, *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, vol. 46, 1991, 145-155

[Hjezi2015]

Z. HJEZI: Biocéramiques phosphocalciques fonctionnalisées : étude de la silanisation de surface, Bericht, Université de Limoges, Thèse, Université de Limoges, Nr. 2015LIMO0117, 2015

[Hnilova2008]

HNILOVA, M., OREN, E. E., SEKER, U. O. S., WILSON, B. R., COLLINO, S., EVANS, J., TAMERLER, C. & SARIKAYA, M., Effect of molecular conformations on the adsorption behavior of gold-binding peptides, *Langmuir*, vol. 24, 2008, Nr. 21, 12440-12445

[Holder2005]

HOLDER, D. J. & KEYHANI, N. O., Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata., *Applied and environmental microbiology*, vol. 71, 2005, 5260-5266

[Hollinger1974]

HOLLINGER, G., KUMURDJIAN, P., MACKOWSKI, J., PERTOSA, P., PORTE, L. & DUC, T., ESCA study of molecular $\text{GeS}_{3-x}\text{Te}_x\text{As}_2$ glasses, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, vol. 5, 1974, 237-245

[Holopainen2010]

HOLOPAINEN, J. K. & GERSHENZON, J., Multiple stress factors and the emission of plant VOCs, *Trends in Plant Science*, vol. 15, 2010, Nr. 3, 176-184

[Howard1993]

R. J. HOWARD; J. A. SWEIGARD; W. D. HITZ; F. G. CHUMLEY AND B. S. VALENT: Purified fungal spore tip mucilage, Nr. 5264569, 1993

[Hu2007]

HU, J., TARASOV, V., CARLIE, N., FENG, N.-N., PETIT, L., AGARWAL, A., RICHARDSON, K. & KIMERLING, L., Si-CMOS-compatible lift-off fabrication of low-loss planar chalcogenide waveguides, *Opt. Express*, vol. 15, 2007, Nr. 19, 11798-11807

[Huang2003]

HUANG, J., CARDOZA, Y. J., SCHMELZ, E. A., RAINA, R., ENGELBERTH, J. & TUMLINSON, J. H., Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*, *Planta*, vol. 217, 2003, Nr. 5, 767-775

[Ingle2016]

INGLE, P., CHRISTIAN, R., PUROHIT, P., ZARRAGA, V., HANDLEY, E., FREEL, K. & ABDO, S., Determination of Protein Content by NIR Spectroscopy in Protein Powder Mix Products, *Journal of AOAC International*, vol. 99, 2016, 360-363

[Ingo2001]

INGO, G., RICCUCCI, C., BULTRINI, G., DIRÈ, S. & CHIOZZINI, G., Thermal and Microchemical Characterisation of Sol-Gel SiO₂, TiO₂ and xSiO₂-(1-x) TiO₂ Ceramic Materials, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 66, 2001, 37-46

[JacquesJoseph1846]

E. JACQUES-JOSEPH: Recherches sur les combinaisons des acides borique et silicique avec les éthers, Paris: [s.n.], 1846

[Jansen2009]

JANSEN, R. M. C., MIEBACH, M., KLEIST, E., VAN HENTEN, E. J. & WILDT, J., Release of lipoxygenase products and monoterpenes by tomato plants as an indicator of *Botrytis cinerea*-induced stress, *Plant biology*, vol. 11, 2009, 859-868

[Jansen2010]

R. M. C. JANSEN; J. WILDT; J. W. HOFSTEE; H. J. BOUWMEESTER AND E. J. VAN HENTEN: Plant Volatiles: Useful Signals to Monitor Crop Health Status in Greenhouses, F. BALUKA AND V. NINKOVIC (Hrsg.), Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, *Plant Communication from an Ecological Perspective*, 2010, 229-247

[Jansen2011]

JANSEN, R. M. C., WILDT, J., KAPPERS, I. F., BOUWMEESTER, H. J., HOFSTEE, J. W. & VAN HENTEN, E. J., Detection of Diseased Plants by Analysis of Volatile Organic Compound Emission, *Annual Review of Phytopathology*, vol. 49, 2011, Nr. 1, 157-174

[Jeyachandran2010]

JEYACHANDRAN, Y. L., MIELCZARSKI, J. A., MIELCZARSKI, E. & RAI, B., Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 341, 2010, Nr. 1, 136-142

[Jiang2008]

JIANG, X., ZUBER, A., HEBERLE, J. & ATAKA, K., In situ monitoring of the orientated assembly of strep-tagged membrane proteins on the gold surface by surface enhanced infrared absorption spectroscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 10, 2008, 6381-6387

[Joyard2017]

JOYARD, J., Entre protection et défense : la cuticule des plantes, *Encyclopédie de l'environnement*, 2017

[Kast1994]

KAST, W. K., First results with a spore trap for collecting infectious sporangia of downy mildew, *Journal of Grapevine Research*, vol. 33, 1994, Nr. 4, 253-254

[Kauer2009]

J. KAUER AND J. WHITE: Electronic Nose, L. R. SQUIRE (Hrsg.), Oxford: *Academic Press, Encyclopedia of Neuroscience*, 2009, 871-877

[Khaled2018]

KHALED, A. Y., AZIZ, S. A., BEJO, S. K., NAWI, N. M., SEMAN, I. A. & ONWUDE, D. I., Early detection of diseases in plant tissue using spectroscopy – applications and limitations, *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 53, 2018, Nr. 1, 36-64

[Kribich2012]

R. K. KRIBICH: Refractometric Photonic Chips for Biosensing, W. FRITZSCHE AND J. POPP (Hrsg.), Berlin, Heidelberg: *Springer Berlin Heidelberg, Optical Nano- and Microsystems for Bioanalytics*, 2012, 155-180

[Krueger2018]

KRÜGER, A., BÜRKLE, A., MANGERICH, A. & HAUSER, K., A combined approach of surface passivation and specific immobilization to study biomolecules by ATR-FTIR spectroscopy, *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, vol. 7, 2018, 1-9

[Kulkarni1998]

KULKARNI, A. G., LELE, S. S. & KULKARNI, P. R., Improved adsorption of *Aspergillus niger* 589 spores on high-density polyethylene for progesterone biotransformation, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 86, 1998, Nr. 5, 510-512

[Laothawornkitkul2008]

LAOTHAWORNKITKUL, J., MOORE, J. P., TAYLOR, J. E., POSSELL, M., GIBSON, T. D., HEWITT, C. N. & PAUL, N. D., Discrimination of Plant Volatile Signatures by an Electronic Nose: A Potential Technology for Plant Pest and Disease Monitoring, *Environmental Science & Technology*, vol. 42, 2008, Nr. 22, 8433-8439

[Lapin2009]

LAPIN, N. A. & CHABAL, Y. J., Infrared Characterization of Biotinylated Silicon Oxide Surfaces, Surface Stability, and Specific Attachment of Streptavidin, *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 113, 2009, Nr. 25, 8776-8783

[Lebeda1994]

LEBEDA, A. & SCHWINN, F. J., The downy mildews – an overview of recent research progress, *Journal of Plant Diseases and Protection*, vol. 101, 1994, Nr. 3, 225-254

[Lecellier2013]

A. LECELLIER: Détection, caractérisation et identification des moisissures par spectroscopie vibrationnelle infrarouge et Raman, Bericht, Université de Reims champagne Ardenne, Thèse, Université de Reims champagne Ardenne, 2013

[Lee2001]

LEE, K. K., LIM, D. R., KIMERLING, L. C., SHIN, J. & CERRINA, F., Fabrication of ultralow-loss Si/SiO₂ waveguides by roughness reduction, *Opt. Lett.*, vol. 26, 2001, Nr. 23, 1888-1890

[Lei2016]

LEI, S., WANG, X., LI, B., KANG, J., HE, Y., GEORGE, A., GE, L., GONG, Y., DONG, P., JIN, Z., BRUNETTO, G., CHEN, W., LIN, Z.-T., BAINES, R., GALVÃO, D. S., LOU, J., BARRERA, E., BANERJEE, K., VAJTAI, R. & AJAYAN, P., Surface functionalization of two-dimensional metal chalcogenides by Lewis acid-base chemistry, *Nature Nanotechnology*, vol. 11, 2016, 465

[Li2014]

LI, X.-L., MA, Z.-H., ZHAO, L.-L., LI, J.-H. & WANG, H., Application of Near Infrared Spectroscopy to Qualitative Identification and Quantitative Determination of *Puccinia striiformis* f. sp. tritici and *P. recondita* f. sp. tritici, *Spectroscopy and Spectral Analysis*, vol. 34, 2014, 643-647

[Li2018]

LI, X., ZHANG, X., LIU, Q., ZHAO, W., LIU, S. & SUI, G., Microfluidic System for Rapid Detection of Airborne Pathogenic Fungal Spores, *ACS Sens.*, vol. 3, 2018, Nr. 10, 2095-2103

[Li2018b]

LI, W., ANANTHA, P., LEE, K. H., QIU, H. D., GUO, X., GOH, S. C. K., ZHANG, L., WANG, H., SOREF, R. A. & TAN, C. S., Spiral Waveguides on Germanium-on-Silicon Nitride Platform for Mid-IR Sensing Applications, *IEEE Photonics Journal*, vol. 10, 2018, Nr. 3, 1-7

[Liaghat2014]

LIAGHAT, S., MANSOR, S., EHSANI, R., SHAFRI, H. Z. M., MEON, S. & SANKARAN, S., Mid-infrared spectroscopy for early detection of basal stem rot disease in oil palm, *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 101, 2014, 48-54

[Liang2013]

LIANG, L., ENGLING, G., CHENG, Y., DUAN, F., DU, Z. & HE, K., Rapid detection and quantification of fungal spores in the urban atmosphere by flow cytometry, *Journal of Aerosol Science*, vol. 66, 2013, 179-186

[Liao2015]

LIAO, W., YU, Z., LIN, Z., LEI, Z., NING, Z., REGENSTEIN, J. M., YANG, J. & REN, J., Biofunctionalization of Selenium Nanoparticle with Dictyophora Indusiata Polysaccharide and Its Antiproliferative Activity through Death-Receptor and Mitochondria-Mediated Apoptotic Pathways, *Scientific Reports*, vol. 5, 2015, 18629

[Lu2013]

LU, R., SHENG, G., LI, W., YU, H., RAICHLIN, Y., KATZIR, A. & MIZAIKOFF, B., IR-ATR Chemical Sensors Based on Planar Silver Halide Waveguides Coated with an Ethylene/Propylene Copolymer for Detection of Multiple Organic Contaminants in Water, *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 52, 2013, Nr. 8, 2265-2268

[Lu2016]

LU, R., LI, W.-W., MIZAIKOFF, B., KATZIR, A., RAICHLIN, Y., SHENG, G.-P. & YU, H.-Q., High-sensitivity infrared attenuated total reflectance sensors for in situ multicomponent detection of volatile organic compounds in water, *Nature Protocols*, vol. 11, 2016, Nr. 2, 377-386

[Luo2007]

Y.-R. LUO: Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies, *Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies*, 2007, 1-1656

[Luzinova2012]

LUZINOVA, Y., ZDYRKO, B., LUZINOV, I. & MIZAIKOFF, B., Detecting trace amounts of water in hydrocarbon matrices with infrared fiberoptic evanescent field sensors, *Analyst*, vol. 137, 2012, 333-341

[Ma2013]

MA, P., CHOI, D.-Y., YU, Y., GAI, X., YANG, Z., DEBBARMA, S., MADDEN, S. & LUTHER-DAVIES, B., Low-loss chalcogenide waveguides for chemical sensing in the mid-infrared, *Opt. Express*, vol. 21, 2013, Nr. 24, 29927-29937

[Mahlein2016]

MAHLEIN, A.-K., Plant Disease Detection by Imaging Sensors - Parallels and Specific Demands for Precision Agriculture and Plant Phenotyping, *Plant Disease*, vol. 100, 2016, Nr. 2, 241-251

[Mai2015]

MAI, T., D'ORLYÉ, F. & VARENNE, A., A Comprehensive Study of Silanization and Co-Condensation for Straightforward Single-Step Covalent Neutral Capillary Coating, *Chromatographia*, vol. 78, 2015, 775-783

[Maity2015]

MAITY, S., ZANUY, D., RAZVAG, Y., DAS, P., ALEMÁN, C. & RECHES, M., Elucidating the mechanism of interaction between peptides and inorganic surfaces, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, 2015, 15305-15315

[Maiyo2017]

MAIYO, F. & SINGH, M., Selenium nanoparticles: Potential in cancer gene and drug delivery, *Nanomedicine*, vol. 12, 2017, 1075-1089

[Maoz1984]

MAOZ, R. & SAGIV, J., On the formation and structure of self-assembling monolayers. I. A comparative atr-wettability study of Langmuir—Blodgett and adsorbed films on flat substrates and glass microbeads, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 100, 1984, Nr. 2, 465-496

[Mariey2001]

MARIEY, L., SIGNOLLE, J. P., AMIEL, C. & TRAVERT, J., Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics, *Vibrational Spectroscopy*, vol. 26, 2001, Nr. 2, 151-159

[Markom2009]

MARKOM, M. A., SHAKAFF, A. Y. M., ADOM, A. H., AHMAD, M. N., HIDAYAT, W., ABDULLAH, A. H. & FIKRI, N. A., Intelligent electronic nose system for basal stem rot disease detection, *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 66, 2009, Nr. 2, 140-146

[MartinPalma2009]

MARTÍN-PALMA, R. J., DEMIREL, M. C., WANG, H. & PANTANO, C. G., Surface biofunctionalization of nanostructured GeSbSe chalcogenide glass thin films, *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 355, 2009, Nr. 3, 208-212

[Mercure1994]

MERCURE, E. W., LEITE, B. & NICHOLSON, R. L., Adhesion of ungerminated conidia of colletotrichum-graminicola to artificial hydrophobic surfaces, *Physiological and molecular plant pathology*, vol. 45, 1994, Nr. 6, 421-440

[Mewes2011]

MEWES, T., FRANKE, J. & MENZ, G., Spectral requirements on airborne hyperspectral remote sensing data for wheat disease detection, *Precision Agriculture*, vol. 12, 2011, Nr. 6, 795

[Michel2004]

MICHEL, K., BUREAU, B., BOUSSARD-PLÉDEL, C., JOUAN, T., ADAM, J. L., STAUBMANN, K. & BAUMANN, T., Monitoring of pollutant in waste water by infrared spectroscopy using chalcogenide glass optical fibers, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 101, 2004, Nr. 1, 252-259

[Miliutina2019]

MILIUTINA, E., GUSELNIKOVA, O., CHUFISTOVA, S., KOLSKA, Z., ELASHNIKOV, R., BURTSEV, V., POSTNIKOV, P., SVORCIK, V. & LYUTAKOV, O., Fast and All-Optical Hydrogen Sensor Based on Gold-Coated Optical Fiber Functionalized with Metal-Organic Framework Layer, *ACS Sens.*, vol. 4, 2019, Nr. 12, 3133-3140

[Milosev2012]

MILOSEV, I., JOVANOVIĆ, Z., BAJAT, J. B., JANCIC-HEINEMANN, R. & MISKOVIC-STANKOVIC, V. B., Surface Analysis and Electrochemical Behavior of Aluminum Pretreated by Vinyltriethoxysilane Films in Mild NaCl Solution, *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 159, 2012, Nr. 7, C303-C311

[Mittal2018]

MITTAL, V., NEDELJKOVIC, M., ROWE, D. J., MURUGAN, G. S. & WILKINSON, J. S., Chalcogenide glass waveguides with paper-based fluidics for mid-infrared absorption spectroscopy, *Opt. Lett.*, vol. 43, 2018, Nr. 12, 2913-2916

[MohacekGrosev2001]

MOHAČEK-GROŠEV, V., BOŽAC, R. & PUPPELS, G. J., Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 57, 2001, Nr. 14, 2815-2829

[Mohlenhoff2005]

MOHLENHOFF, B., ROMEO, M., DIEM, M. & WOOD, B. R., Mie-Type Scattering and Non-B Beer-Lambert Absorption Behavior of Human Cells in Infrared Microspectroscopy, *Biophysical Journal*, vol. 88, 2005, Nr. 5, 3635-3640

[Money2016]

N. P. MONEY: Spore Production, Discharge, and Dispersal, S. C. WATKINSON; L. BODDY AND N. P. MONEY, (Hrsg.), Boston: *Academic Press, The Fungi*, 2016, 67-97

[MularczykOliwa2012]

MULARCZYK-OLIWA, M., BOMBALSKA, A., KALISZEWSKI, M., WŁODARSKI, M., KOPCZYŃSKI, K., KWAŚNY, M., SZPAKOWSKA, M. & TRAFNY, E. A., Comparison of fluorescence spectroscopy and FTIR in differentiation of plant pollens, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 97, 2012, 246-254

[Neish2002]

NEISH, C. S., MARTIN, I. L., HENDERSON, R. M. & EDWARDSON, J. M., Direct visualization of ligand-

protein interactions using atomic force microscopy, *British Journal of Pharmacology*, vol. 135, 2002, Nr. 8, 1943-1950

[Nerurkar1984]

NERURKAR, L. S., NAMBA, M., BRASHEARS, G., JACOB, A. J., LEE, J. & SEVER, J. L., Rapid detection of herpes-simplex virus in clinical specimens by use of a capture biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent-assay, *Journal Of Clinical Microbiology*, vol. 20, 1984, Nr. 1, 109-114

[Ness2013]

NESS, S., ANDERSON, R., HU, W., RICHARDS, D., OXBORROW, J., GUSTAFSON, T., TSAI, B., KIM, S., WOOLLEY, A. & NORDIN, G., Weak Adsorption-Induced Surface Stress for Streptavidin Binding to Biotin Tethered to Silicon Microcantilever Arrays, *Sensors Journal, IEEE*, vol. 13, 2013, 959-968

[Nie2007]

NIE, M., LUO, J., XIAO, M., CHEN, J., BAO, K., ZHANG, W., CHEN, J. & LI, B., Structural differences between Fusarium strains investigated by FT-IR spectroscopy, *Biochemistry (Moscow)*, vol. 72, 2007, Nr. 1, 61-67

[Nugaeva2007]

NUGAEVA, N., GFELLER, K., BACKMANN, N., DUEGGELIN, M., LANG, H., GÜNTHERODT, H.-J. & HEGNER, M., An Antibody-Sensitized Microfabricated Cantilever for the Growth Detection of *Aspergillus niger* Spores, *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, vol. 13, 2007, 13-7

[Oberlaender2018]

OBERLÄNDER, J., MAYER, M., GREEFF, A., KEUSGEN, M. & SCHÖNING, M. J., Spore-based biosensor to monitor the microbicidal efficacy of gaseous hydrogen peroxide sterilization processes, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 104, 2018, 87-94

[Oberle2015]

OBERLE, J., DIGHTON, J. & ARBUCKLE-KEIL, G., Comparison of methodologies for separation of fungal isolates using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and Fourier transform infrared-attenuated total reflectance (FTIR-ATR) microspectroscopy, *Fungal Biology*, vol. 119, 2015, Nr. 11, 1100-1114

[Oh2007]

OH, H.-J., LEE, J.-H., AHN, H.-J., JEONG, Y., PARK, N.-J., KIM, S.-S. & CHI, C.-S., Etching characteristics of high-purity aluminum in hydrochloric acid solutions, *Materials Science and Engineering: A*, vol. 449-451, 2007, 348-351

[Osborne2006]

B. G. OSBORNE: Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis: *American Cancer Society, Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2006

[Padvi2018]

PADVI, S. A., KHAIRE, P., BHAGAT, V. H. & HINGOLE, D. G., Studies on Cultural, Morphological Variability in Isolates *Fusarium solani*, Incitant of Dry Root-rot of Sweet Orange, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 7, 2018, 3671-3676

[Papa2016]

PÁPA, Z., RAMAKRISHNAN, S. K., MARTIN, M., CLOITRE, T., ZIMÁNYI, L., MÁRQUEZ, J., BUDAI, J., TÓTH, Z. & GERGELY, C., Interactions at the Peptide/Silicon Surfaces: Evidence of Peptide Multilayer Assembly, *Langmuir*, vol. 32, 2016, Nr. 28, 7250-7258

- [Pezet1990]
PEZET, R. & PONT, V., Ultrastructural Observations of Pterostilbene Fungitoxicity in Dormant Conidia of *Botrytis cinerea* Pers., *Journal of Phytopathology*, vol. 129, 1990, Nr. 1, 19-30
- [Piazza2005]
R. PIAZZA AND V. DEGIORGIO: Scattering, Rayleigh, F. BASSANI; G. L. LIEDL AND P. WYDER (Hrsg.), Oxford: *Elsevier, Encyclopedia of Condensed Matter Physics*, 2005, 234-242
- [Puglisi1984]
PUGLISI, O., TORRISI, A. & MARLETTA, G., XPS investigation of the effects induced by the silanization on real glass surfaces, *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 68, 1984, Nr. 2, 219-230
- [Purcar2014]
PURCAR, V., CINTEZA, O., GHIUREA, M., BALAN, A., CAPRARESCU, S. & DONESCU, D. A. N., Influence of hydrophobic characteristic of organo-modified precursor on wettability of silica film, *Bulletin of Material science*, vol. 37, 2014, 107-115
- [Raichlin2008]
RAICHLIN, Y. & KATZIR, A., Fiber-Optic Evanescent Wave Spectroscopy in the Middle Infrared, *Applied spectroscopy*, vol. 62, 2008, 55A-72A
- [Ramakrishnan2014]
RAMAKRISHNAN, S. K., MARTIN, M., CLOITRE, T., FIRLEJ, L. & GERGELY, C., Molecular Mechanism of Selective Binding of Peptides to Silicon Surface, *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 54, 2014, Nr. 7, 2117-2126
- [Ramakrishnan2015]
RAMAKRISHNAN, S. K., JEBORS, S., MARTIN, M., CLOITRE, T., AGARWAL, V., MEHDI, A., MARTINEZ, J., SUBRA, G. & GERGELY, C., Engineered Adhesion Peptides for Improved Silicon Adsorption, *Langmuir*, vol. 31, 2015, Nr. 43, 11868-11874
- [Ray2017]
RAY, M., RAY, A., DASH, S., MISHRA, A., ACHARY, K. G., NAYAK, S. & SINGH, S., Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 87, 2017, 708-723
- [Riepl2002]
RIEPL, M., ENANDER, K., LIEBERG, B., SCHAFERLING, M., KRUSCHINA, M. & ORTIGAO, F., Functionalized surfaces of mixed alkanethiols on gold as a platform for oligonucleotide microarrays, *Langmuir*, vol. 18, 2002, Nr. 18, 7016-7023
- [Rios2009]
RIOS, F. & SMIRNOV, S., Biochemically Responsive Smart Surface, *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 1, 2009, Nr. 4, 768-774
- [Ritz2011]
RITZ, M., VACULÍKOVÁ, L. & PLEVOVÁ, E., Application of infrared spectroscopy and chemometric methods to identification of selected minerals, *Acta Geodynamica et Geomaterialia*, vol. 8, 2011
- [Roach2005]
ROACH, P., FARRAR, D. & PERRY, C. C., Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced

- Conformational Changes, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, 2005, Nr. 22, 8168-8173
- [Romanazzi2014]
G. ROMANAZZI AND E. FELIZIANI: Chapter 4 - Botrytis cinerea (Gray Mold), BAUTISTA-BANOS (Hrsg.), San Diego: *Academic Press, Postharvest Decay*, 2014, 131-146
- [Romeo2006]
ROMEIO, M., MOHLENHOFF, B. & DIEM, M., Infrared micro-spectroscopy of human cells: Causes for the spectral variance of oral mucosa (buccal) cells, *Vibrational Spectroscopy*, vol. 42, 2006, Nr. 1, 9-14
- [Rosic2016]
ROSIĆ, J. Š., MUNČAN, J., MILEUSNIĆ, I., KOSIĆ, B. & MATIJA, L., Detection of protein deposits using NIR spectroscopy, *Soft Materials*, vol. 14, 2016, Nr. 4, 264-271
- [Saab2010]
SAAB, M.-B., ESTEPHAN, E., CLOITRE, T., LARROQUE, C. & GERGELY, C., Peptide Route Functionalization of ZnSe Crystals Preserves Activity and Structure of Proteins while Adsorption, *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 114, 2010, Nr. 43, 18509-18515
- [Sammonds2015]
SAMMONDS, J., JONES, E. & JASPERS, M., Pre-infection processes of Botryosphaeriaceae spp., adhesion of conidia to different substrata, *Plant Pathology*, vol. 65, 2015, Nr. 7, 1142-1152
- [Sarrach1976]
SARRACH, D. J., NEUFVILLE, J. P. D. & HAWORTH, W. L., Studies of amorphous Ge-Se-Te alloys (I): Preparation and calorimetric observations, *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 22, 1976, Nr. 2, 245-267
- [Schaedle2016]
SCHÄDLE, T. & MIZAIKOFF, B., Mid-Infrared Waveguides: A Perspective, *Applied Spectroscopy*, vol. 70, 2016, 1625-1638
- [Schnee2013]
SCHNEE, S., ROUGEUX, E., PEZET, R., VIRET, O. & GINDRO, K., Evidence for a Constitutive Cutinase in Ungerminated Conidia of *Erysiphe necator* Schwein, *Journal of Cytology & Histology*, vol. 4, 2013, Nr. 5, 1-6
- [Schnitzler2020]
O. SCHNITZLER: *Qu'est-ce qu'une "particule fine" ?*, 2020, Quora, <https://fr.quora.com/Quest-ce-qu'une-particule-fine>
- [Schumacher2008]
SCHUMACHER, C. F. A., STEINER, U., DEHNE, H.-W. & OERKE, E.-C., Localized Adhesion of Nongerminated *Venturia inaequalis* Conidia to Leaves and Artificial Surfaces, *Phytopathology*, vol. 98, 2008, 760-768
- [Shalvoy1977]
SHALVOY, R. & FISHER, G., Bond ionicity and structural stability of some average-valence-five materials studied by X-ray photoemission, *Phys. Rev. B*, vol. 15, 1977, 1680-1697

- [Shard2020]
SHARD, A. G., Practical guides for x-ray photoelectron spectroscopy: Quantitative XPS, *Journal of Vacuum Science & Technology A*, vol. 38, 2020, Nr. 4, 041201
- [Shulaev1997]
SHULAEV, V., SILVERMAN, P. & RASKIN, I., Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance, *Nature*, vol. 385, 1997, Nr. 6618, 718-721
- [Sieger2012]
SIEGER, M., BALLUFF, F., WANG, X., KIM, S.-S., LEIDNER, L., GAUGLITZ, G. & MIZAIKOFF, B., On-Chip Integrated Mid-Infrared GaAs/AlGaAs Mach-Zehnder Interferometer, *Analytical chemistry*, vol. 85, 2012, Nr. 6, 3050-3052
- [Sigel2009]
SIGEL, R., Light scattering near and from interfaces using evanescent wave and ellipsometric light scattering, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14, 2009, Nr. 6, 426-437
- [Singh2000]
B. R. SINGH: Basic Aspects of the Technique and Applications of Infrared Spectroscopy of Peptides and Proteins, A. C. SOCIETY (Hrsg.) 750 : *Infrared Analysis of Peptides and Proteins.*, 2000, 2-37
- [Smith2015]
SMITH, C. J., SHANKAR, R., LADERER, M., FRISH, M. B., LONCAR, M. & ALLEN, M. G., Sensing nitrous oxide with QCL-coupled silicon-on-sapphire ring resonators, *Opt. Express*, vol. 23, 2015, Nr. 5, 5491-5499
- [Su2019b]
SU, P., HAN, Z., KITA, D., BECLA, P., LIN, H., DECKOFF-JONES, S., RICHARDSON, K., KIMERLING, L. C., HU, J. & AGARWAL, A., Monolithic on-chip mid-IR methane gas sensor with waveguide-integrated detector, *Applied Physics Letters*, vol. 114, 2019, Nr. 5, 051103
- [Subbiah2017]
SUBBIAH, S., SEETHAPATHY, P., SEVUGAPPERUMAL, N. & THIRUVENGADAM, R., Detection of finger millet blast pathogen *Magnaporthe grisea* using FTIR spectroscopy, *Chemical Science Review and Letters*, vol. 6, 2017, 956-960
- [Swanepoel1983]
SWANEPOEL, R., Determination of the thickness and optical constants of amorphous silicon, *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, vol. 16, 1983, Nr. 12, 1214-1222
- [Taborelli1995]
TABORELLI, L. ENG P. DESCOUTS, J. P. R. R. B. & AEBISCHER, P., Bovine serum albumin conformation on methyl and amine functionalized surfaces compared by scanning force microscopy, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 29, 1995, Nr. 6, 707-714
- [Taga1990]
TAGA, K., WEIGEL, C. & KELLNER, R., In-situ Fourier-Transform infrared-analysis of modified chalcogenide infrared-transparent fiber surfaces, *Vibrational Spectroscopy*, vol. 1, 1990, Nr. 2, 125-133
- [Taga1993]
TAGA, K., SCHWARZBAHC, D., STINGEDER, G., GRASSERBAUER, M. & KELLNER, R., Surface-analysis and

characterization of chemically-modified chalcogenide fibers, *Analytical Chemistry*, vol. 65, 1993, Nr. 07, 2288-2293

[Taga1994]

TAGA, K., KELLNER, R., KAINZ, U. & SLEYTR, U.-B., In-situ attenuated total reflectance FT-IR analysis of an enzyme-modified mid-infrared fiber surface using crystalline bacterial surface-proteins, *Analytical chemistry*, vol. 66, 1994, Nr. 1, 35-39

[Tahir2017]

TAHIR, M. W., ZAIDI, N. A., BLANK, R., VINAYAKA, P. P., VELLEKOOP, M. J. & LANG, W., Fungus Detection Through Optical Sensor System Using Two Different Kinds of Feature Vectors for the Classification, *IEEE Sensors Journal*, vol. 17, 2017, Nr. 16, 5341-5349

[TalebBendiab2018]

TALEB BENDIAB, A., BATHILY, M., VIGREUX, C., ESCALIER, R., PRADEL, A., KRIBICH, R. & BENDOULA, R., Chalcogenide rib waveguides for the characterization of spray deposits, *Optical Materials*, vol. 86, 2018, 298-303

[TalebBendiab2020]

A. TALEB BENDIAB: Micro-capteur optique pour la caractérisation des dépôts de pulvérisation en agriculture, Bericht, École doctorale GAIA, Thèse, École doctorale GAIA, 2020

[Taylor2007]

TAYLOR, M., URQUHART, A. J., ZELZER, M., DAVIES, M. C. & ALEXANDER, M. R., Picoliter Water Contact Angle Measurement on Polymers, *Langmuir*, vol. 23, 2007, Nr. 13, 6875-6878

[Terhune1993]

TERHUNE, B. T. & HOCH, H. C., Substrate Hydrophobicity and Adhesion of Uromyces Urediospores and Germlings, *Experimental Mycology*, vol. 17, 1993, Nr. 4, 241-252

[Thoegersen2012]

THØGERSEN, A., SELJ, J. & MARSTEIN, E., Oxidation Effects on Graded Porous Silicon Anti-Reflection Coatings, *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 159, 2012, Nr. 5, D276-D281

[Tombez2017]

TOMBEZ, L., ZHANG, E. J., ORCUTT, J. S., KAMLAPURKAR, S. & GREEN, W. M. J., Methane absorption spectroscopy on a silicon photonic chip, *Optica*, vol. 4, 2017, Nr. 11, 1322-1325

[Tralamazza2013]

TRALAMAZZA, S. M., BOZZA, A., DESTRO, J. G. R., RODRÍGUEZ, J. I., DO ROCIO DALZOTO, P. & PIMENTEL, I. C., Potential of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) to Differentiate Environmental Aspergillus Fungi Species *A. niger*, *A. ochraceus*, and *A. westerdijkiae* Using Two Different Methodologies, *Appl. Spectrosc.*, vol. 67, 2013, Nr. 3, 274-278

[Tsai2003]

TSAI, H., HU, E., PERNG, K., CHEN, M., WU, J.-C. & CHANG, Y.-S., Instability of gold oxide Au₂O₃, *Surface Science*, vol. 537, 2003, Nr. 1, L447-L450

[Tuerdi2017]

TUERDI, G., KARI, N., YAN, Y., NIZAMIDIN, P. & YIMIT, A., A Functionalized Tetrakis(4-Nitrophenyl)Porphyrin Film Optical Waveguide Sensor for Detection of H₂S and Ethanediimine Gases, *Sensors*, vol. 17, 2017, Nr. 12, 2717

- [Ueno1983]
UENO, T., Chemical Shifts of Photoelectron and Auger Lines in Ag- or Cu-Doped Amorphous GeSe₂ and As₂Se₃, *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 22, 1983, 1469-1473
- [Vanhauteghem2017]
VANHAUTEGHEM, D., DEMEYERE, K., CALLAERT, N., BOELAERT, A., HAESAERT, G., AUDENAERT, K. & MEYER, E., Flow cytometry, a powerful novel tool to assess viability of fungal conidia in metal working fluids, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 83, 2017, Nr. 16
- [Vigreux2013]
VIGREUX, C., THI, M. V., ESCALIER, R., MAULION, G., KRIBICH, R. & PRADEL, A., Channel waveguides based on thermally co-evaporated Te-Ge-Se films for infrared integrated optics, *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 377, 2013, Nr. 1-5, 205-208
- [Vigreux2014]
VIGREUX, C., THI, M. V., MAULION, G., KRIBICH, R., BARILLOT, M., KIRSCHNER, V. & PRADEL, A., Wide-range transmitting chalcogenide films and development of micro-components for infrared integrated optics applications, *Opt. Mater. Express*, vol. 4, 2014, Nr. 8, 1617-1631
- [Villatoro2005]
VILLATORO, J. & MONZON-HERNANDEZ, D., Fast detection of hydrogen with nano fiber tapers coated with ultra thin palladium layers., *Optics express*, vol. 13, 2005, 5087-5092
- [Villatoro2005b]
VILLATORO, J., LUNA-MORENO, D. & MONZÓN-HERNÁNDEZ, D., Optical fiber hydrogen sensor for concentrations below the lower explosive limit, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 110, 2005, Nr. 1, 23-27
- [Vinod2012]
VINOD, E. M., SINGH, A. K., GANESAN, R. & SANGUNNI, K., Effect of selenium addition on the GeTe phase change memory alloys, *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 537, 2012, 127-132
- [Vishnoi2018]
VISHNOI, P., FATAHI, P., BARUA, M., BANDYOPADHYAY, A., PATI, S. K. & RAO, C. N. R., Covalently Functionalized Nanoparticles of Semiconducting Metal Chalcogenides and Their Attributes, *ChemNanoMat*, vol. 4, 2018, Nr. 1, 41-45
- [VuThi2014]
M. VU THI: Etude des couches minces du système ternaire Ge-Se-Te et fabrication de composants d'optique intégrée IR, briques de base de micro-capteurs optiques de gaz, Bericht, Ecole doctorale chimie balard, Thèse, Ecole doctorale chimie balard, 2014
- [Wang2012]
WANG, X., KIM, S.-S., ROSSBACH, R., JETTER, M., MICHLER, P. & MIZAIKOFF, B., Ultra-sensitive mid-infrared evanescent field sensors combining thin-film strip waveguides with quantum cascade lasers, *The Analyst*, vol. 137, 2012, 2322-2327
- [Weisenhorn1992]
WEISENHORN, A. L., SCHMITT, F.-J., KNOLL, W. & HANSMA, P. K., Streptavidin binding observed with an atomic force microscope, *Ultramicroscopy*, vol. 42-44, 1992, 1125-1132

[Wessels1996]

WESSELS, J. G. H., Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface, *Trends in Plant Science*, vol. 1, 1996, Nr. 1, 9-15

[West2021]

WEST, R. M., Best practice in statistics: Use the Welch t-test when testing the difference between two groups, *Annals of clinical biochemistry*, vol. 58, 2021, Nr. 4, 267-269

[Wildt2003]

WILDT, J., KOBEL, K., SCHUH-THOMAS, G. & HEIDEN, A. C., Emissions of Oxygenated Volatile Organic Compounds from Plants Part II: Emissions of Saturated Aldehydes, *Journal of Atmospheric Chemistry*, vol. 45, 2003, Nr. 2, 173-196

[Williams1989]

WILLIAMS, H. & PEMBROKE, A., Sniffer dogs in the melanoma clinic ?, *The Lancet*, vol. 333, 1989, Nr. 8640, 734

[Wisher2006]

WISHER, A., BRONSTEIN, I. & CHECHIK, V., Thiolated PAMAM dendrimer-coated CdSe/ZnSe nanoparticles as protein transfection agents, *Chemical communications (Cambridge, England)*, vol. 15, 2006, 1637-1639

[Wright2002]

WRIGHT, A. J., THOMAS, B. J. & CARVER, T. L. W., Early adhesion of *Blumeria graminis* to plant and artificial surfaces demonstrated by centrifugation, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 61, 2002, Nr. 4, 217-226

[Xin2018]

XIN, Y., PANDRAUD, G., OTTEN, L., ZHANG, Y. & FRENCH, P., Surface Functionalization of SU-8 Vertical Waveguide for Biomedical Sensing: Bacteria Diagnosis, *Proceedings*, vol. 2, 2018, Nr. 12, 1081

[Xu2007]

M. XU; T. WU AND J. Y. QU: Elastic light scattering by cells: from Mie scattering to fractal scattering, A. WAX AND V. BACKMAN (Hrsg.): *SPIE-int soc optical engineering*, vol. 6446, *Biomedical Applications of Light Scattering*, 2007

[Yamaoka1999]

YAMAOKA, N. & TAKEUCHI, Y., Morphogenesis of the powdery mildew fungus in water (4) The significance of conidium adhesion to the substratum for normal appressorium development in water, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 54, 1999, Nr. 5, 145-154

[Yang2016]

YANG, X., ZHU, L., CHEN, Y., BAO, B., XU, J. & ZHOU, W., Controlled hydrophilic/hydrophobic property of silica films by manipulating the hydrolysis and condensation of tetraethoxysilane, *Applied surface science*, vol. 376, 2016, 1-9

[Yashina2001]

YASHINA, L. V., KOBEEVA, S. P., SHATALOVA, T. B., ZLOMANOV, V. P. & SHTANOV, V. I., XPS study of fresh and oxidized GeTe and (Ge,Sn)Te surface, *Solid State Ionics*, vol. 141-142, 2001, 513-522

[Ye2012]

YE, Z., JIANG, X. & WANG, Z., Measurements of Particle Size Distribution Based on Mie Scattering Theory and Markov Chain Inversion Algorithm, *J. Softw.*, vol. 7, 2012, 2309-2316

[Yildiz2016]

YILDIZ, M., Investigation of Etchants for Etching Conditions of Aluminium, *International Journal of Scientific and Technological Research*, vol. 2, 2016, Nr. 3

[Yu2006]

YU, C., GANJOO, A., JAIN, H., PANTANO, C. G. & IRUDAYARAJ, J., Mid-IR Biosensor: Detection and Fingerprinting of Pathogens on Gold Island Functionalized Chalcogenide Films, *Anal. Chem.*, vol. 78, 2006, Nr. 8, 2500-2506

[YuWan2021]

YU WAN, W., LIU, L., LIU, X., WANG, W., ZAHURUL ISLAM, M., DONG, C., GAREN, C. R., WOODSIDE, M. T., GUPTA, M., MANDAL, M., ROZMUS, W. & YIN TSUI, Y., Integration of light scattering with machine learning for label free cell detection, *Biomedical optics express*, vol. 12, 2021, Nr. 6, 3512-3529

[Zervakis2012]

ZERVAKIS, G. I., BEKIARIS, G., TARANTILIS, P. A. & PAPPAS, C. S., Rapid strain classification and taxa delimitation within the edible mushroom genus *Pleurotus* through the use of diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopy, *Fungal Biology*, vol. 116, 2012, Nr. 6, 715-728

[Zhang2011]

F. ZHANG; R. GHAFARI; D. ILIESCU; E. HINES; M. LEESON AND R. NAPIER: Field asymmetric ion mobility spectrometry based plant disease detection: Intelligent systems approach, *Applied Signal and Image Processing: Multidisciplinary Advancements*, R. QAHWAJI (Hrsg.), IGI Global, 2011, 102-114

[Zhang2011b]

ZHANG, X., YUE, W., YOU, Y. & LUO, S., Silane Treatment Technology on Aluminum Surface, *Advanced Materials Research*, vol. 239-242, 2011, 2687-2693

[Zhang2019]

ZHANG, J., HUANG, Y., PU, R., GONZALEZ-MORENO, P., YUAN, L., WU, K. & HUANG, W., Monitoring plant diseases and pests through remote sensing technology: A review, *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 165, 2019, 104943

[Zhang2020]

ZHANG, Y.-N., SUN, Y., CAI, L., GAO, Y. & CAI, Y., Optical fiber sensors for measurement of heavy metal ion concentration: A review, *Measurement*, vol. 158, 2020, 107742

[Zhao2015]

ZHAO, Y., QIN, F., CHENG, P., LI, X., MA, Z., ZHAO, L., LI, J. & WANG, H., Quantitative Determination of Germinability of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Urediospores Using Near Infrared Spectroscopy Technology, *Journal of Spectroscopy*, vol. 2015, 2015

[Zhao2019]

ZHAO, Y., QIN, F., XU, F., MA, J., SUN, Z., SONG, Y., ZHAO, L., LI, J. & WANG, H., Identification of *Tilletia foetida*, *Ustilago tritici*, and *Urocystis tritici* Based on Near-Infrared Spectroscopy, *Journal of Spectroscopy*, vol. 2019, 2019, 1-15

[Zhao2019b]

ZHAO, Y., LI, C., GUO, P., ZHANG, W., XU, P. & ZHANG, P., Exploration of lift-off Ge-As-Se chalcogenide waveguides with thermal reflow process, *Optical Materials*, vol. 92, 2019, 206-211

[Zhao2020]

ZHAO, Y., TANG, L., YANG, S., TENG, K. & LAU, D., Infrared photodetector based on GeTe nanofilms with high performance, *Optics Letters*, vol. 45, 2020, Nr. 5, 1108-1111

[Zimmermann2015]

ZIMMERMANN, B., TKALČEC, Z., MEŠIĆ, A. & KOHLER, A., Characterizing aeroallergens by infrared spectroscopy of fungal spores and pollen, *PloS one*, vol. 10, 2015, Nr. 4, e0124240

[Zmantar2011]

ZMANTAR, T., BETTAIEB, F., CHAIEB, K., EZZILI, B., MORA-PONSONNET, L., OTHMANE, A., JAFFRÉZIC, N. & BAKHROUF, A., Atomic force microscopy and hydrodynamic characterization of the adhesion of staphylococcus aureus to hydrophilic and hydrophobic substrata at different pH values, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 27, 2011, Nr. 4, 887-896

Annexes

Annexe B.1 : Protocole détaillé de la fonctionnalisation des surfaces Ge-Se-Te

Annexe B.2 : Détails Pointes AFM & Paramètres scan AFM

Annexe B.3 : Images 2 x 2 μm^2 AFM

Annexe B.4 : Assignation exhaustive XPS

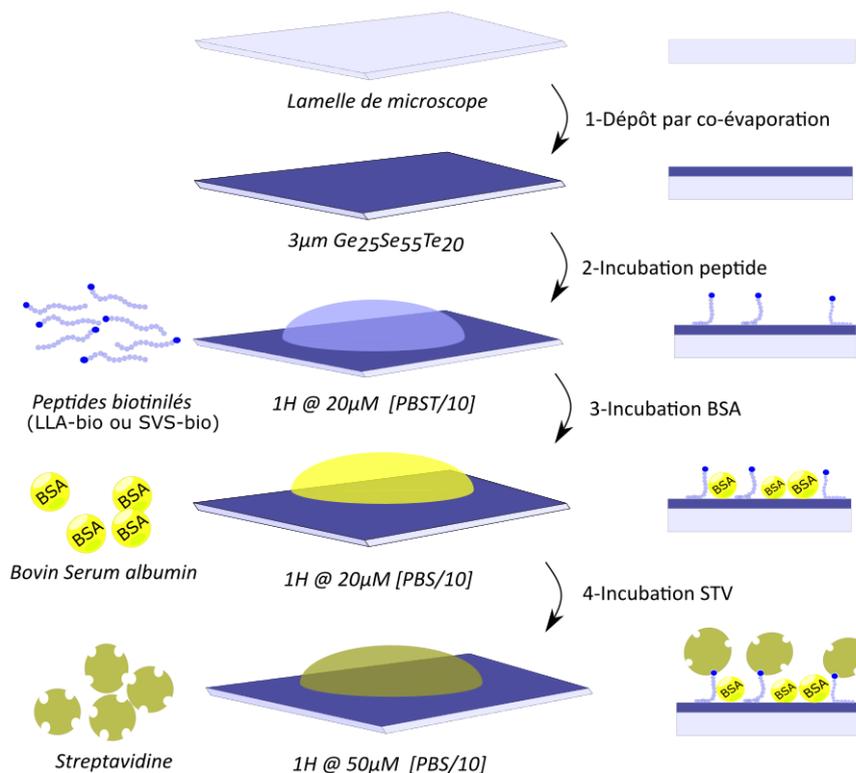
Annexe B.5 : Shift des autres orbitales du Tellure

Annexe D.1 : L'Analyse en Composante Principale (*ACP*, ou *PCA* en anglais)

Annexe B.1 : Protocoles détaillés de la fonctionnalisation des surfaces Ge-Se-Te

Voie peptidique :

Les peptides sont synthétisés par Genecust™. Une solution de 100µL de peptide biotinylé est déposée sur la surface Ge-Se-Te. Ces peptides sont dilués dans une solution standard de PBST/10 (*Phosphate Buffer Saline Tween*®20) à raison de 20µM. Après une heure d'incubation à température ambiante, les surfaces sont rincées avec 1 ml de PBST, puis 1 ml d'eau distillée.



Protocole de fabrication des surfaces fonctionnalisées avec les peptides.

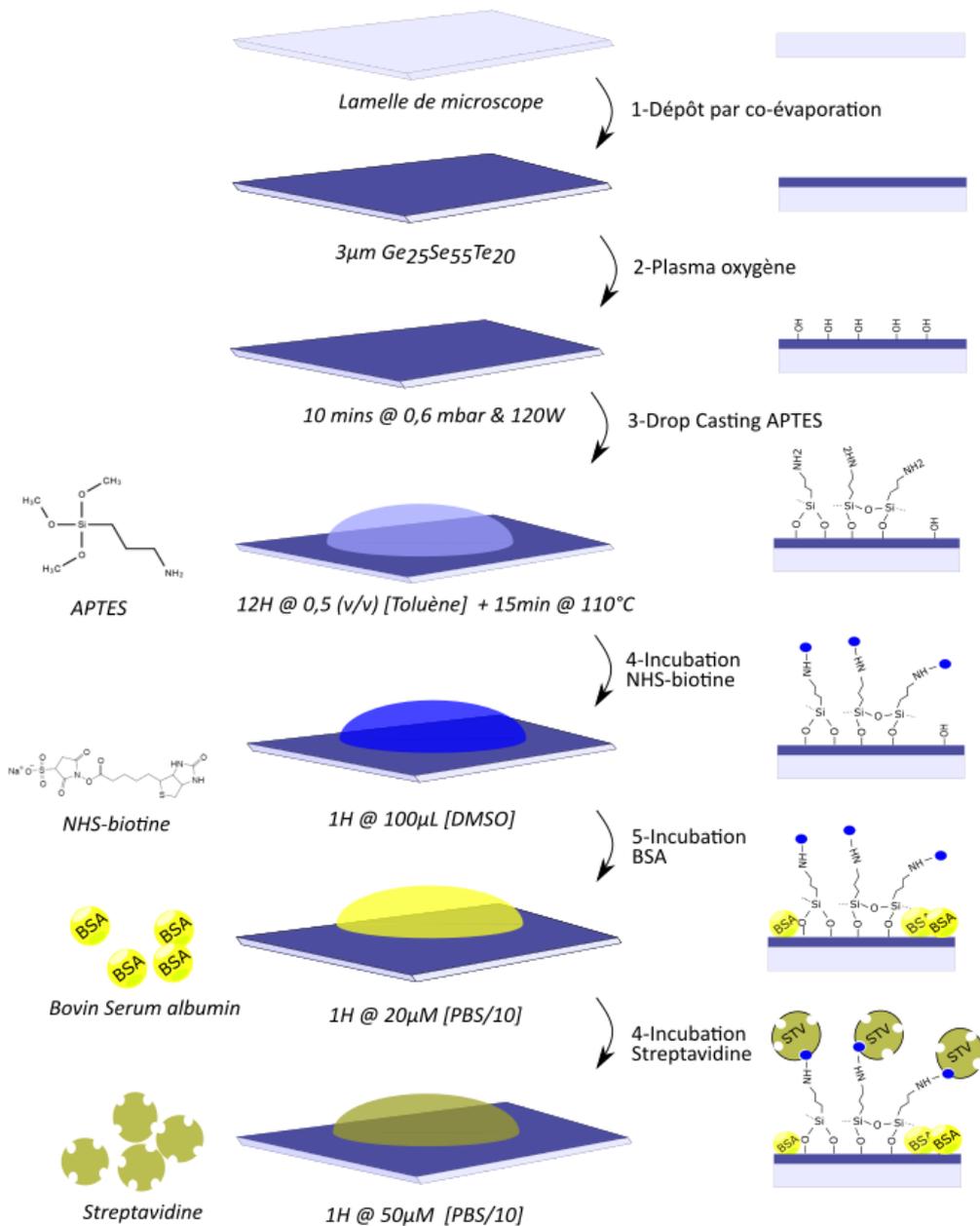
Voie organosilane :

Dans le cas de l'organosilane APTES, la surface Ge-Se-Te subit d'abord un plasma oxygène de 120 Watts pendant 10 minutes. Ce plasma permet la formation de groupements hydroxyles, démontrée par une très forte mouillabilité ($\text{WCA} < 10^\circ$).

Les solutions d'APTES (99 % pureté, Sigma-Aldrich™) sont préparées dans du toluène (0,5 % v/v). 100µL sont déposés sur la surface. Après 12 heures d'incubation à température

ambiante, la surface est rincée avec 1 ml de toluène, 1 ml d'eau distillée, puis mise à l'étuve pendant 15 minutes à 115°C.

Enfin, le précurseur biotinylé, à savoir la NHS-biotine, est dilué dans du DMSO (*diméthylsulfoxyde*) à raison de 100µM. 100 µL sont déposés sur la surface. Après une heure d'incubation à température ambiante, la surface est rincée avec 1 ml de DMSO, puis 1 ml d'eau distillée.



Protocole de fabrication des surfaces fonctionnalisées avec l'APTES

Puis, pour les deux voies :

Une fois les molécules de biotine potentiellement accrochées sur les surfaces chalcogénures, les deux voies de fonctionnalisation se déroulent selon le même protocole :

- Une solution de protéine BSA (*Bovin Serum Albumin*, 66 kDa, Fluka™) est préparée par dilution dans une solution standard de PBS/10 (*Phosphate Buffer Saline*) à raison de 20µM. 100µL sont déposés sur la surface, et laissés pendant une heure à température ambiante. Les surfaces sont ensuite rincées avec 1 mL de PBS puis 1 mL d'eau distillée.

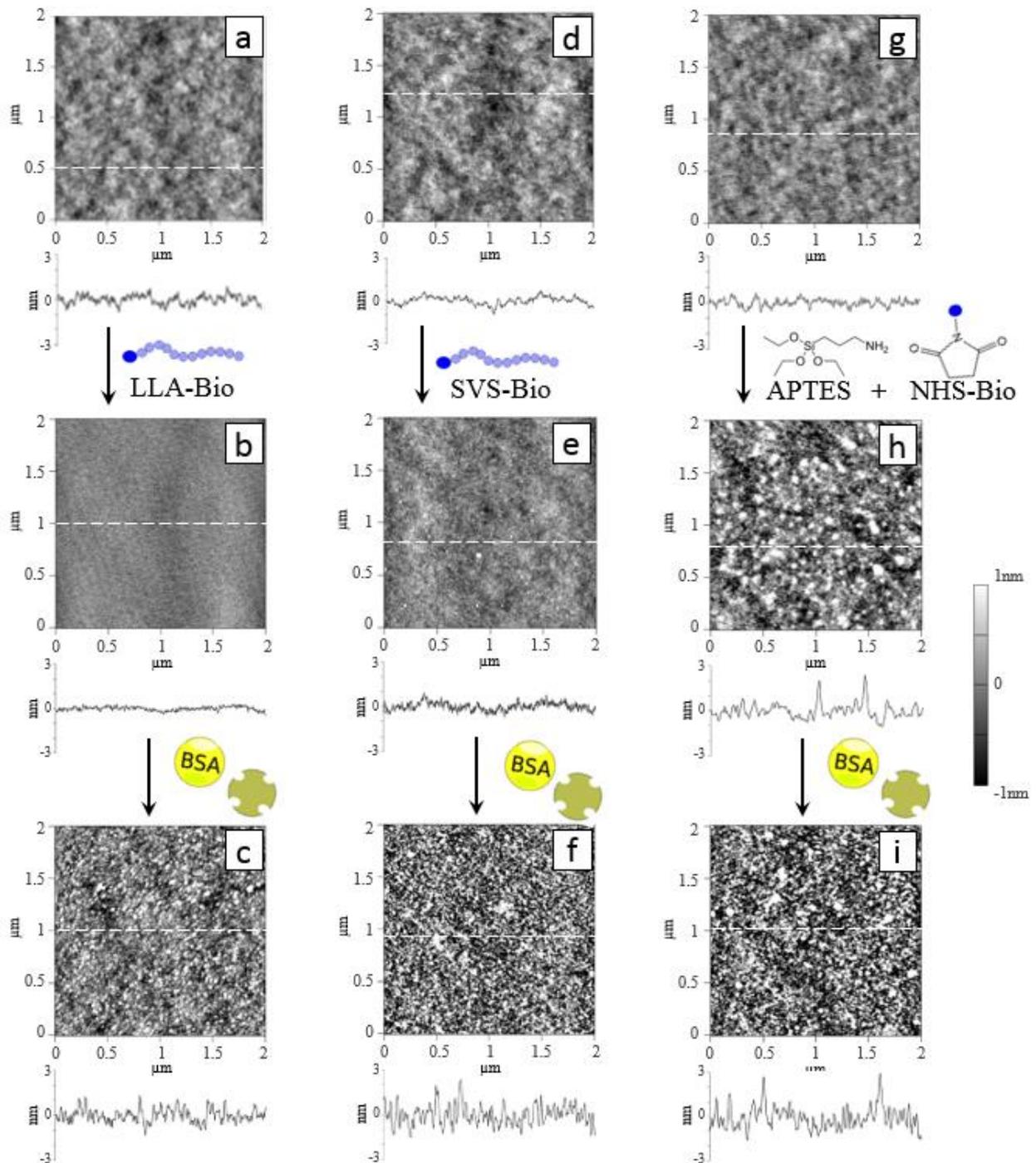
- Une solution de protéine STV (*Streptavidine*, 53 kDa, Sigma-Aldrich™) est préparée par dilution dans une solution standard de PBS/10 à raison de 20µM. 100µL sont déposés sur la surface et laissés pendant une heure à température ambiante. Les surfaces sont ensuite rincées avec 1 ml de PBS puis 1 ml d'eau distillée.

Annexe B.2 : Caractéristiques des pointes OMCL-AC240TS & Paramètres des scans en tapping-mode

Les pointes OMCL-AC240TS sont accrochées sur des puces millimétriques pour faciliter leur manipulation. Ces pointes sont constituées d'un micro-cantilever en silicium de 240 μm de long, 40 μm de large et 2,3 μm d'épaisseur. La constante d'élasticité nominale est de 2 N.m^{-1} et la fréquence de résonance est située autour de 70 kHz. La surface de cette micro-poutre est recouverte d'aluminium pour réfléchir au mieux le spot laser sur les 4 photodétecteurs. La topographie de la surface est enregistrée grâce à un capteur piézoélectrique asservi à l'amplitude de l'oscillation de la pointe.

Dans notre étude, avec les images de 500 nm par 500 nm, ces pointes balayent la surface d'intérêt à une vitesse d'une seconde par ligne, correspondant à 1,2 $\mu\text{m.s}^{-1}$. Cette vitesse est suffisamment faible pour suivre les aspérités présentes sur la surface. 256 lignes sont digitalisées sur 512 pixels. La résolution de l'image est d'environ 2 nm^2 par pixel.

Annexe B.3 : Images 2 x 2 μm^2 AFM

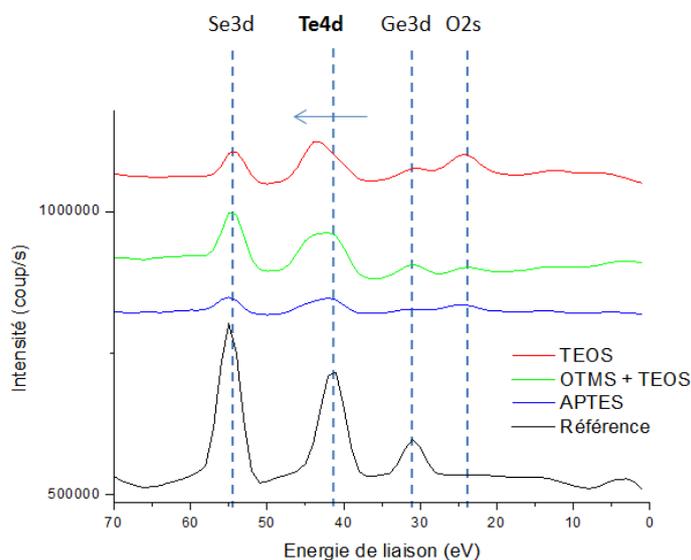


Topographie des surfaces et profils de hauteur des images $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ pour : Ge-Se-Te avant fonctionnalisation (a) puis après incubation avec le précurseur LLA-biotine (b) puis après incubation avec les protéines BSA et STV (c). Ge-Se-Te avant fonctionnalisation (d) puis après incubation avec le précurseur SVS-biotine (e) puis après incubation avec les protéines BSA et STV (f). Ge-Se-Te avant fonctionnalisation (g) puis après fonctionnalisations avec les deux précurseurs APTES puis NHS-biotine (h) puis après incubation avec les protéines BSA et STV (i).

Annexe B.4 : Assignation exhaustive des pics présents sur le spectre XPS de la surface de référence Ge-Se-Te non fonctionnalisée

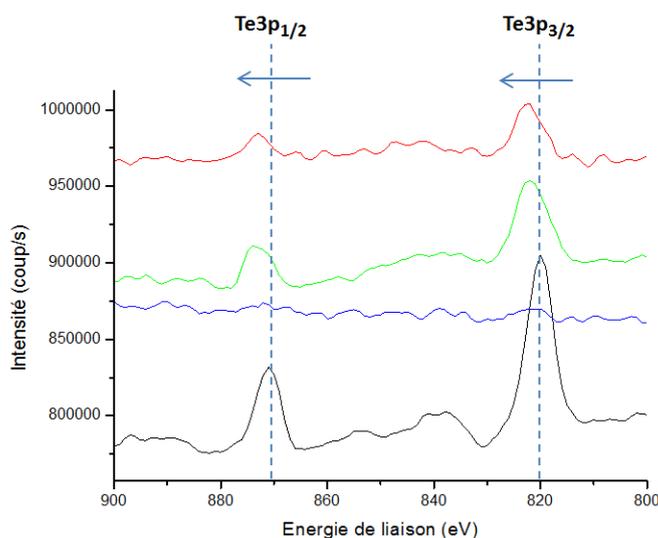
Energie de liaison (eV)	Indexation
1005	TeMN2, Te3s
996	TeMN1
972	OKL1
871	Te3p _{1/2}
820	Te3p _{3/2}
601	Te3d _{3/2} sat
593	Te3d _{5/2} sat
584	Te3d _{3/2}
573	Te3d _{5/2}
556	O1s sat
531	O1s
400	N1s
389	?
360	?
344	Ge LM4
313	GeLM1
297	SeLM6
285	C1s
256	SeLM4
246	?
230	Se3s
198	GeLMM
179	SeLM2, Ge3s
170	Te4s
167	Se3p _{1/2}
161	Se3p _{3/2}
153	Si2s
138	SeLM1
123	Ge3p3
115	?
110	GeLMM, T4p _{3/2}
103	Si2p
74	GeLMM
55	Se3d
41	Te4d
31	Ge3d
24	O2s

Annexe B.5 : Shift des orbitales du Tellure vers des plus grandes énergies de liaisons, traduisant un environnement chimique plus électronégatif



Shift de l'orbitale Te4d pour les trois surfaces fonctionnalisées.

La nouvelle forme de ces pics Te4d traduit l'apparition d'un nouvel environnement chimique, à savoir Te-O. Ces spectres (zooms du survol) ne sont malheureusement pas suffisamment résolus pour réaliser une déconvolution. Les pics orbitales Se3d et Ge3d sont certes peu intenses après fonctionnalisation, mais ne présentent pas de changements significatifs.



Shift de l'orbital Te3p pour les trois surfaces fonctionnalisées

Encore une fois, après fonctionnalisation, on suppose la coexistence de deux environnements pour le tellure, à savoir Te-O et Te-Se.

Annexe D.1 : L'Analyse en Composante Principale (ACP, ou PCA en anglais)

Face à une dizaine ou une centaine de spectres, extraire visuellement l'information spectrale utile est rapidement délicat. C'est pourquoi la spectroscopie utilise les outils mathématiques et statistiques de la chimiométrie. L'ACP, l'Analyse en Composantes Principales, est une méthode d'analyse multivariée exploratoire et descriptive. L'ACP permet de réduire la dimensionnalité d'un jeu de données, en l'occurrence d'un jeu de spectres dans notre cas. Les spectres ont autant de variables que de longueur d'ondes, et l'objectif de l'ACP est de réduire ces variables en composantes principales, dont quelques-unes seulement expliquent les variances entre les spectres. Il s'agit donc d'un changement de repère, avec de nouvelles variables latentes peu nombreuses qui sont des combinaisons linéaires des variables initiales.

Pour aborder les mathématiques s'opérant pendant cette réduction de dimensionnalité, l'écriture matricielle est privilégiée. Ainsi, l'ensemble des données initiales sont représentées par une matrice X , de dimensions $N \times P$: N correspondant aux observations (intensités du signal optique) et P aux variables (longueurs d'onde). La réduction de dimensionnalité se formalise via l'équation suivante :

$$X = T \cdot P' + E$$

Les matrices T (les nouvelles intensités) sont appelées *scores* et les matrices P (les nouvelles variables) sont appelées *loadings*. La matrice E est la variance résiduelle, qui représente le bruit résiduel. La figure ci-dessous représente l'écriture matricielle pour une décomposition en trois composantes :

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|} \hline X \\ \hline \end{array} \begin{array}{c} P \\ N \end{array} = \begin{array}{|c|} \hline t_1 \\ \hline \end{array} \begin{array}{c} \bullet \\ N \end{array} \begin{array}{|c|} \hline p_1' \\ \hline \end{array} \begin{array}{c} P \\ N \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline t_2 \\ \hline \end{array} \begin{array}{c} \bullet \\ N \end{array} \begin{array}{|c|} \hline p_2' \\ \hline \end{array} \begin{array}{c} P \\ N \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline t_3 \\ \hline \end{array} \begin{array}{c} \bullet \\ N \end{array} \begin{array}{|c|} \hline p_3' \\ \hline \end{array} \begin{array}{c} P \\ N \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline E \\ \hline \end{array} \begin{array}{c} P \\ N \end{array}
 \end{array}$$

L'ACP maximise les variances entre les spectres pour identifier les composantes principales. D'un point de vue mathématique, la réalisation de l'ACP s'effectue par diagonalisation du produit scalaire $X'X$, qui correspond à la matrice de variances-covariances. Dans notre étude, cette diagonalisation est réalisée par un algorithme SVD pour *Singular Value Decomposition* (ou décomposition orthogonale aux valeurs propres).

RESUME

Pour réduire la quantité de produits phytosanitaires utilisés en agriculture, ce travail propose de vérifier la faisabilité de micro-capteurs optiques pour détecter les spores des champignons phytopathogènes. Les briques de base de ces micro-capteurs optiques sont des guides d'onde infrarouges à base de couches minces chalcogénures. Le principe de détection est basé sur l'interaction entre les spores immobilisées sur la surface des guides et la lumière qui voyage en leur surface, appelée onde évanescente.

Pour augmenter le taux d'immobilisation des spores, la chimie de surface des composants a été modifiée. Les tests ont montré que l'immobilisation des spores était plus importante en rendant les guides plus hydrophobes ou les zones entre les guides plus hydrophiles. La diffusion des spores, observable dans le proche infrarouge, a par ailleurs été détectée par les guides d'onde, même si sa contribution est très faible.

MOTS-CLES

Couches minces chalcogénures, Guides d'onde, Spores, Organosilanes, Fonctionnalisation de surface, Détection Infrarouge

ABSTRACT

The visual inspection of leaves from sick plant is still the most common way for pathogen detection. Unfortunately, this method is too late, relating you that the fungi arrived several days ago. Therefore, the spreading of phytosanitary inputs in fields should comprise a significant part of preventive treatment. In order to reduce unnecessary use of hazardous chemistry, one should insure early detection of plant diseases. We propose to detect fungi spore with optical waveguides made of chalcogenide materials by using infrared light that could be disrupted by whatever is immobilized on the waveguide.

To capture the fungi spores on the detector, we modified the surface chemistry of the chalcogenide. We achieved high spores immobilization when the chalcogenide surface is more hydrophobic. Then, when spores fall down on the waveguide, we demonstrate that the infrared light carry information about the spores presence.

KEY-WORD

Chalcogenide thin films, Waveguides, Spores, Organosilanes, Surface functionalization, Infrared Detection