



HAL
open science

Capteurs BioFETs innovants pour la détection électrique de molécules biologiques

Rony Midahuen

► **To cite this version:**

Rony Midahuen. Capteurs BioFETs innovants pour la détection électrique de molécules biologiques. Génie chimique. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALI068 . tel-03997956

HAL Id: tel-03997956

<https://theses.hal.science/tel-03997956v1>

Submitted on 20 Feb 2023

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 GRENOBLE ALPES

Spécialité : 2MGE : Matériaux, Mécanique, Génie
civil, Electrochimie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Rony MIDAHUEN

Thèse dirigée par **Valérie STAMBOULI**, LMGP, Grenoble
et co-encadrée par **Sylvain BARRAUD**, CEA-Leti, Grenoble

préparée au sein du **Laboratoire d'Electronique et des
Technologies de l'Information (CEA-LETI, Grenoble)**
dans l'**École Doctorale Ingénierie - Matériaux,
Mécanique, Environnement, Energétique, Procédés,
Production (I-MEP2)**

**Capteurs BioFET innovants pour la détection
électrique de molécules biologiques.**

***Innovative BioFET sensors for electrical
detection of biological species.***

Thèse soutenue publiquement le **18/10/2022**,
devant le jury composé de :

Mr Guilhem LARRIEU

Directeur de recherche, CNRS-LAAS, (Rapporteur)

Mr Abdelkader SOUFI

Professeur des Universités, INSA Lyon, (Rapporteur)

Mme Mireille MOUIS

Directeur de recherche, CNRS-Alpes, (Examinatrice, **Présidente**)

Mme Chantal GONDRAN

Maître de conférences, UGA, (Examinatrice)

Mme Valérie STAMBOULI

Chargé de recherche, CNRS-Alpes, (Directrice de thèse),
Membre invité

Mr Sylvain BARRAUD

Directeur de recherche, CEA-Leti, (Co-directeur de thèse),
Membre invité

Monsieur Pascal MAILLEY

Directeur de recherche, CEA-Leti,
Membre invité



*À toi, mon bébé, Zendaya, et à toi, sa tendre mère.
À toi, mon père, mon héros.*

Remerciements

Ces premiers mots d'attention, j'aimerais directement les adresser à chacun des membres de mon jury pour m'avoir fait l'honneur d'un accomplissement soigné de leur mission respective.

Je vous en suis profondément reconnaissant. J'aimerais insister sur la qualité et le soin apportés par mes Rapporteurs, Monsieur Guilhem LARRIEU (Directeur de Recherche, LAAS-CNRS) et Monsieur Abdelkader SOUIFI (Professeur des Universités, INSA), aux rapports qu'ils ont rendus à l'école doctorale. J'aimerais remercier mes Examinatrices, Madame Chantal GONDRAN (Maître De Conférences, UGA), et Madame Mireille MOUIS (Directeur de Recherche, CNRS-Alpes), également Présidente du jury, pour la justesse de leurs remarques et corrections, m'ayant permis d'apporter à ce rapport un niveau de clarté et de justesse scientifique supplémentaire.

J'aimerais également remercier mon encadrant de thèse, Sylvain BARRAUD (Directeur de Recherche, CEA LETI), toi sans qui mon travail de thèse n'aurait pas été habilement conduit de main de maître, c'est-à-dire avec méthodologie, rigueur, discernement, et assurance. Tu disais assez souvent « *Le diable se cache dans les détails* ». C'est toute une culture scientifique que cette phrase sous-entend. J'ai beaucoup appris auprès de toi. Merci pour m'avoir accordé ta confiance, et pour avoir boosté la mienne. Je t'en serai toujours reconnaissant. Ce diplôme de docteur en sciences est un rêve que j'ai fait. Et puis un jour, nous l'avons réalisé. Parallèlement à ça, merci pour ton humilité, merci d'être un scientifique modèle pour les étudiants et les doctorants que tu encadres.

Mes sincères remerciements et ma plus profonde gratitude vont également à tous les membres du LICL pour avoir été un cadre humainement exemplaire lors de mon stage de Master 2 en 2016, puis 2 ans plus tard, en octobre 2018, pendant la réalisation de ce travail de thèse, finalisé en mai 2022 puis soutenue en octobre 2022.

Ce temps est passé vite. La thèse est une expérience professionnelle particulière et singulière. J'ai eu la chance de pouvoir la vivre pleinement et c'est à tout un environnement que je le dois. Merci aux collègues et collaborateurs internes du CEA LETI qui ont permis à ce sujet de thèse de se concrétiser par la fabrication de prototypes de puces électroniques fonctionnelles. Oui, vous venez de lire la fin de l'histoire : ma thèse s'est très bien passée, les résultats scientifiques obtenus ont été au-delà de mes attentes personnelles. Quelle fierté. Mais au-delà de ces résultats factuels, je suis spécialement reconnaissant envers l'environnement au sein duquel j'ai travaillé, certainement propice à cet aboutissement. Je veux écrire que je n'y suis pas arrivé tout seul, évidemment. Je n'oublie personne. Je pense qu'il existe un « ADN » CEA, un environnement, un esprit d'équipe à grande échelle, une connivence, en tout cas, une cohérence, qui fait du CEA une entité où les projets les plus atypiques ont de fortes chances d'être amorcés et également toute leur chance de réussite. Me concernant, c'est ce que j'ai expérimenté. Je remercie alors chacun de mes anciens collègues et collaborateurs.

Je pense particulièrement à Bernard PREVITALI pour m'avoir souvent très justement guidé dans le suivi des lots de fabrication en salle blanche, dans les procédés de métrologie, guidé vers les personnes ayant les expertises appropriées, et dans bien d'autres aspects techniques du travail du doctorant.

Je remercie également nos interlocuteurs internes provenant d'autres départements et laboratoires du LETI qui ont pu prendre part, longuement ou brièvement, à ce projet pluridisciplinaire, nécessitant plusieurs étages d'expertises.

Plus particulièrement, j'aimerais remercier chaleureusement Pascal MAILLEY (Directeur de Recherche au LETI et membre invité parmi le jury de Thèse), Guillaume NONGLATON, Caroline FONTELAYE, Nicolas VERPLANCK, et Thomas ALAVA (membre du CSI), qui ont su apporter beaucoup de plus-

value à ce travail, en s'y intéressant de prêt, en étant acteurs et force de proposition. Merci à chacun d'entre vous, j'ai admiré puis apprécié vos différentes expertises dans le domaine des capteurs électroniques interfacés avec des systèmes microfluidiques et des molécules chimiques/ organiques. Une thèse étant un long parcours d'apprentissages, j'aimerais que vous sachiez que je suis ravi d'avoir pu travailler auprès de vous, avec vous, et enfin, que je suis très satisfait du travail accompli.

Du côté du laboratoire de caractérisation, j'aimerais remercier Denis BLACHIER pour son support technique quant à la mise en place d'un banc de caractérisation adapté aux conditions de caractérisation de mes puces.

Un autre pan de savoir-faire qui a joué un rôle fondamental dans le déroulé de mes travaux de thèse est reflété par ma directrice de thèse, Valérie STAMBOULI (Chargé de recherche au LMGP (Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique)). Valérie, merci pour tout le temps que tu m'as dédié dans ma quête de meilleures performances pour nos dispositifs. Merci de m'avoir mis dans d'excellentes conditions de travail. Je travaillerais à nouveau avec toi ou pour toi sans hésiter une seule seconde. Je le pense pour de nombreuses raisons. Je t'adresse ici mes remerciements les plus sincères, ainsi que ma plus profonde gratitude.

Merci à Edwige BANO (Grenoble INP, membre du CSI) pour avoir apporté sa vision ainsi que son expertise à plusieurs étapes clés des travaux que nous menions.

Enfin, je veux remercier très chaleureusement mes collègues qui étaient là tous les jours. C'est auprès de vous que j'ai accompli ces travaux de thèse. Sachez que votre place m'est fondamentale. Merci pour l'énergie, les encouragements, la bienveillance, les compliments, les dons. Je pense à vous. *Le parrain* (Jean-Michel P.), Z (Alexandre M.), Théophile D., Thibaud F., Tarcisius J., Hawa D., Léo L., Daphnée B., Camila C., Safia B., Olfa K., Haidar A., Noura N. Je pense aussi à certains anciens, Corentin C., Giulia U., et à mes collègues et ami(e)s du bâtiment 42, « team EDyP » : Sandrine M., Céline F., Marie C., Marie-Pierre M., Thomas F.

Merci, soyez béni(e)s des Dieux.

Résumé

Les recherches menées autour des biocapteurs présentent aujourd'hui de nombreuses applications telles que le diagnostic de maladies infectieuses ou génétiques dans leurs phases précoces, le séquençage de matériel génétique, ou encore, la traçabilité de petites molécules d'intérêt (micropolluants environnementaux, composés organiques volatiles, toxines, pesticides, allergènes, etc.). Les progrès de la nanoélectronique concernant la miniaturisation et l'intégration des dispositifs favorisent depuis plusieurs années le développement des biocapteurs électrochimiques pour les performances de sensibilité, de rapidité d'analyse, de temps de réponse, et de multiplexage.

Aujourd'hui, l'utilisation des biocapteurs à effet de champ (*BioFETs*), suscite l'intérêt croissant de la communauté scientifique pour une application de détection directe (sans marqueur optique), ultrasensible, et rapide des molécules d'intérêt.

Parmi les transistors à effet de champ, les transistors à nanofils de silicium (de diamètre <50 nm) présentent l'avantage d'un rapport surface/volume élevé, les rendant particulièrement sensibles aux effets de charges en surface et donc bien adaptés aux besoins de détection directe, ultrasensible, quantitative, multiplexée et réalisée en temps réel. D'autres avantages propres aux transistors à effet de champ à nanofils portent sur leur adaptabilité à une production de masse suivant les procédés de fabrication « *top-down* », leur intégration facilitée au plus proche de systèmes électroniques de traitement de signal, et la stabilité de leurs propriétés électroniques dans la durée.

Au cours de cette thèse, nous avons procédé au développement technologique de transistors BioFET à nanofils de silicium recouverts par une couche de 2 à 3 nm d'épaisseur de HfO_2 en tant qu'oxyde de grille, et de dimensions très variées. Ces transistors ont été réalisés à l'échelle du substrat (Si sur isolant, *SOI* 200 mm) suivant des procédés de dépôts, de lithographies (DUV et e-beam) et de gravures. Notre puce mesure 22 mm \times 22 mm. Chaque puce intègre plusieurs dispositifs avec différents motifs (nanofil unitaire, réseaux de nanofils, micro-ruban, motifs en ruches d'abeilles, nanofils sous forme de doigts inter-digités). Chaque étape de lithographie et de gravure est systématiquement contrôlée par des étapes de métrologie afin de connaître les dimensions des structures fabriquées.

Après l'étape de fabrication, une première campagne de caractérisation électrique à sec nous a permis de valider le fonctionnement des dispositifs BioFETs. Dans un second temps, nous avons évalué la sensibilité aux charges ioniques de nos dispositifs par une mesure de pH (potentiel hydrogène) de solutions tampons déposées directement dans les cavités microfluidiques des dispositifs, sur l'oxyde de grille HfO_2 . Cette sensibilité a été évaluée à ~ 60 mV/pH sur différentes structures de BioFET, conformément à la limite théorique de Nernst, et indépendamment des structures et des dimensions considérées. Dans un second mode de mesure dit « mode de mesure à double grille », nous avons pu augmenter la sensibilité à 1,57 V/pH grâce au couplage capacitif des deux grilles asymétriques positionnées en face avant et en face arrière de nos dispositifs.

Après cette étape de mesure de pH, nous avons évalué deux protocoles de silanisation (aminosilane en phase vapeur ou epoxysilane en phase liquide) pour réaliser le greffage des molécules d'ADN sondes à la surface de l'oxyde de grille HfO_2 de nos BioFETs. Ces protocoles ont été développés sur des substrats SiO_2 plans et la qualité des couches de fonctionnalisation a été évaluée en imagerie de fluorescence, laquelle est réalisée après hybridation des séquences d'ADN sondes avec des séquences d'ADN cibles. La qualité de couche obtenue avec la fonctionnalisation utilisant l'epoxysilane a permis de s'affranchir des limitations observées dans le cas de la silanisation obtenue par l'aminosilane. L'utilisation d'un robot déposant de micro-volumes de molécules sondes a permis de faire un pas de plus vers l'automatisation de la fonctionnalisation de nos biocapteurs.

Résumé

Après les étapes de greffage des sondes oligonucléotidiques et la réalisation d'essais d'hybridation avec des molécules d'ADN cibles concentrées à 2 μM , nous avons mesuré un décalage significatif de tension de seuil d'environ 200 mV entre des dispositifs greffés avec des molécules d'ADN sondes complémentaires aux cibles introduites, et d'autres dispositifs de structures identiques, greffés avec des molécules d'ADN sondes non complémentaires (« contrôles négatifs »).

Nous avons également mené une preuve de concept de détection électronique de protéines en fonctionnalisant nos dispositifs avec un aptamère spécifique à la thrombine. L'introduction ou non de thrombine (2,7 μM) à la surface des dispositifs fonctionnalisés par les aptamères spécifiques à la thrombine a généré un décalage de tension de seuil d'environ 27 mV.

Enfin, en prévision d'une détection multiplexée, nous avons dessiné et fabriqué une première version d'un système microfluidique composé de plusieurs canaux permettant l'acheminement de différents électrolytes à la surface de la puce.

Les perspectives de ces travaux de thèse s'inscrivent dans la démonstration du plein potentiel de nos biocapteurs en développant davantage les trois axes majeurs suivants :

1. Développement d'un système microfluidique avancé capable de gérer la préparation et l'acheminement de faibles volumes d'échantillons vers les *BioFETs*.
2. Intégration des puces auprès d'un système de mesure et de traitement de signal (filtrage, amplification, communication, etc.).
3. Sensibilité de détection avec identification des limites de détection atteignables. D'autres structures à nanofils de Si développées dans nos laboratoires, tels que les nanofils suspendus et superposés, pourraient nous permettre d'aller au-delà des limites de détection actuelles.

L'intégration de lignes métalliques servant d'électrodes de référence, directement gravées sur les puces, au voisinage des transistors, est également une piste en cours de réflexion pour la miniaturisation et l'instrumentalisation des puces.

Mots clés : Biocapteur, *ISFET*, *BioFET*, pH, ADN, Thrombine, Silanisation, Diagnostic.

Key words: *Biosensor*, *ISFET*, *BioFET*, *pH*, *ADN*, *Silicon*, *Thrombin*, *Silanization*, *Diagnosis*.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
RESUME	7
LISTE DES ACRONYMES	11
1. CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	14
1.1. CONTEXTE, INTERET ET ENJEUX	14
1.2. BIOCAPTEURS	15
1.2.1. <i>Fondamentaux</i>	15
1.2.1.1. Contexte Historique	15
1.2.1.2. Description des biocapteurs	16
1.2.1.3. Caractéristiques des capteurs chimiques et biologiques	17
1.2.1.4. Classification des biocapteurs suivant le type de transducteur	19
1.2.1.5. Biocapteurs <i>FET</i> à nanofils de silicium	22
1.2.2. <i>Principe de fonctionnement des ISFETs/ BioFETs à nanofils de Si</i>	22
1.2.3. <i>Revue des travaux académiques</i>	29
1.2.3.1. Détection de molécules d'intérêt à partir de <i>BioFETs</i> à nanofils de Si	29
1.2.3.2. Limitations des <i>BioFETs</i> à nanofils de Si	30
1.3. NOTRE POSITIONNEMENT PAR RAPPORT A L'ETAT DE L'ART.	31
2. CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT TECHNOLOGIQUE DES BIOCAPTEURS A NANOFILS DE SI	32
2.1. ETAPES TECHNOLOGIQUES DE FABRICATION DES BIOCAPTEURS A NANOFILS DE SI	32
2.1.1. <i>Description de notre puce</i>	32
2.1.1.1. Région « matrice »	34
2.1.1.2. Région de motifs variables	35
2.1.2. <i>Principales étapes de fabrication</i>	37
2.1.3. <i>Photographie des biopuces fabriquées</i>	43
2.2. CARACTERISATION ELECTRIQUE A SEC DES DISPOSITIFS BIOFET	43
2.2.1. <i>Caractéristiques de transfert à l'échelle de la puce et de la plaque SOI.</i>	44
2.2.2. <i>Effet de la gravure de cavité sur la tension de seuil des BioFETs</i>	47
2.2.3. <i>Effet du dimensionnement des structures de type nanofils</i>	52
3. CHAPITRE 3 : FONCTIONNALISATION DES NANOFILS DE SI	55
3.1. INTRODUCTION A LA NOTION DE FONCTIONNALISATION DE SURFACE	55
3.2. GENERALITES SUR LES SILANES ET LEUR UTILITE EN TANT QU'AGENT DE FONCTIONNALISATION	56
3.3. PRESENTATION DES DIFFERENTES METHODES DE FONCTIONNALISATION UTILISEES	61
3.3.1. <i>Méthode 1 : fonctionnalisation par silanisation en phase vapeur, APTES/GA</i>	61
3.3.1.1. Fonctionnalisation d'échantillons plans SiO ₂ / Si	61
3.3.2. <i>Méthode 2 : fonctionnalisation par silanisation en phase liquide, EHTES</i>	69
3.3.3. <i>Caractérisation optique des échantillons fonctionnalisés</i>	71
3.3.3.1. Préparation des échantillons pour les sessions d'imagerie en microscopie à fluorescence	72
3.3.3.2. Environnement expérimental d'hybridation	72
3.3.3.3. Rinçages post-hybridation	73
3.3.4. <i>Caractérisation des surfaces fonctionnalisées et greffées</i>	73
3.3.4.1. Généralités sur la microscopie de fluorescence	73
3.3.4.2. Interprétation d'une micrographie de fluorescence et descriptif du matériel de microscopie à fluorescence utilisé	74
3.3.4.3. Observation de la fluorescence après hybridation de l'ADN en utilisant le protocole APTES/GA	77
3.3.4.4. Observation de la fluorescence après hybridation de l'ADN en utilisant le protocole EHTES	87

3.3.4.5.	Discussion concernant les micrographies de fluorescence	88
3.3.5.	<i>Effet de la quantité de ssDNA greffée sur l'intensité de fluorescence mesurée.</i>	89
3.3.6.	<i>Conclusion</i>	90
4.	CHAPITRE 4 : CARACTERISATIONS ELECTRIQUES DES BIOFETS	92
4.1.	MESURE DE PH	92
4.1.1.	<i>Introduction</i>	92
4.1.2.	<i>Préparation des électrolytes</i>	92
4.1.3.	<i>Modes de mesure</i>	93
4.1.4.	<i>Caractéristiques de transfert mesurées en mode « Simple grille »</i>	94
4.1.5.	<i>Caractéristiques de transfert mesurées en mode « Double grille »</i>	95
4.1.6.	<i>Influence du motif du transistor sur la sensibilité de mesures en pH</i>	97
4.1.7.	<i>Conclusion</i>	98
4.2.	DETECTION D'ADN	99
4.2.1.	<i>Etat de l'art sur les BioFETs à détection d'ADN</i>	99
4.2.2.	<i>Réactifs expérimentaux et méthodologie de détection des oligonucléotides</i>	100
4.2.3.	<i>Résultats et Discussion (détection électrique de deux brins d'ADN complémentaires)</i>	106
4.2.4.	<i>Conclusion</i>	110
4.3.	DETECTION DE PROTEINE : EXEMPLE DE LA THROMBINE	111
4.3.1.	<i>Bibliographie</i>	111
4.3.2.	<i>Méthodes de fonctionnalisation des oxydes de grille des transistors et détection électrique des molécules de thrombine</i>	114
4.3.2.1.	Détails du protocole de fonctionnalisation	115
4.3.2.2.	Etapes de caractérisations électriques	116
4.3.3.	<i>Résultats et Discussion</i>	118
4.3.3.1.	Analyses de mouillabilité	118
4.3.3.2.	Analyses des caractéristiques électriques	118
4.3.4.	<i>Conclusion</i>	125
5.	CONCLUSION GENERALE	126
6.	PERSPECTIVES	129
7.	RÉFÉRENCES	133
	PUBLICATIONS	143
8.	CONFÉRENCES	143

Liste des acronymes

A

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFM : Microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy*)

APTES : 3-aminopropyltriéthoxysilane

B

BOX : Oxyde enterré (*Buried Oxide*)

C

CMOS : *Complementary Metal-Oxide-Semiconductor*

CMP : Planarisation mécano-chimique (*Chemical Mechanical Planarization*)

CNC : Commande numérique par ordinateur

COC : Copolymère d'oléfine cyclique

Cy3 : Cyanine 3

E

EDL : Double couche électrique (*Electrical double layer*)

EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor Receptor*).

EHTES : 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane

EIS : Spectroscopie d'impédance électrochimique (*electrochemical impedance spectroscopy*)

EDX : Spectroscopie des Rayons X à dispersion d'énergie (*Energy Dispersive X-ray Spectrometry*)

F

FET : Transistor à effet de champ (*Field-effect transistor*)

FIB: *Focussed ion beam*

G

GCL : Couche de Gouy-Chapman (*Gouy-Chapman Layer*)

H

Hf: Fluorure d'hydrogène (*Hydrogen fluoride*)

I

ISE : Electrodes sélectives d'ions (*Ion Selective Electrode*)

ISFET: Transistor à effet de champ sensible aux ions (*Ion-sensitive field-effect transistor*)

IHP: Plan interne de Helmholtz (*Inner Helmholtz plane*)

L

LOC : Laboratoire sur puce (*Lab-on-Chip*)

LSPR : Résonance des plasmons de surface localisés (*Localized Surface Plasmon Resonance*)

Liste des acronymes

M

MEB : Microscopie Electronique à balayage

MEMS : *Micro- electro- mechanical systems*

MOSFET : *Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor*

O

OHP : Plan externe d'Helmholtz (*Outer Helmholtz plane*)

P

PB : Tampon Phosphate (*Phosphate buffer*)

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase chain reaction*)

PEALD : Dépôt de couche atomique assistée par plasma (*Plasma Enhanced Atomic Layer Deposition*)

PECVD : Dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (*Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition*)

PDMS : Polydimethylsiloxane

POC : Au plus près du lieu du service ou de l'intervention (*Point of care*)

PCB : Carte de circuit imprimé (*Printed circuit board*)

PVD : Dépôt physique en phase vapeur (*Physical Vapor Deposition*)

R

RIE : Gravure ionique réactive (*Reactive ion etching*)

S

SAW : Onde acoustique de surface (*Surface Acoustic Wave*)

SERS : Diffusion Raman exaltée de surface (*Surface-enhanced Raman spectroscopy*)

Si NW : Nanofil de Silicium (*Silicon nanowire*)

SL : Couche de Stern (*Stern Layer*)

SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SNR : Rapport Signal/Bruit (*Signal-to-noise ratio*)

SOI : Silicium sur Isolant (*Silicon-on-Insulator*)

SS : Pente sous le seuil (*Subthreshold Slope*)

ssDNA : ADN à brin unique, ou brin simple (*single strand DNA*)

SPR : Résonance des plasmons de surface (*Surface Plasmon Resonance*)

SVR : Rapport Surface/Volume (*Surface-to-volume ratio*)

T

tDNA : ADN cible (*target DNA*)

TEM : Microscopie électronique à transmission

TMAH : Tetramethylammonium hydroxide

U

UV: Lithographie Ultra-violet

X

XPS : Spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*)

1. Chapitre 1 : Introduction

1.1. Contexte, intérêt et enjeux

Il s'est produit au cours des deux dernières décennies un essor industriel notable autour des biocapteurs. Cet essor tient son origine de l'avancée et de la maturité des micro-technologies en électronique ¹ et de la micro-fabrication, ayant entre autre, ouvert la voie à la miniaturisation des robots d'analyse et au développement de nouvelles architectures visant à l'optimisation des moyens de diagnostic ²⁻⁴.

Les biocapteurs ⁵ sont des instruments de diagnostic compacts et portatifs, utilisés pour détecter des traces de molécules d'intérêt dans de faibles volumes d'échantillons chimiques ou biologiques. Ces outils ont été conçus pour pouvoir analyser directement (hors laboratoires et avec peu de ressources) des échantillons identiques à ceux analysés en laboratoires d'analyses. Il peut en effet s'agir de tests diagnostics médicaux destinés à établir un bilan sur l'état de santé général d'un patient (dépistages sanguins ou urinaires par exemple). Il peut également être question d'autres types de tests, tels que des tests de traçabilité agroalimentaire visant le contrôle et la prévention d'un risque sanitaire ou environnemental ^{6,7}, de tests menés dans le cadre de travaux de recherches académiques ou industriels (recherche de médicaments, etc.).

Le diagnostic est un exercice indispensable au contrôle de notre environnement chimique ou biologique dans le but d'apporter les réponses optimales aux dysfonctionnements diagnostiqués. Les biocapteurs répondent à une demande soutenue et grandissante de dispositifs autonomes, faciles d'utilisation, utilisables en routine, peu encombrants, permettant la réalisation en peu d'étapes de tests diagnostiques spécifiques (par exemple, mesures du taux de glycémie ou du taux d'oxygénation du sang), de manière ultrasensible, rapide et peu coûteuse ⁸. Dans le paradigme du monde actuel, les biocapteurs sont appelés à être de véritables laboratoires plus ou moins complexes, miniaturisés, au cœur desquels, des nanocapteurs électrochimiques (complexés à des interfaces chimiques, biologiques, organiques ou inorganiques), détectent des traces de molécules recherchées et établissent un rapport diagnostic ^{9,10}.

De nos jours, les biocapteurs de nouvelle génération sont facilement mobilisables sur le terrain et intègrent des modules leur permettant de prendre en charge – la manipulation et le traitement de l'échantillon (lyse, mixage, filtrage, séparation, dilution) ¹¹, – le test diagnostique en lui-même, et – la communication des résultats d'analyses. Un exemple illustrant le propos est celui du biocapteur « MinION » (Oxford Nanopore Technologies), commercialisé en 2014, et qui devient en 2017, le premier dispositif à avoir séquencé de l'ADN dans l'espace, à bord d'un vaisseau spatial de la NASA ^{12,13}.

Les exigences et les contraintes des laboratoires d'analyse telles que l'expertise du personnel utilisateur, les compétences en maintenance des équipements, les coûts de fabrication des instruments, de consommation énergétique, de temps d'analyse, et des réactifs chimiques, justifient le fort potentiel des biocapteurs et l'intérêt éveillé des industriels pour ces instruments, dont le marché s'est estimé à 25,5 milliards de dollars en 2021 ¹⁴ et à ~70 milliards de dollars dans les quinze années à venir ⁴.

Pour l'heure, force est de constater que le marché des biocapteurs se confronte encore à des défis majeurs ¹⁵ (fabrication à grande échelle, et niveaux de fiabilité des résultats) faisant obstacle à leur démocratisation auprès des hôpitaux et des industriels, et confinant leur utilisation à très peu d'applications : gazométrie artérielle, pH sanguin, et glucométrie, réalisés sur des biocapteurs phares tels que le « i-Stat » du fabricant Abbott ¹⁶, entre autres biocapteurs « glucomètres » ¹⁷.

Des instruments électroniques autonomes et portatifs basés sur des *FETs* à nanofils de silicium peuvent aussi être cités : le « eQuant » (Avails Medicals) dédié à la réalisation d'antibiogrammes (bactéries vs antibiotiques, et suivi de la survie des bactéries en mesures de pH), ou « tracense TS100 », pour la détection d'explosifs.

Les enjeux de ce travail de thèse consistent à répondre à une demande d'instruments de diagnostic sensibles, spécifiques, rapides, faciles d'utilisation, et mobilisables sur le terrain d'analyse. L'instrument que nous avons développé est une petite puce carrée de 22 mm de côté, produite en salle blanche, à l'échelle de plusieurs dizaines de plaques SOI, pour les travaux expérimentaux de développement de l'instrument. Cette puce est conçue et prévue pour être intégrée au cœur d'un système de mesures portatif et autonome. Il est effectivement prévu qu'à terme, la puce soit collée et connectée au-dessus d'une électronique CMOS de contrôle, de traitement, et de mesure de signal.

1.2. Biocapteurs

1.2.1. Fondamentaux

1.2.1.1. Contexte Historique

Le terme biocapteur ¹⁸ est défini par l'Union internationale de la chimie pure et appliquée (*IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry*) comme étant « tout instrument utilisant des réactions biochimiques spécifiques catalysées par des enzymes, immunosystèmes, tissus, organelles, ou cellules entières, pour détecter des composés chimiques par le moyen de signaux électriques, thermiques ou optiques » ^{18,19}. Le premier concept de capteur de mesure électrochimique apparaît pour la première fois un peu plus d'un siècle plus tôt, en 1906, dans la publication de M. Cremer ²⁰. Au cours de ses travaux de recherche, il mesure une différence de potentiel proportionnelle à l'écart de pH entre deux électrolytes acide et basique séparés par une membrane de verre. En 1922, W. S. Hughes met au point un système d'électrodes de verre de mesure de pH ²¹, dont la notion même est introduite quelques années plus tôt ²². En 1956, L. Clark développe et dépose un brevet pour l'invention de l'électrode de « Clark » ²³, un dispositif mesurant la concentration d'oxygène dans un électrolyte.

En 1962, L. Clark et C. Lyons développent le premier véritable biocapteur ²⁴. Il s'agit d'un biocapteur électrochimique ampérométrique de mesure du taux de glucose sanguin. Son principe de fonctionnement est basé sur la réaction catalytique enzymatique de l'enzyme « glucose oxydase » en présence de glucose, d'oxygène, et d'eau, consommant les précédents réactifs et produisant une forme modifiée du glucose (acide gluconique) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ²⁵. Dans le biocapteur développé, une fine couche de glucose oxydase est fixée sur la membrane de verre d'une électrode de mesure d'oxygène. La variation de la concentration en oxygène du milieu est proportionnelle à sa teneur en glucose puisque ces deux réactifs participent à la réaction chimique catalysée. L'information sur la teneur en glucose de l'échantillon est alors indirectement obtenue.

Inspirés du même principe de mesure (complexe enzyme/ électrode de mesure), en 1967, Updike et Hicks publient leur article « *the enzyme electrode* » à travers lequel ils décrivent un dispositif biocapteur de mesure de glucose ²⁶. Guilbault et Montalvo fabriquent en 1969 un biocapteur d'urée basé sur la réaction catalytique de l'uréase, transformant l'urée en ions ammonium (NH_4^+) ²⁷.

En 1970, P. Bergveld publie le premier transistor à effet de champ de mesure d'ions (*ISFET, ion sensitive field effect transistor*) ²⁸. La preuve de concept est réalisée sur un transistor à effet de champ en Si sans

grille métallique, utilisé pour la mesure ampérométrique de différentes concentrations de sels (NaCl) dans un électrolyte.

En 1975, le premier biocapteur commercial basé sur la technologie de L. Clark voit le jour. Il s'agit du « Yellow Springs Instrument Company analyzer (Model 23A YSI analyzer) » utilisé pour la mesure rapide de la glycémie dans des échantillons de sang de personnes diabétiques ²⁹.

De nos jours, plusieurs biocapteurs sont commercialisés ^{16,17}. De par l'intérêt qui leur est porté, ils se sont très vite diversifiés selon le type de détecteur qui est utilisé (*i.e.* transducteur de signal), ainsi que selon le type d'espèces chimiques ou biologiques qu'ils détectent.

1.2.1.2. Description des biocapteurs

Un biocapteur est composé de trois principaux modules fonctionnels (**Figure 1**) :

1. L'interface de biodétection ou de captation spécifique de l'espèce chimique ou biologique ciblée,
2. Le transducteur du signal de détection généré par l'évènement de détection,
3. L'élément de mesure du signal.

L'interface de détection est une sonde chimique, biologique, inorganique, naturelle ou synthétique. Le transducteur est un module physique qui convertit le signal de détection « sonde vs cible » (charge électrique, masse, lumière, etc.) en grandeur physique mesurable (courant, tension, lumière, etc.), de quantité proportionnelle à la quantité d'évènement de détection. L'élément de mesure du signal est un système électronique qui mesure le signal « sonde vs cible » et le traite avant de générer un résultat d'analyse interprétable par l'utilisateur. Ce résultat peut être de nature numérique, graphique, imagée, etc. ⁵.

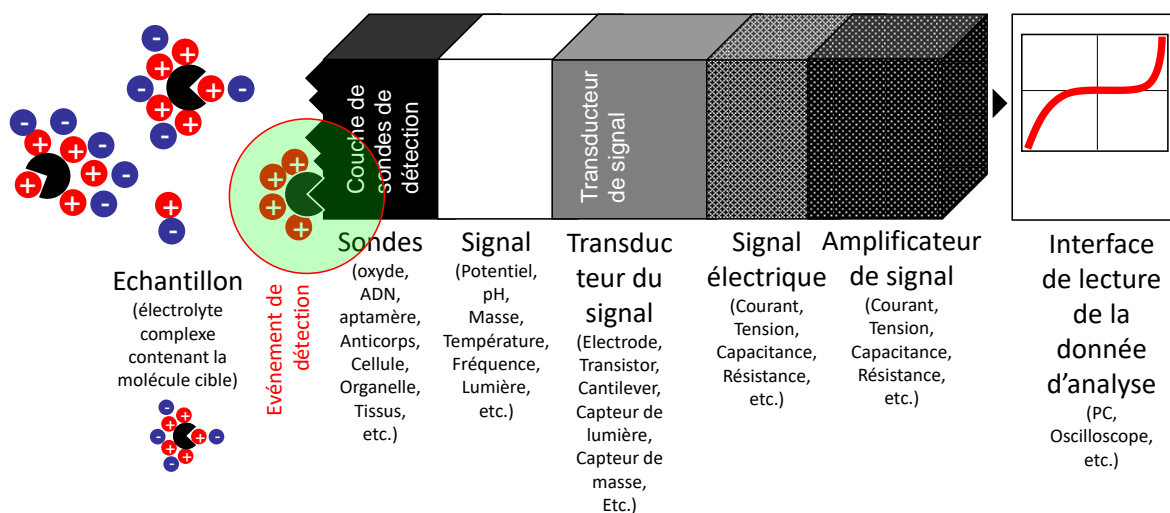


Figure 1. Description schématique d'un biocapteur.

Les biocapteurs peuvent être catégorisés suivant deux principaux critères. Le type de biorécepteur utilisé dans l'instrument (la nature des sondes), et la méthode employée pour la transduction de signal ³⁰.

En se basant sur le premier critère, on peut citer les biocapteurs à ADN ³¹, à enzymes ^{32,33}, et à anticorps ³⁴. En se basant sur le second critère, quelques classes de biocapteurs sont les suivantes : optique ^{35,36}, électrochimique ^{18,37,38}, piézoélectrique ³⁹, massique (ou gravimétrique) ⁴⁰, thermique ⁴¹.

Ces différentes classes sont non exhaustives et évolutives puisque des éléments de bio-reconnaissance et de transduction de signal continuent d'être développés pour les biocapteurs de prochaines générations. Il est également intéressant de noter que certaines classes de biocapteurs peuvent regrouper des « sous-classes ». Par exemple, la classe des biocapteurs électrochimiques regroupe les biocapteurs ampérométriques, potentiométriques, impédimétriques, capacitifs, etc., démultipliant davantage les différentes catégories existantes et possibles. La **Figure 2** présente un exemple de classification de biocapteurs réalisés sur les critères de « type de biorécepteur » et de « type de transducteur de signal ».

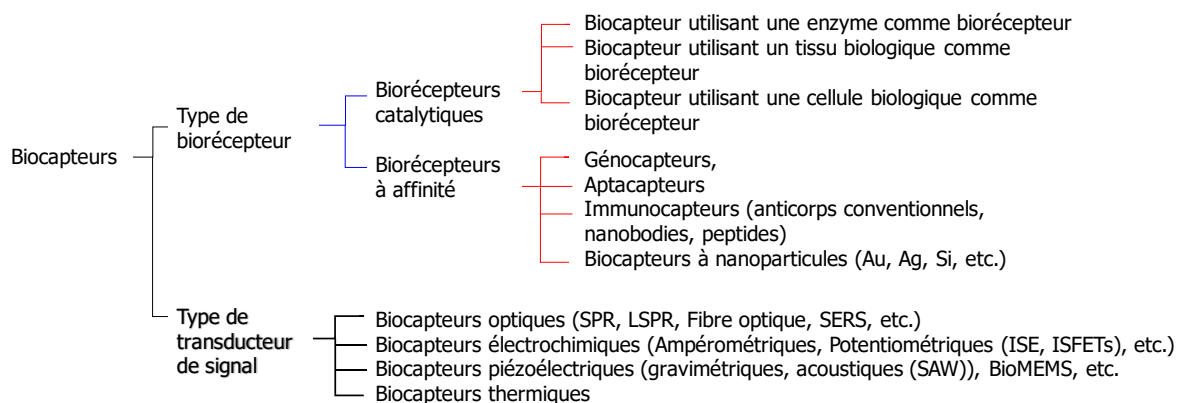


Figure 2. Exemple de classification de biocapteurs suivant le type de biorécepteur ou de transducteur utilisé au cœur du dispositif. *SPR* : résonance des plasmons de surface/ *LSPR* : résonance des plasmons de surface localisés/ *SERS* : diffusion Raman exaltée de surface/ *ISE* : électrodes sélectives d'ions/ *ISFETs* : transistors à effet de champ sensibles aux ions/ *SAW* : onde acoustique de surface.

De nos jours, les biocapteurs se démocratisent en tant qu'instruments pour le diagnostic et sont le sujet de recherches considérables visant à optimiser leurs performances.

1.2.1.3. Caractéristiques des capteurs chimiques et biologiques

Les performances des biocapteurs sont évaluées suivant différentes caractéristiques répondant au cahier des charges du biocapteur idéal. Dans un ordre d'importance, ces propriétés concernent la sélectivité, la reproductibilité, la stabilité, la sensibilité, la linéarité de réponse, et le temps de réponse du biocapteur. Ces notions caractéristiques sont développées dans les paragraphes suivants.

Sélectivité. La sélectivité est une caractéristique centrale déterminante lorsqu'un biocapteur est développé. Il s'agit de la capacité du module biorécepteur à détecter avec une certaine spécificité la molécule cible contenue dans un échantillon complexe composé de molécules de conditionnement, d'éléments contaminants, et d'autres réactifs.

Le niveau de sélectivité ou de spécificité est inhérent au **biorécepteur** utilisé au sein du dispositif. Une sélectivité idéale garantit une absence de faux positifs puisque le biorécepteur est fortement discriminant vis-à-vis de la molécule cible.

Deux systèmes d'interface sélectives sont mentionnés dans la littérature : les interfaces enzymatiques (ou catalytiques) ^{42,43} et les interfaces basées sur des reconnaissances affines ³⁸ (anticorps, nano anticorps (*nanobodies*), sondes oligonucléotidiques, matériaux possédant des propriétés d'affinité pour une molécule cible donnée, etc.).

Les biorécepteurs enzymatiques ont démontré une spécificité supérieure aux biorécepteurs à affinités. Cependant, ils sont moins stables chimiquement, sujets à la dénaturation, peu adaptables aux différentes architectures de biocapteurs, et le phénomène métabolique de biodétection enzymatique n'est pas toujours réversible, ce qui peut être un inconvénient supplémentaire suivant l'application visée. Toutes ces raisons ont conduit les scientifiques à favoriser le développement des biorécepteurs à affinité ^{44,45}.

Quelques exemples typiques de biorécepteurs à affinité très largement utilisés sont les sondes oligonucléotidiques et les anticorps, utilisés comme sondes bioréceptrices dans les classes des **génomcapteurs** et des **immunocapteurs**, respectivement.

La sélectivité est un axe principal d'amélioration des biocapteurs, notamment à travers la fabrication de nouveaux biorécepteurs artificiels synthétisés pour être spécifiques de la molécule cible. On trouve également l'utilisation combinée de plusieurs biorécepteurs pour obtenir une empreinte moléculaire spécifique qui soit propre à la molécule cible.

Reproductibilité. Lorsqu'une même mesure est répétée, un biocapteur reproductible communique des résultats précis et non dispersés autour d'une valeur moyenne. Tant que les paramètres d'analyses sont maintenus constants, les réponses du biocapteur sont constantes d'une mesure à l'autre. Cette propriété est fondamentale pour évaluer la fiabilité et la robustesse des biocapteurs.

Stabilité. La stabilité d'un biocapteur concerne sa capacité à conserver un signal de sortie sans dérive ou hystérésis, et reproductible, sous l'influence de perturbations environnementales ou locales (lumière, température, pH, autres). Cette propriété est d'une importance capitale en ce qui concerne les expérimentations à longue durée au cours desquelles le signal de sortie est mesuré en continu ou à des intervalles de temps allant d'une heure à plusieurs jours. La nature du biorécepteur utilisé peut influencer sur la stabilité du biocapteur. Un biorécepteur peu stable chimiquement et qui se dénature dans le temps sera un élément limitant pour l'obtention d'une stabilité optimale.

Sensibilité. La sensibilité est la capacité du biocapteur à pouvoir détecter de faibles concentrations de molécules d'intérêt qui seraient présentes dans un échantillon. Théoriquement, il s'agit de la valeur du rapport entre la variation du signal de sortie « y » et la variation de l'évènement d'entrée mesuré « x » (*i.e.*, la pente de la caractéristique du biocapteur « $\delta y / \delta x$ », ou la tangente en un point d'intérêt choisi par l'utilisateur). Une sensibilité optimale couplée à un rapport de signal sur bruit élevé permet une absence de faux négatifs (cas positif non détecté et présenté comme négatif du fait des limitations de sensibilité).

Plusieurs états de santé pathologiques sont identifiés par des seuils cliniques. La capacité d'un biocapteur à pouvoir détecter de façon fiable de faibles traces de biomarqueurs permet un diagnostic précoce d'une maladie et présente ainsi un intérêt considérable pour le corps médical.

Linéarité. Cette propriété permet d'évaluer la précision de mesure du biocapteur sur une gamme de mesures linéaires. Une gamme de linéarité optimale est prévisible selon l'équation $y = ax + b$ avec y , le signal de sortie, a , la sensibilité du biocapteur, x , la concentration de l'analyte et b , le signal de référence.

Temps de réponse. Temps nécessaire à la restitution de 95% de la mesure analytique. Cette spécification dépend de plusieurs facteurs : le temps que met la molécule cible à migrer vers la couche sensible ou le biorécepteur, la durée du métabolisme réactionnel et le temps de réponse intrinsèque au couple transducteur/ élément de mesure du signal de détection.

Le temps de réponse peut être optimisé suivant différentes stratégies. L'utilisation de systèmes microfluidiques permettant la manipulation de faibles volumes réactionnels afin d'optimiser la probabilité d'entrée en contact des molécules sondes et cibles, la fabrication d'une couche dense de fonctionnalisation du biocapteur, et le chauffage de l'électrolyte (ceci ayant pour effet d'augmenter les coefficients de diffusion des molécules).

1.2.1.4. Classification des biocapteurs suivant le type de transducteur

Comme abordé précédemment, les biocapteurs peuvent être catégorisés sur la base du principe d'opération du type de transducteur sur lequel ils sont construits. Les transducteurs peuvent être de type optique, électrochimique, piézoélectrique, gravimétrique, thermique, acoustique, etc. Les paragraphes suivants font une brève description des classes prédominantes.

Biocapteurs à transducteurs optiques^{35,36}. Dans cette configuration, le transducteur convertit le signal de détection en une variation de quantité de photons. Le paramètre variable mesuré peut être la variation d'absorbance du transducteur, la transmittance, la réflectance, la polarisation, ou d'autres paramètres optiques propres au transducteur. La variation de ces paramètres optiques est directement corrélée et est proportionnelle à la biodétection des molécules d'intérêt. Les phénomènes optiques sur lesquels sont fondées les mesures sont les phénomènes de fluorescence⁴⁶, de variation de longueur d'onde optique⁴⁷, de plasmons de surface^{48,49}, d'ondes évanescentes⁵⁰. Certaines entreprises telles que « *cytivalifesciences* » (instrument Biacore) ou « *Aryballe* » (instrument NeOse) ont des technologies de détection basées sur des transducteurs optiques.

Biocapteurs à transducteurs électrochimiques⁵¹. Les transducteurs électrochimiques transmettent directement un signal électrique au module électronique de mesure. La réaction chimique acido-basique, d'oxydoréduction, ou d'adsorption se produisant entre le biorécepteur et la molécule cible induit une variation de charges qui modifie « proportionnellement » les propriétés électriques du transducteur au travers d'une variation de potentiel, de courant, d'impédance, ou de capacité entre les bornes d'une ou de plusieurs électrodes.

La **nature électrique du signal de détection** est un avantage qui a considérablement favorisé le développement et l'utilisation des biocapteurs à mode de transduction électrochimique.

Le transducteur électronique peut être assimilé à un intermédiaire qui exerce une influence minimale sur la mesure analytique qui est, *de facto*, d'autant plus fine, rapide, et fiable. D'autres avantages existent et concernent notamment les faibles besoins énergétiques de ce type de systèmes, et leur capacité à être intégré aux systèmes électroniques avancés de mesure et de traitement des signaux émis par le transducteur.

Biocapteurs potentiométriques. Les biocapteurs potentiométriques intègrent des modules transducteurs de deux types : les électrodes sélectives d'ions (*ion selective electrode* ou *ISE*)⁵² ou les transistors à effet de champs (*field effect transistors* ou *FET*)⁵³. Les électrodes (**Figure 3**) peuvent être construites en verre borosilicate, en cristal mono ou poly-cristallin, ou en d'autres types de polymères. Elles peuvent être de dimensions variées. Ces différentes propriétés définiront les performances de l'électrode. La membrane (paroi) de l'électrode qui sonde l'échantillon est sélective (perméable) d'un ion donné (H_3O^+ , Na^+ , K^+ , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} , etc.), ou dans le cas des électrodes à enzymes³³, d'un analyte cible particulier dont le métabolisme va produire un ion.

Lorsque la membrane sélective rentre en contact avec l'échantillon sondé, la concentration de l'ion s'équilibre de part et d'autre de la membrane. Cette migration ionique induit une variation locale de potentiel électrique d'équilibre, décrite par l'expression thermodynamique empirique de l'équation de Nernst ou de Nikolsky-Eisenman^{54,55} (**Equation 1**).

$$E = E^{\circ} \pm \frac{RT}{nF} \times \ln\left(\frac{a_e}{a_i}\right)$$

Équation 1. Equation de Nernst ou de Nikolsky-Eisenman.

E est le potentiel d'équilibre de l'électrode sélective pour l'ion d'intérêt détecté, E° est le potentiel de l'électrode de référence. Le signe « ± » dépend de la nature cationique ou anionique de l'ion. R est la constante des gaz parfaits (8,314 J/mol/K°), T, la température en Kelvin (273,15 + t °C), n, la valence de l'ion détectée, F, la constante de Faraday (96485 C/mol), a_e , la concentration de l'ion dans l'échantillon sondé, et a_i , la concentration de l'ion ayant diffusé au travers de la membrane sélective. $\ln(a_e/a_i) = \ln(10) \times \log(a_e/a_i) = 2,302 \times \log(a_e/a_i)$. $R \times T/F \times \ln(10) = R \times T/F \times 2,302 = 0,059$ V à température ambiante. Cette valeur représente la pente de Nernst pour un ion monovalent (n = 1).

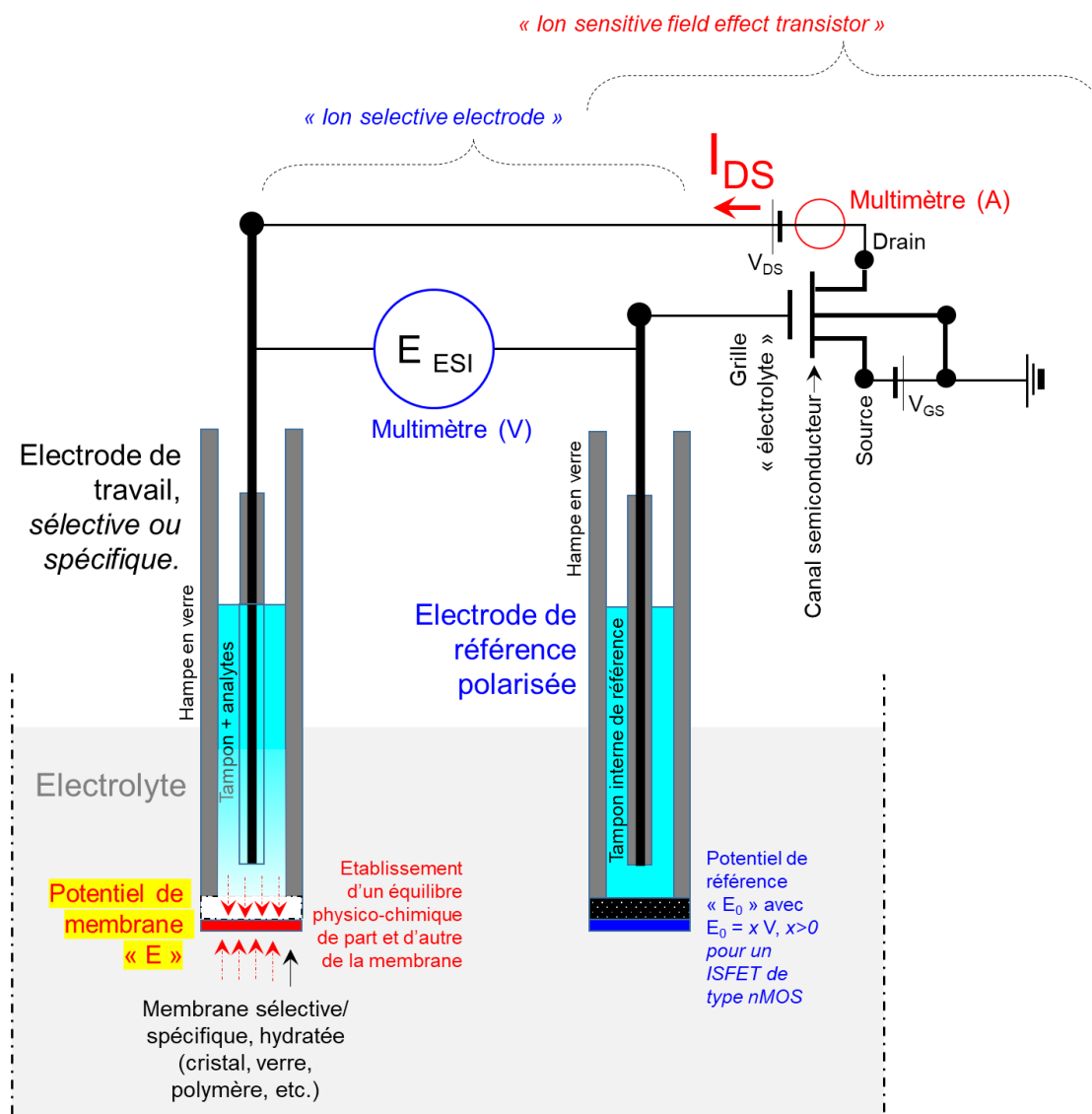


Figure 3. Schéma illustrant le principe de fonctionnement des électrodes sélectives d'ions (ISE) et du transistor ISFET.

La mesure potentiométrique consiste à mesurer avec un voltmètre la variation de potentiel électrique entre une électrode sélective et une électrode de référence immergée dans un électrolyte de référence isolé (**Figure 3**). Le courant entre l'électrode sélective et l'électrode de référence est nul ou quasiment nul. Une électrode annexe peut être connectée à l'électrode sélective afin de pouvoir établir un courant de conduction ⁵⁶.

Les « transistors à effet de champ sensibles aux ions » (*ion sensitive field effect transistors, ISFETs*) ainsi que les « *BioFETs* » (*Biologically sensitive FETs* ⁵⁷) dérivés des *ISFETs* sont basés sur le même principe de fonctionnement, tel que schématisé sur la **Figure 3**. Les *ISFETs* et les *BioFETs* sont une sous classe de biocapteurs électrochimiques ayant émergée dans les années 1970 ⁵⁸ et ayant fait l'objet d'une attention particulière. Leurs larges panels de structures (*ISFETs* planaires ⁵⁹, *ISFETs* à nanofils ⁶⁰, *ISFETs* en réseau de nanofils suspendus ⁶¹, etc.) et de dimensionnements (dispositifs unidimensionnels ou bidimensionnels fabriqués à l'échelle du nanomètre ⁶²), leur robustesse (en comparaison aux *ISE* très fragiles et contenant des électrolytes) et leur compatibilité de fabrication avec les technologies CMOS ont permis de dépasser les performances de détection de molécules d'intérêts diverses et variées (limites de détection, sélectivité, détection multiplexée sur des dispositifs nanométriques) ⁵⁵.

Biocapteurs ampérométriques. Pour ce type de biocapteurs, la mesure de l'analyte d'intérêt est directement basée sur la variation du courant qui s'établit entre les électrodes du transducteur, sous l'influence de la réaction chimique impliquant l'analyte et le biorécepteur. Les transducteurs ampérométriques permettent d'évaluer précisément les effets de potentiels aux interfaces « électrolytes/électrodes ». La variation de courant est mesurée à potentiel fixe. Dans d'autres configurations de mesure, le potentiel peut être balayé pendant la mesure de courant. Ces techniques de mesures sont dites de « voltammétrie » (ou voltampérométrie) avec notamment les techniques de voltammétrie cyclique, de voltammétrie différentielle pulsée. ^{38,63}.

Biocapteurs impédimétriques ^{25,51,64}. L'impédance d'une cellule électrochimique utilisée comme transducteur est l'expression mathématique du rapport entre, la tension alternative appliquée sur ses électrodes, et le courant alternatif résultant. La détermination de l'impédance de la cellule est réalisée sur une large gamme de fréquences de tension alternative (en général, de 100 kHz à 1 MHz). La caractéristique de transfert (la fonction d'impédance) dans ce domaine de fréquences est une suite de nombres complexes composés d'une partie réelle assimilée à la résistance du composant, et d'une partie imaginaire assimilée à sa capacité.

En pratique, ces deux paramètres sont mesurés indépendamment. Les biocapteurs impédimétriques sont basés sur des mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique où l'influence de la réaction chimique entre le biorécepteur et l'analyte modifie ses propriétés d'impédance et donc son spectre d'impédance. Ce changement impédimétrique est sondé suivant la réalisation d'un profil d'impédance du transducteur, représenté sous la forme d'un « diagramme de Bode » ou d'un « diagramme de Nyquist ». Ces graphes sont déconvolués par des algorithmes de calcul mettant en jeu des circuits électriques équivalents permettant l'extraction des informations relatives aux propriétés de l'électrolyte et de l'analyte analysés (variations de concentrations, mobilités ioniques, conductance, etc.).

Biocapteurs piézoélectriques. Les transducteurs piézoélectriques sont fabriqués dans des matériaux naturels ou synthétiques détenant des propriétés piézoélectriques.

Ces matériaux tels que le cristal de quartz par exemple, ont la propriété de se polariser sous l'application d'une pression mécanique sur l'une de leurs faces. Ce mécanisme peut être extrapolé à la génération d'un potentiel électrique aux bornes d'un dispositif piézoélectrique en réponse à l'adsorption d'un analyte sur l'une de ses faces. L'amplitude de la tension générée est alors proportionnelle au poids (*i.e.*, la force) appliquée par l'analyte à la surface du transducteur.

A l'inverse, le cristal piézoélectrique se déforme lorsqu'une tension électrique est appliquée à ses bornes, et vibre donc, lorsque cette tension est alternative. La fréquence de vibration d'un matériau

piézoélectrique correspond à sa fréquence de résonance. Cette fréquence dépend sensiblement de plusieurs paramètres intrinsèques au matériau piézoélectrique utilisé (pureté, géométrie, électronique associée, etc.). L'adsorption d'un analyte sur un transducteur piézoélectrique vibrant à sa fréquence de résonance conduit à la perturbation du signal de sortie du dispositif piézoélectrique et donc à la possibilité de détecter l'analyte ayant généré la perturbation visualisée^{40,65}. Certaines entreprises telles que « *OpenQCM* » ont des instruments de diagnostic basés sur des transducteurs piézoélectriques.

1.2.1.5. Biocapteurs *FET* à nanofils de silicium

Une attention particulière a été apportée aux biocapteurs basés sur les FETs parce qu'ils ont démontré une compatibilité supérieure aux besoins de production de masse de dispositifs dédiés au diagnostic rapide, facilement mobilisable et utilisable, et fortement sensibles aux molécules d'intérêt présentes dans un échantillon chimique ou biologique. En effet, les ISFETs et les BioFETs ont offert l'opportunité de rassembler tous les critères précédemment mentionnés. La diversification de leur structure, de leur dimension, et des matériaux de fabrication utilisés ont permis d'atteindre des performances remarquables en termes de sensibilité d'analyse et de temps de réponse. La compatibilité avec les technologies « semiconducteurs » et les systèmes électroniques est également un argument majeur ayant contribué à leur avènement. Parmi ces dispositifs, les BioFETs à **nanofils de Si** ont apporté une augmentation significative des performances de sensibilité, un gain ayant été attribué à leur structure unidimensionnelle^{66,67}.

1.2.2. Principe de fonctionnement des *ISFETs/ BioFETs* à nanofils de Si

Un ISFET ou un BioFET est un ensemble de trois ou quatre électrodes définies par les termes « source », « drain », « grille métallique » et « électrode de référence ou grille de face avant ». La structure de l'ISFET ou du BioFET est finalement très similaire à la structure du *MOSFET* (*metal oxide semiconductor FET*)⁶⁸, hormis la substitution de la grille métallique par une électrode de référence dans le cas de l'ISFET, ou du BioFET^{62,69}.

Les électrodes de source et de drain sont des terminaux métalliques permettant l'établissement d'un courant de conduction, traversant le canal semiconducteur (nanofil de Si). Le canal est isolé de la grille métallique et de l'électrode de référence par un diélectrique (oxyde de grille en face avant et oxyde enterré en face arrière du canal dans le cas d'un substrat SOI). La polarisation appliquée sur la grille métallique ou sur l'électrode de référence permet d'établir un canal de conduction avec une certaine densité de courant. Le courant « source-drain » est alors généré en appliquant une différence de potentiel « V_{DS} » entre les électrodes de source et de drain (**Figure 4**).

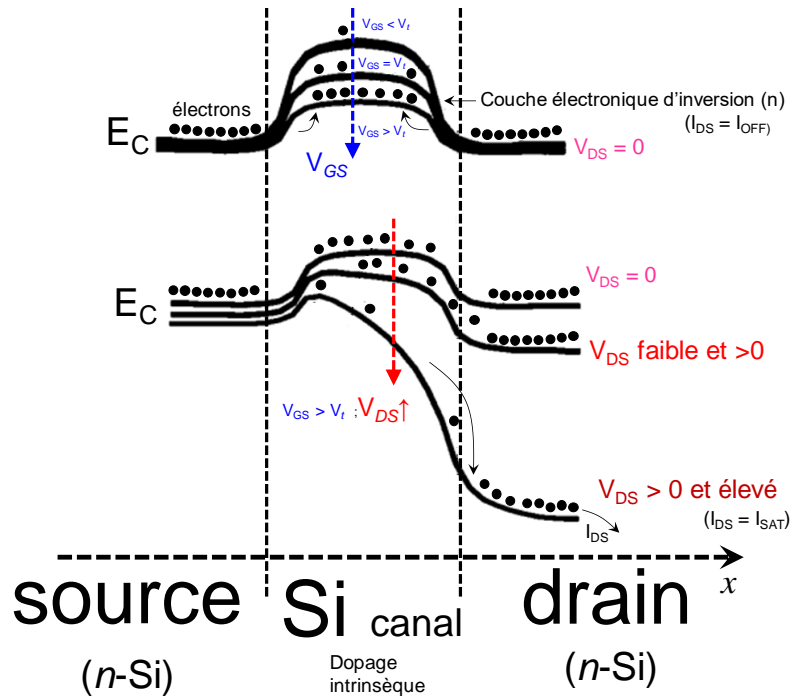


Figure 4. Représentation simplifiée du diagramme d'énergie de la bande de conduction « E_C » dans une structure $nMOS$, suivant la direction « source/drain ». L'augmentation progressive des potentiels de grille « V_{GS} » et de drain « V_{DS} » permet l'abaissement du niveau d'énergie de la bande de conduction et conduit à la circulation d'un courant électronique entre la source et le drain.

L'utilisation de la quatrième électrode (électrode de référence ou grille de face avant) permet un gain de sensibilité de détection, expliqué par un effet de couplage capacitif entre les capacités des deux grilles asymétriques (face avant et face arrière) ⁷⁰⁻⁷⁵. Le courant (I_{DS}) traversant le canal d'un ISFET ou d'un BioFET a pour expression :

$$I_{DS} = \mu C_{ox} \frac{W}{L} \left\{ [V_{GS} - V_{t(ISFET)}] V_{DS} - \frac{V_{DS}^2}{2} \right\}$$

Équation 2. Expression du courant de drain d'un ISFET dans le régime linéaire de fonctionnement ⁷⁶⁻⁷⁸.

Dans le régime linéaire, I_{DS} est proportionnel à V_{GS} . I_{DS} représente le courant de drain, μ la mobilité des porteurs de charge dans le canal, C_{ox} la capacité de l'oxyde de grille, W et L sont respectivement la largeur et la longueur du canal, V_{GS} est la différence de potentiel entre l'électrode de grille (ou de référence) et l'électrode de source, $V_{t(ISFET)}$ est la tension de seuil du transistor (tension de grille à laquelle un canal de conduction se forme), et V_{DS} est la différence de potentiel entre les électrodes de source et de drain.

L'expression de $V_{t(ISFET)}$ est donnée par l'**Equation 3** :

$$V_{t(ISFET)} = V_{fb} + 2\phi_f - \frac{Q_B}{C_{ox}}$$

Équation 3. Expression de la tension de seuil de l'ISFET.

avec V_{fb} la tension de bande plate du système ISFET (différence de travaux de sortie entre l'électrolyte et le semiconducteur du canal), ϕ_f , la différence de niveau d'énergie entre le niveau de Fermi du canal et son niveau de Fermi intrinsèque, et Q_B la charge de la couche de déplétion présente dans le canal. Pour rappel, C_{ox} est la capacité de l'oxyde de grille par unité de surface.

Pour un ISFET, la tension de bande plate V_{fb} peut s'écrire sous la forme :

$$V_{fb} = E_{ref} - \Psi + \chi_{sol} - \frac{\phi_{Si}}{q}$$

Équation 4. Expression de la tension de bande plate V_{fb} ,

avec E_{ref} , le potentiel appliqué sur l'électrode de référence, Ψ , le potentiel électrostatique s'appliquant effectivement à la surface de l'oxyde de grille, χ_{sol} , le potentiel de dipôle de l'électrolyte, ϕ_{Si} , le travail de sortie du silicium, et q , la charge électronique.

Lorsque la composition de l'électrolyte induit l'application d'une charge de surface sur l'oxyde de grille, significativement différente de sa charge de neutralité, l'expression V_{DIFF} (terme arbitraire) exprimant la nouvelle valeur de la tension de seuil décalée devient :

$$V_{DIFF} = V_{fb} + 2\phi_f - \frac{Q_B + Q_{ox} + Q_{ss}}{C_{ox}}$$

Équation 5. Expression du décalage V_{DIFF} de la tension de seuil sous l'effet d'un électrolyte exerçant un effet de charge significatif sur l'oxyde de grille de l'ISFET.

avec Q_{ox} , les charges fixes présentes dans l'oxyde de grille, et Q_{ss} , les charges s'étant accumulées dans le puits de potentiel qui se situe dans le canal de silicium, à proximité de l'interface oxyde de grille/canal. Le potentiel électrostatique de surface qui module la densité des charges dans le canal de conduction peut s'écrire sous la forme :

$$\Psi = \ln(10) \frac{kT}{q} \frac{\beta}{\beta + 1} (\Delta pH)$$

Équation 6. Expression du potentiel électrostatique établi à la surface de l'oxyde de grille.

avec k , la constante de Boltzmann, T , la température en Kelvin, β , le facteur de sensibilité de l'oxyde de grille, déterminé par la densité de surface des groupements hydroxyles ⁷². ΔpH est définie par l'écart de pH entre les différents électrolytes mis en contact avec l'oxyde de grille.

Le mécanisme de détection des molécules chimiques ou biologiques des ISFETs ou des BioFETs est basé sur l'effet des charges additionnelles qu'apporte l'électrolyte chargé en ions ou en espèces biologiques à la surface de l'oxyde de grille du transistor. Ces charges peuvent modifier la densité de charges de surface de l'oxyde de grille suivant le modèle du « *site binding model* » décrit en 1973 ^{79,80}. Elles contribuent aussi à la modification de la densité de charges dans le volume jouxtant l'oxyde de grille et polarisent le canal. La sensibilité de détection peut être notée « $\delta\Psi/\delta pH$ » et vaut 59 mV par unité de pH (à température ambiante), ou par décade de concentration, pour un ISFET de sensibilité dite « Nernstienne » ⁵⁵.

Site binding model ⁷⁹. Le concept du « *site binding model* » décrit l'équilibre chimique qui s'établit entre un électrolyte d'une certaine composition et la surface d'un oxyde lorsqu'ils entrent en contact. Dans un exemple simple où l'électrolyte contient des protons (H^+), et où l'oxyde est un oxyde de grille SiO_2 hydroxylé, les silanols amphotères surfaciques ($SiOH$) de l'oxyde captent des protons lors d'une réaction chimique de « protonation », ou en perdent suivant une « déprotonation », ou restent neutres (si $pH = pH_{pzc} SiO_2$, *point of zero charge*), en fonction du pH de l'électrolyte et de sa teneur en sels.

Conformément à la composition de l'électrolyte, cet équilibre chimique peut s'établir sur un état modifié de densité de charges à l'interface entre l'électrolyte et l'oxyde de grille ⁸¹. Lorsque la densité de charges à cette interface varie, les molécules polaires d'eau contenues dans l'électrolyte diffusent spontanément vers la surface de l'oxyde, suivies de contre-ions solvatés, migrant également vers la surface de l'oxyde pour neutraliser électriquement les charges de surface. Suivant la composition de l'électrolyte, l'encombrement stérique entre les contre-ions induit un gradient de présence de contre-ions. La première couche de contre-ions stationnaires (établie de manière stable à la surface de l'oxyde) est à son tour recouverte par une couche diffuse d'ions et de contre-ions mobiles. La couche stationnaire (également nommée couche compacte, ou couche de Stern, ou couche d'Helmholtz) et la couche diffuse (couche de

Gouy-Chapman) forment une « double couche électrique » dont l'épaisseur correspond à la « longueur de Debye, λ_D », hauteur au-delà de laquelle les effets électrostatiques influençant le courant de conduction diminuent de manière exponentielle ⁸² (Equation 7, Figure 5).

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r kT}{2 N_A q^2 I}}$$

Équation 7. Expression de la longueur de Debye (λ_D),

avec ϵ_0 et ϵ_r les permittivités du vide et de l'électrolyte, respectivement, N_A est le nombre d'Avogadro, I est la concentration de l'électrolyte (mol/L). La longueur de Debye dépend de la concentration de l'électrolyte, les autres termes de l'équation étant des constantes.

Le modèle de la double couche électrique est démontré par la théorie de Gouy-Chapman-Stern ^{80,83}. Les différentes couches d'électrolyte précédemment mentionnées peuvent être assimilées à des capacités branchées en série (Figure 6), dont la capacité principale est celle de la couche stationnaire (pellicule d'eau mesurant quelques Ångströms d'épaisseur et ayant une capacité très élevée).

Dans la configuration ISFET ou BioFET, cette série de capacités ioniques permet l'établissement de champs électriques suffisamment importants à la surface de l'oxyde de grille, et module directement le courant de conduction dans le canal du transistor par effet de champ électrostatique.

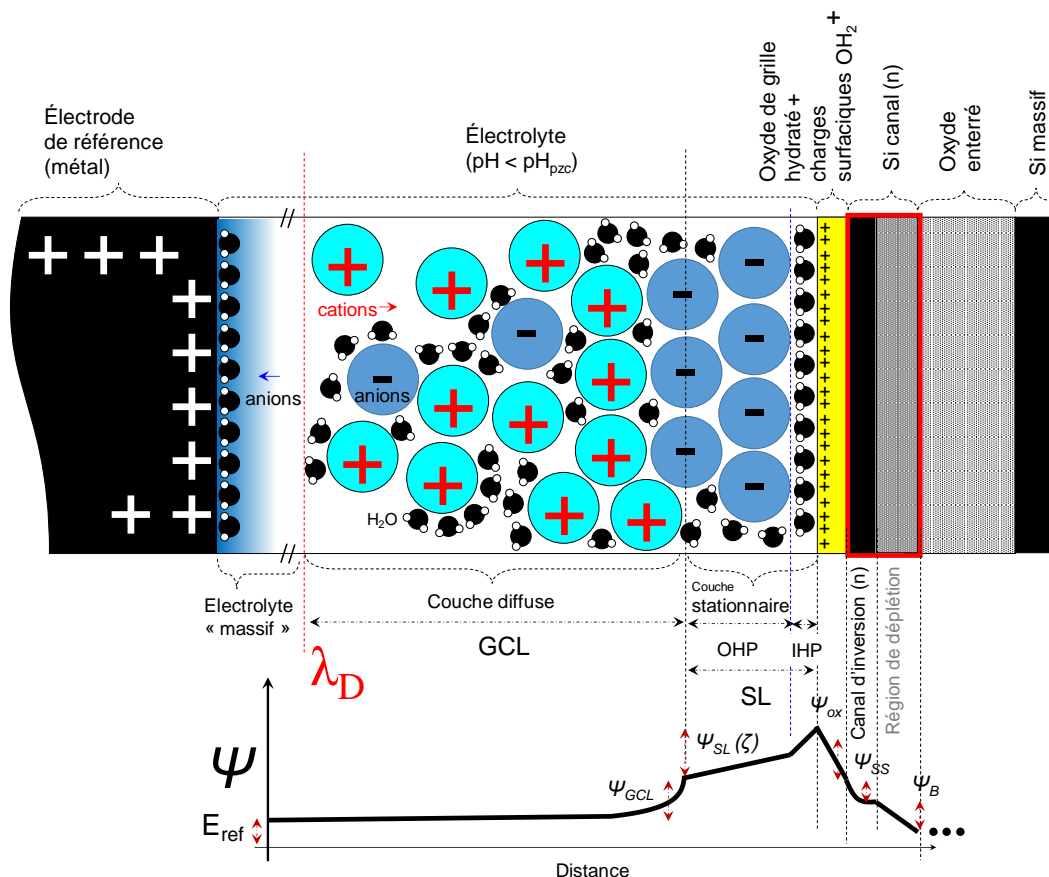


Figure 5. Modèle de la double couche électrique selon la théorie de « Gouy-Chapman-Stern » et profil de potentiel établi dans un système ISFET (de type n) polarisé positivement en face avant par une électrode de référence.

Sur la Figure 5, pH représente le potentiel hydrogène, pH_{pzc} est le pH de neutralité de surface de l'oxyde de grille ⁸⁴, Ψ , le potentiel électrique, E_{ref} le potentiel appliqué sur l'électrode de référence, GCL représente la couche Gouy-Chapman, SL la couche de Stern, OHP le plan externe de Helmholtz,

IHP le plan interne de Helmholtz, ζ est le potentiel zêta, *i.e.*, la différence de potentiel entre la surface de l'oxyde de grille et la couche de contre-ions stationnaires. Ψ_{ox} représente le potentiel des charges fixes de l'oxyde de grille, Ψ_{ss} le potentiel des charges de la couche d'inversion, et Ψ_B le potentiel des charges dépliées.

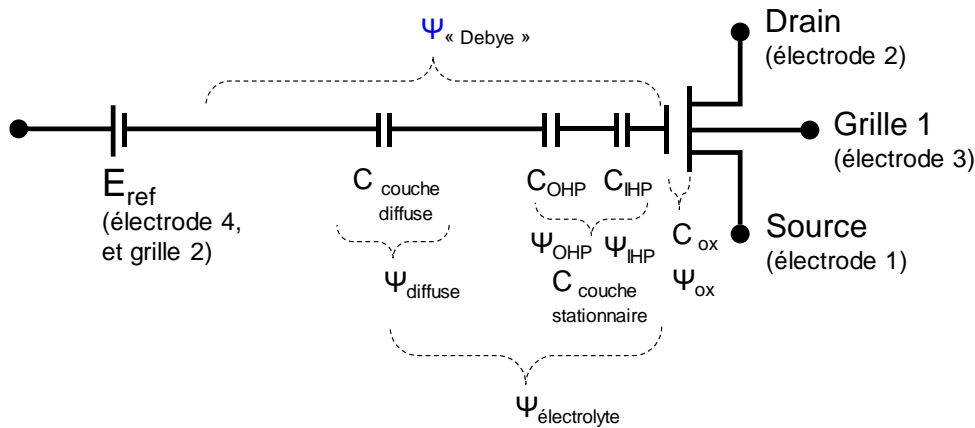


Figure 6. Diagramme d'un ISFET représentant les effets de couplages capacitifs électrostatiques correspondant aux différentes couches d'électrolyte.

À la surface de l'oxyde de grille SiO_2 hydroxylé, les constantes de dissociations associées à la « protonation » ou à la « déprotonation » sont décrites par l'Equation 8 :



Equation 8. Constantes de dissociations K_{Dp} et K_{Dd} des réactions de « protonation » et de « déprotonation » de l'oxyde de grille SiO_2 hydroxylé.

avec a_{HS^+} l'activité (ou la concentration, ou encore la densité) de protons adsorbés sur l'oxyde de grille. Les espèces écrites entre crochets expriment le nombre de sites amphotères surfaciques.

En l'absence de polarisation externe, E_{ref} , Ψ et a_{HS^+} sont liés par l'équation de Boltzmann ⁸⁵,

$$a_{H_S^+} = a_{H_B^+} \exp\left(\frac{-q\Psi}{kT}\right) = pH_s = pH_B + \left(\frac{q\Psi}{2,303 kT}\right)$$

Equation 9. Expression de la densité des charges de surface sur l'oxyde de grille.

L'indice B (*bulk*) du pH représente la concentration de l'électrolyte dans le volume, *i.e.*, au-delà de la longueur de Debye.

La capacité de l'oxyde de grille à capter un proton ou à en libérer un, a pour terme « capacité intrinsèque de tampon ». Elle se note β_{int} , et s'exprime comme :

$$-q\beta_{int} = \frac{\delta\sigma_0}{\delta pH_s}$$

Equation 10. Expression de la capacité amphotérique de l'oxyde de grille.

avec σ_0 la densité de charge de surface de l'oxyde de grille.

Par neutralité entre les charges surfaciques de l'oxyde de grille et la capacité que représente l'électrolyte, on note :

$$\sigma_{el} = -C_{el}\Psi = -\sigma_0$$

Équation 11. Expression reliant le potentiel électrostatique de surface à la densité de charge de surface de l'oxyde de grille.

avec σ_{el} , la densité de charges dans l'électrolyte, et C_{el} , la capacité de l'électrolyte. Cette capacité, notée C_{el} , est dépendante de la valeur de Ψ (potentiel électrostatique établi à la surface de l'oxyde de grille) et peut être alors définie comme étant une capacité différentielle, C_{diff} , *i.e.*, la dérivée de la densité de charge σ_0 (densité de charge de surface de l'oxyde de grille) par rapport à Ψ . L'expression de C_{el} (ou de C_{diff}) est :

$$C_{el} = C_{diff} = \frac{\delta\sigma_0}{\delta\Psi}$$

Équation 12. Expression de la capacité différentielle C_{diff}

La sensibilité de détection ionique (dans le cas de protons) est notée suivant l'**Équation 13** :

$$\frac{\partial\Psi}{\delta pH} = -2,303 \frac{kT}{q} (\alpha)$$

Équation 13. Equation de sensibilité d'un *ISFET* au pH (équation de Nernst).

$$\alpha = \frac{1}{2,303 \frac{kT}{q^2} \frac{C_{diff}}{\beta_{int}}}$$

α est un nombre sans dimension qui est compris entre 0 et 1 ^{55,80,86}. β_{int} est souhaité infini et C_{diff} proche de zéro. β_{int} dépend de la nature du matériau de l'oxyde de grille et C_{diff} dépend de la concentration de l'électrolyte. En pratique, les imperfections de surface de l'oxyde de grille et sa composition chimique, peuvent conduire à des sensibilités inférieures à la sensibilité théorique de la limite de Nernst (~59 mV/pH).

Dans le cas précis des BioFETs, la présence d'espèces biologiques chargées dans le volume d'électrolyte présent à l'interface oxyde de grille/ électrolyte, contribu au potentiel électrostatique total s'appliquant sur l'oxyde de grille (combinaison des potentiels de l'électrode de référence, de l'électrolyte, et des charges « biologiques »).

La part de variation du potentiel électrostatique liée spécifiquement aux espèces biologiques induit une variation de conductance (pente d'accroissement de courant pour une même différence de potentiel de polarisation du canal) et de tension de seuil du BioFET, conduisant à un décalage de la caractéristique électrique du BioFET.

Ce décalage peut être noté comme étant un pourcentage de variation qui dépend de la quantité de charges biologiques et également des dimensions du canal suivant l'expression de l'**Equation 14** ⁸⁷ :

$$S = \frac{G - G_0}{G_0} = \frac{\Delta G}{G_0}$$

Équation 14. Equation de la réponse d'un *BioFET* dans le régime linéaire de fonctionnement.

avec S la sensibilité, G la conductance induite par l'espèce biologique, et G_0 la conductance nominale en l'absence de l'espèce biologique,

$$G_0 = \frac{q \mu N_D \pi d^2}{4 L_n}$$

Équation 15. Expression de G_0 pour un nanofil cylindrique.

avec q la charge électronique, μ la mobilité des porteurs, N_D le dopage du canal, d le diamètre du nanofil, et L_n , la longueur du nanofil.

$$\Delta G = \frac{\mu \sigma \pi d}{L_n}$$

Équation 16. Expression de ΔG dans le cas d'un canal cylindrique.

avec σ la densité de charges adsorbée sur l'oxyde de grille.

En considérant que les charges portées par les espèces biologiques sondées se confondent avec les charges surfaciques de l'oxyde de grille, la sensibilité du BioFET à nanofil cylindrique dépend directement du diamètre du canal et s'exprime suivant l'**Equation 17** :

$$S = \frac{4 \sigma}{q d N_D}$$

Équation 17. Expression de la réponse d'un BioFET à nanofil de silicium pour une densité de charge de surface σ présente à l'interface électrolyte/ oxyde de grille.

On peut noter que la sensibilité sera d'autant meilleure que le diamètre du nanofil sera réduit ⁶⁶.

1.2.3. Revue des travaux académiques

1.2.3.1. Détection de molécules d'intérêt à partir de *BioFETs* à nanofils de Si

Le concept qui a consisté à substituer la grille métallique du *MOSFET* par une grille liquide afin de sonder la concentration en charges et le pH de ce liquide (*i.e.*, électrolyte) est introduit par Bergveld en 1970⁵⁸. Le principe de fonctionnement de ce nouveau dispositif lui fait prendre l'appellation d'*ISFET*. De nos jours, soit environ une cinquantaine d'années plus tard, les *ISFETs* se sont diversifiés et perfectionnés, aussi bien dans leurs architectures que dans leurs applications^{5,88-90}. Les préfixes « *IS* », « *Bio* », « *Chem* », « *Gas* », font allusion au type d'analyte d'intérêt sondé par le « transistor ». Dans cette partie, nous établissons un état de l'art non exhaustif des applications adressées par les *BioFETs* à nanofils de Si. Le terme *BioFET(s)* fera allusion aux capteurs chimiques et biologiques basés sur des transistors à effet de champ, indépendamment de la nature de l'analyte.

Les avancées de la nanoélectronique ont permis de réduire considérablement les dimensions des *BioFETs*, de maîtriser leur structures et leurs caractéristiques, avant de les intégrer densément dans des systèmes de mesures multiplexes^{91,92}. Les nanofils de Si sont fabriqués suivant deux technologies identifiées comme étant les technologies de croissance (*bottom-up*)^{92,93} et les technologies de gravure (*top-down*)^{94,95}.

À l'échelle nanométrique, les effets de rapports « surface/ volume », les effets de bord, les effets de confinement électronique, les effets quantiques influencent significativement les propriétés électroniques des nanofils (effets de charges, conductance).

L'utilisation des *BioFETs* à nanofils de Si a permis d'optimiser les performances de sensibilité, de spécificité⁹⁶, et de temps de réponse de détection des analytes d'intérêt^{51,97}.

La compatibilité des dimensions entre les nanofils et les molécules d'intérêt justifie également leur utilisation et leur démocratisation en tant que transducteur de signaux.

Les *BioFETs* à nanofils de Si ont été utilisés dans diverses applications⁹⁸. Nous pouvons en citer quelques-unes. En 2004, Lieber et al. (Harvard) utilisent des nanofils de Si pour détecter des molécules d'ADN à une concentration de 10 fM⁹⁹. Li et al. des laboratoires Hewlett-Packard mesurent les changements de conductance de nanofils pour détecter des molécules d'ADN de 12 nucléotides, concentrées à 25 pM¹⁰⁰. En 2006, Bunimovich et al. ont développé un *BioFET* à réseau de nanofils de Si (jusqu'à 400 nanofils par dispositif) pour la détection en temps réel de molécules d'ADN (16 nucléotides) avec une limite de détection de 10 pM¹⁰¹. En 2013, Huang et al. ont démontré la mesure de 10 fM de molécules d'ADN appartenant au virus de l'Hépatite B et de 3,2 pM de protéines (troponine cardiaque I). Le système utilisé est un *BioFET* à nanofil de polysilicium intégré sur une puce CMOS de mesure et de traitement de signal, communiquant les mesures d'analyses « sans fil » vers un ordinateur¹⁰². En 2014, Voitsekhivska et al. démontrent la réalisation de mesures multiplexes en temps réel sur des *BioFETs* à nanofils de Si organisés en réseaux et en matrices et intégrés dans un système de mesure et de traitement de signal¹⁰³. En 2015, Livi et al. ont démontré la détection d'1 nM d'une protéine « biomarqueur » d'infarctus du myocarde, sur une puce de *BioFETs* à nanofils de Si intégrée à un module de mesure et de traitement du signal CMOS pilotant et mesurant indépendamment 16 *BioFETs*^{104,105}. En 2016, Tran et al. démontrent leur capacité à détecter en moins d'une heure, de faibles concentrations de biomarqueurs tumoraux (cytokératine 19, à 80 fM, et ~0,01 cellule tumorale/mL de lysat sanguin), pour le pronostic et le diagnostic peu onéreux d'état cancéreux chez le patient ayant peu de ressources financières (lorsque les soins sont à la charge directe du patient). Leur instrument est une

puce de 4 BioFETs indépendants, à réseaux de nanofils de Si, intégré dans un système d'amplification du signal ¹⁰⁶.

Les publications qui démontrent d'excellentes performances de BioFETs à nanofils sont nombreuses et leur fort potentiel en tant que dispositif au cœur des systèmes de diagnostic de la prochaine génération n'est plus à démontrer ¹⁰⁷.

1.2.3.2. Limitations des *BioFETs* à nanofils de Si

La grande majorité des travaux mentionnant la fabrication de BioFETs à nanofils de Si sont orientés vers la présentation de leurs performances, et notamment, vers la présentation de leur limite de détection. Dans l'écrasante majorité des cas, ces dispositifs ne sont encore qu'au stade de prototype et fonctionnent dans des environnements où ils sont câblés à des bancs de mesures nécessitant plusieurs stations de mesure et de traitement du signal d'analyse. La fabrication à grande échelle de ces dispositifs est à nos jours encore très coûteuse et la reproductibilité de fabrication des BioFETs (variations de l'épaisseur de l'oxyde de grille, variations dans les procédés de fonctionnalisation de surface) ¹⁰⁸, ainsi que la variabilité des mesures analytiques sont des volets qui sont encore très peu abordés ¹⁰⁹. Pour répondre aux besoins de dispositifs autonomes de diagnostic fiable, les BioFETs à nanofils devront évoluer vers des « systèmes autonomes » d'analyses multiplexes et de communication de résultats d'analyses, facilement interprétables par l'utilisateur, avec une fiabilité s'approchant de celle des laboratoires spécialisés.

1.3. Notre positionnement par rapport à l'état de l'art.

La question de la maturité des technologies de fabrication des BioFETs ainsi que de la reproductibilité des mesures est un volet d'amélioration qui reste en suspens. Dans le cadre de cette thèse, nous avons travaillé sur des premiers éléments de réponse en développant une filière de fabrication entièrement compatible avec les technologies CMOS. Ces méthodes de fabrication permettent d'optimiser la reproductibilité de fabrication.

En termes de procédés, nous nous sommes appuyés sur des filières standards de fabrication, mises en œuvre avec tout le savoir-faire des équipes LETI travaillant en salle blanche. Plusieurs dizaines de plaques SOI ont été utilisées dans l'objectif de mettre en place une route pour la fabrication de BioFETs à grande échelle. L'intérêt de la compatibilité de nos procédés de fabrication avec celui des modules CMOS réside dans l'option que nous aurons par la suite à intégrer nos puces sur des systèmes CMOS permettant la mesure et le traitement des signaux d'analyse (filtrage, amplification, communication, etc.).

En termes d'application, des structures BioFETs de dimensions variables (nanofils unitaires, réseaux de nanofils, structures en ruche d'abeilles, nanorubans, doigts interdigités) nous permettent de pouvoir mener des études comparatives suivant la structure du dispositif. L'intégration de BioFETs identiques organisés en matrice permet aussi de pouvoir mener des expérimentations de reproductibilité de mesures (variabilité intra et inter-puces), ou de mener des expérimentations sur la détection multiplexée, intéressante lorsque la détection de plusieurs biomarqueurs est nécessaire à la fiabilité d'une seule analyse.

Nos travaux sont concentrés sur la proposition d'une puce de plusieurs centaines de BioFETs (410) avec plusieurs motifs, ainsi qu'une adaptabilité à la technologie CMOS, qui l'inscrit dans les dispositifs qui remplissent plusieurs critères centraux pour être au cœur des systèmes de diagnostics médicaux de la prochaine génération².

Les performances électriques de nos BioFETs ont été évaluées suivant (i) des mesures de pH, (ii) la détection d'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires, et (iii) la détection d'une protéine grâce à la fonctionnalisation de nos BioFETs par des aptamères. Le prototype d'un système microfluidique constitué de trois canaux a également été fabriqué dans une optique de réalisation de mesures chimiques et biologiques en temps réel et multiplexées.

2. Chapitre 2 : Développement technologique des biocapteurs à nanofils de Si

2.1. Etapes technologiques de fabrication des biocapteurs à nanofils de Si

2.1.1. Description de notre puce

Nos dispositifs BioFETs sont fabriqués à partir de substrats de type SOI (*silicon-on-insulator*, fournis par SOITEC, France), avec des procédés utilisés pour la fabrication des technologies CMOS. Cette particularité nous permet de pouvoir envisager une co-intégration BioFET/CMOS au sein d'une même puce pour intégrer à la fois la mesure et le traitement du signal (permettant par exemple d'augmenter le rapport signal sur bruit (intégration d'amplificateurs à gains programmables, de filtres, etc.).

Les BioFETs développés dans nos travaux ont nécessité le dessin d'un nouveau jeu de masques spécifique à notre projet. Chaque puce s'organise en deux zones (**Figure 7**, *accolade jaune et blanche*).

Dans la première zone appelée région « matrice », nous avons dessiné une matrice (10×10) comportant 100 puits micro-fluidiques. A l'intérieur de chaque puits nous trouvons deux dispositifs BioFETs différents (**Figure 8, D1 et D2**). Ainsi nous pouvons disposer de deux fois 100 dispositifs BioFETs, tous identiques, permettant une analyse de la variabilité intra-et-inter-puces sur une même plaque.

La seconde zone est constituée de 12 autres barrettes de transistors avec des motifs variables. Chaque motif est désigné par une lettre, soit : F, M, N, O, P, Q, R, T, W, X, Y, et Z. Chacune de ces 12 barrettes centralise un groupe de transistors (nanofil unitaire, réseau de nanofils, nanorubans, structures en ruches d'abeille, doigts inter-digités) de dimensions variables.

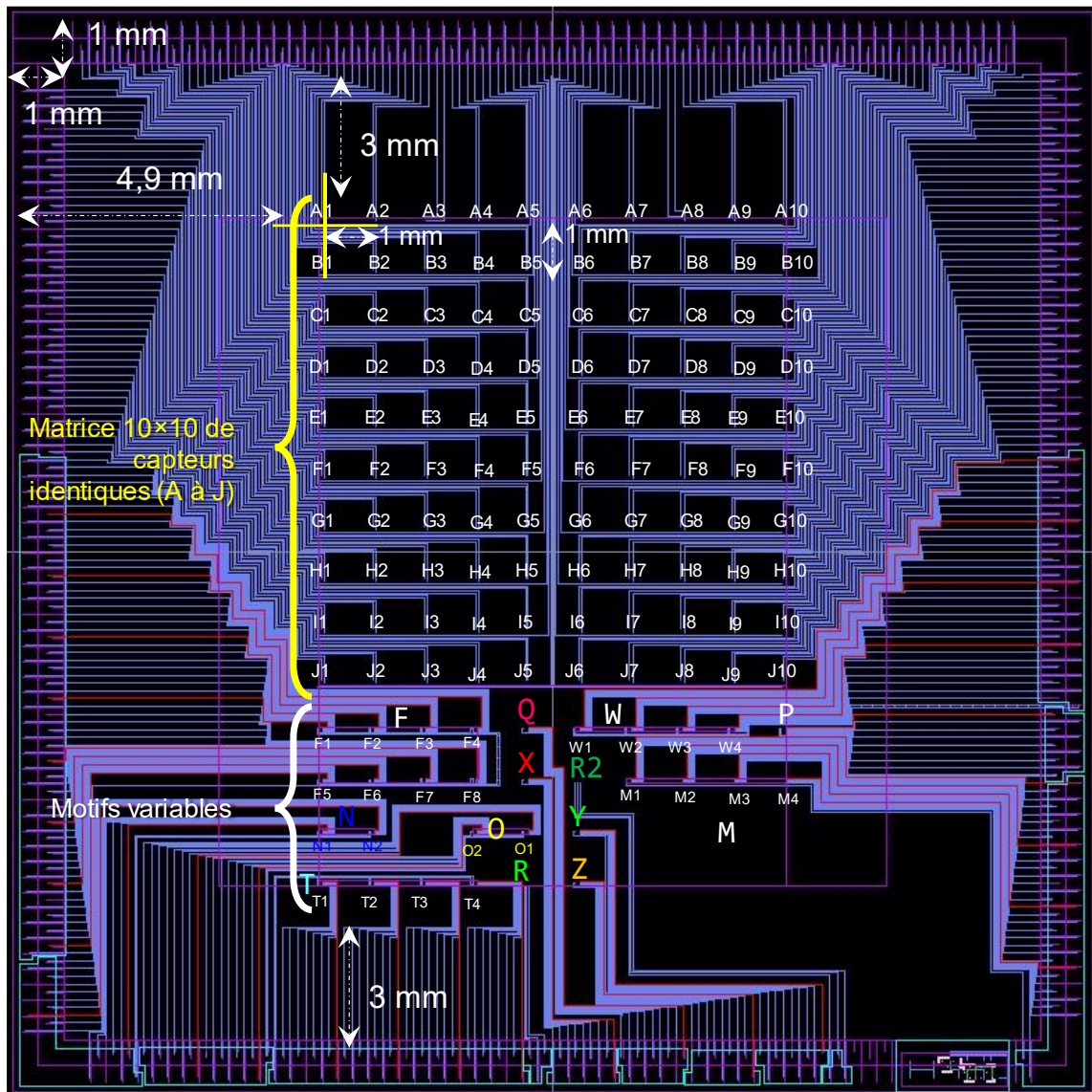


Figure 7. Plan d'une puce mesurant 22 mm x 22 mm de côtés et comprenant 410 biocapteurs indépendants dont 200 sont des BioFETs identiques appartenant à une région dite « matrice ». Les autres BioFETs ont des motifs moins conventionnels (tels que des motifs en ruches d'abeille, des doigts interdigités, etc.) de dimensions variables, destinées à des études comparatives.

2.1.1.1. Région « matrice »

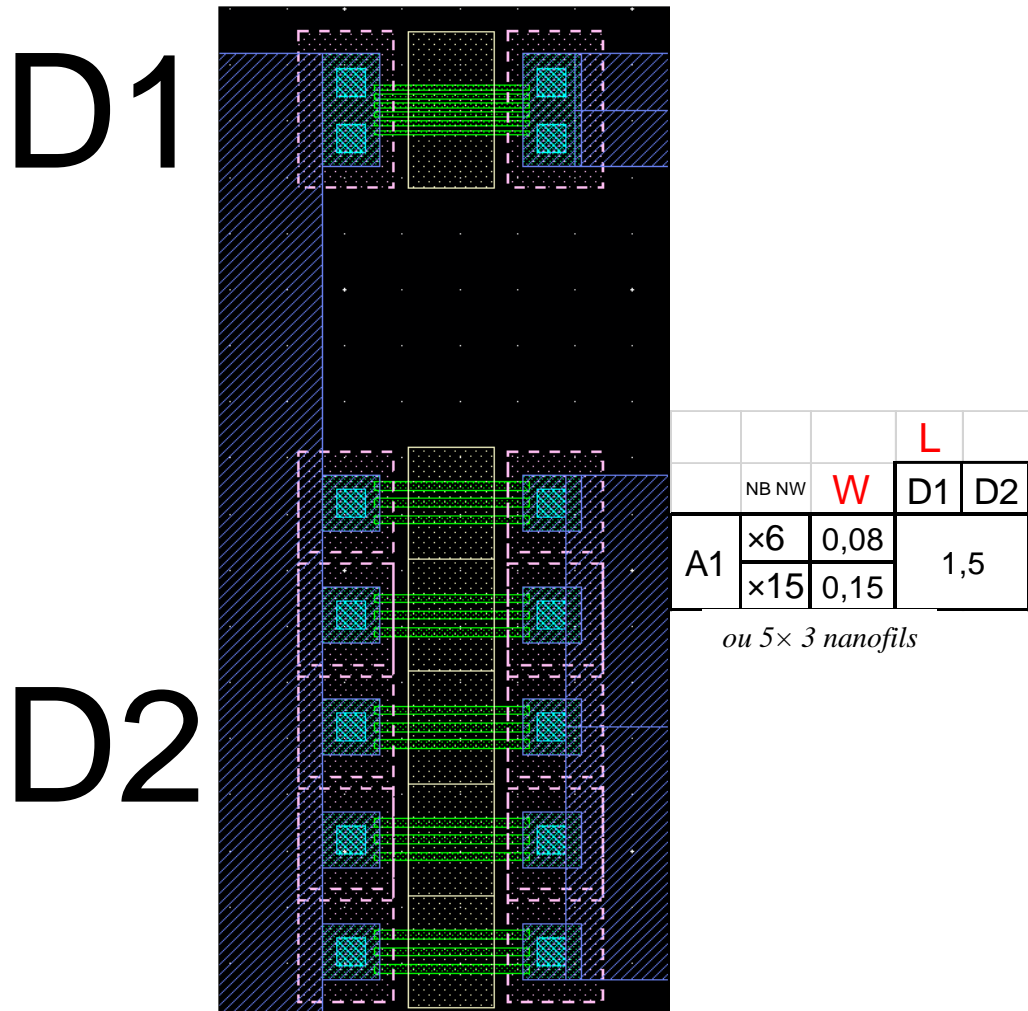
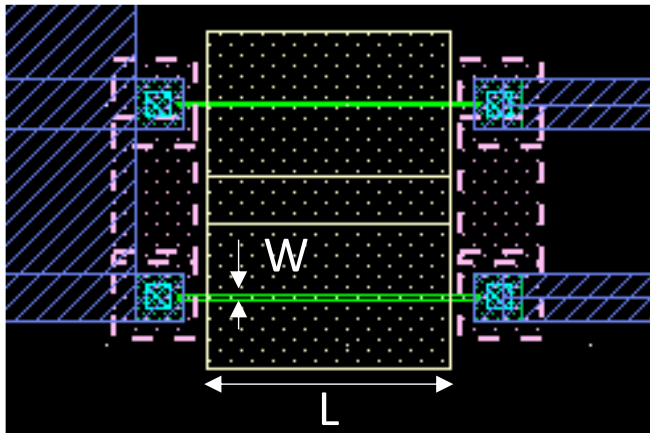


Figure 8. Motifs et dimensions (en μm) des BioFETs de la région « matrice ». W représente la largeur des fils et L la longueur de la cavité microfluidique. Le niveau métallique est représenté en violet. Les contacts sont représentés en turquoise. Les régions actives (nanofils de silicium) sont représentées en vert, et les cavités d’approvisionnement des nanofils en électrolyte (solution pH ou autres) sont représentées par des rectangles à bordures beiges.

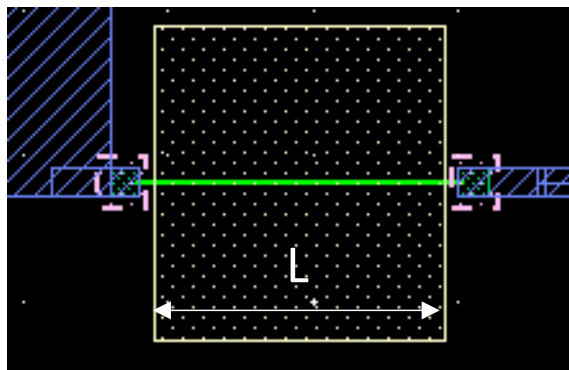
2.1.1.2. Région de motifs variables

F scribe



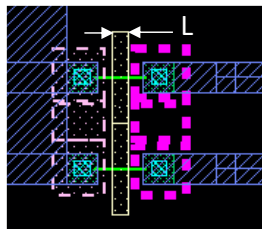
		L							
	W	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
F1	0,05	0,2	0,5	1	5				
F2	0,1								
F3	0,25								
F4	0,5								
F5	1								
F6	2								
F7	5								
F8	10								

M scribe



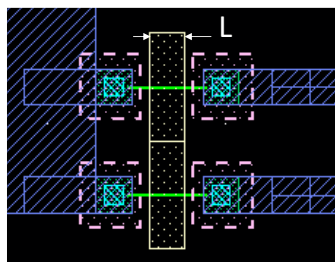
		L							
	W	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
M1	0,1	0,2	0,5	1	2	4	5	8	10
M2	0,2								
M3	0,5								
M4	1								

P scribe



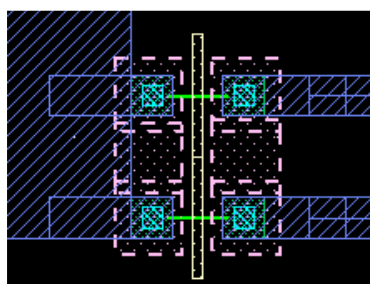
		L							
	W	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
P	0,05	0,2	0,25	0,3	0,5				

N scribe



		L							
	W	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
N1	0,05	0,2							
N2		0,3	0,4	0,5	1				

O scribe



		L							
	W	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
O1	0,05	0,2							
O2		0,25							

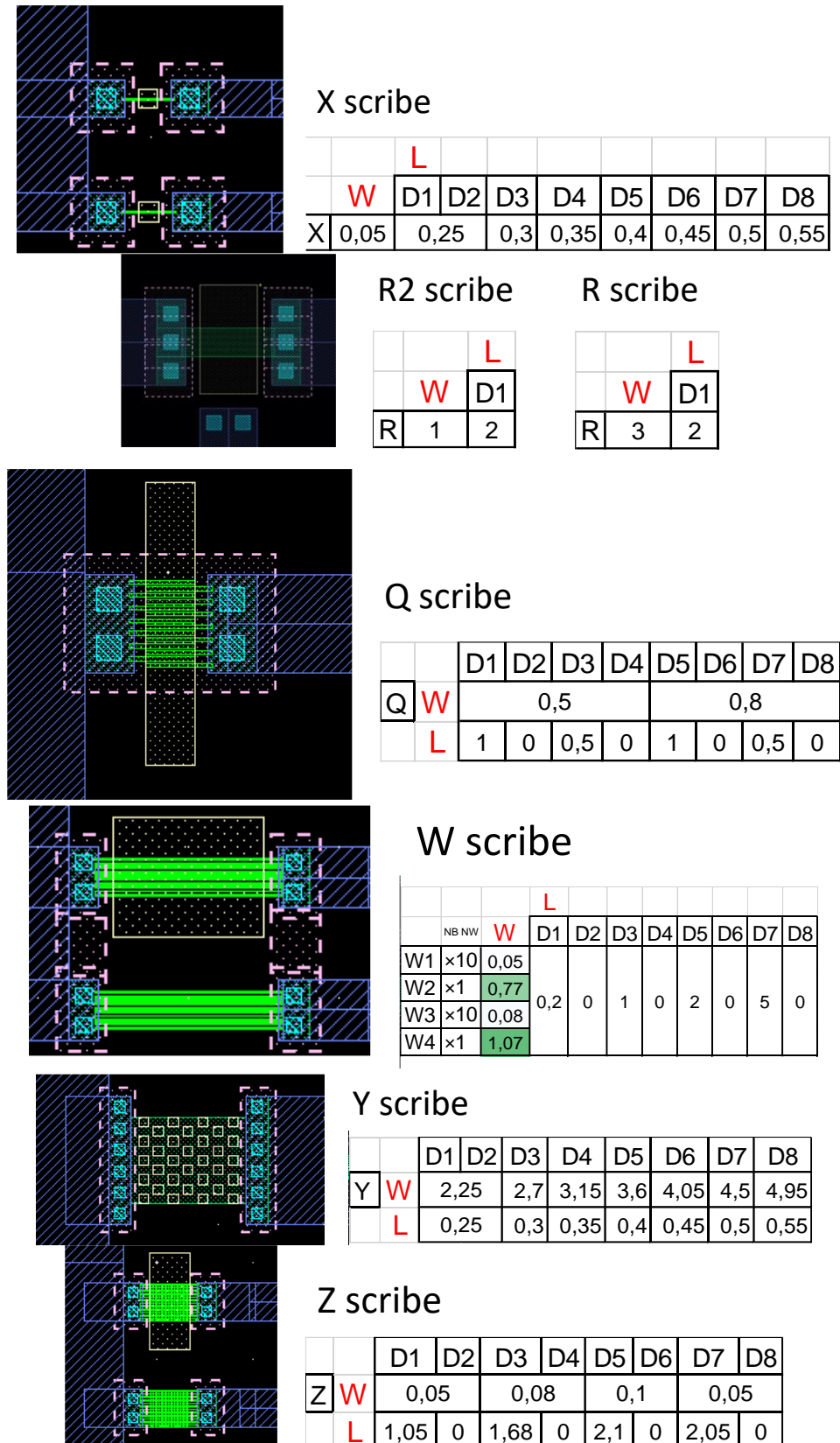


Figure 9. Exemples de motifs de dispositifs BioFET (**W** représente la largeur des nanofils et **L** la longueur de la cavité microfluidique)

Les **Figures 8** et **9** présentent les différents motifs de BioFETs que nous avons dessinés. A titre d'exemple, pour la barrette M, la largeur des fils unitaires varie de 0,1 à 1 μm .

Chapitre 2 : Développement technologique des biocapteurs à nanofils de Si | Etapes technologiques de fabrication des biocapteurs à nanofils de Si | Principales étapes de fabrication

La barrette W est constituée de microrubans de Si et de réseaux de nanofils. La barrette Z regroupe des transistors à motif en forme de ruche d'abeille avec un maillage de dimensions variables.

Chaque barrette possède une source commune et autant de drains que de dispositifs pour qu'ils puissent être caractérisés indépendamment les uns des autres. Notre large panel de motifs et de dimensions nous a permis de mener des études comparatives de sensibilité au pH.

Une puce unitaire sur laquelle sont gravés ces transistors multistructuraux est conçue pour recevoir un système microfluidique d'approvisionnement d'échantillon en flux permettant des analyses en temps réel. Pour faciliter l'intégration du système microfluidique, les dispositifs sont tous positionnés au centre de la puce, et ont leurs plots de contacts respectifs, décentrés sur les bords de la puce.

Dans la région dite « matrice », chaque duo de BioFETs à réseau de nanofils (D1 et D2) est séparé de ses voisins d'une distance d'un millimètre, permettant un espacement suffisamment important pour le passage de canaux microfluidiques d'approvisionnement. Une cavité (de dimension adaptée proche de la dimension du dispositif) est également ouverte sur chaque dispositif, afin d'en exposer son oxyde de grille à l'échantillon analysé (tampon pH, électrolyte contenant des molécules d'ADN cible, électrolyte contenant des protéines). La région « matrice » peut également être le siège de mesures faites en parallèle pour différents analytes (mesures multiplexées).

2.1.2. Principales étapes de fabrication

L'utilisation de ces masques de photolithographie, associée aux différentes étapes de fabrication, nous ont permis de graver avec succès des structures nanométriques mesurant jusqu'à seulement 30 nm de largeur. Les travaux sont réalisés dans les salles blanches du LETI par des opérateurs experts sur les différents robots de fabrication utilisés. Les différents procédés de fabrication de nos BioFETs sont régulièrement suivis par nos soins en salle blanche (étapes de caractérisations morphologiques) et succinctement illustrés dans cette partie.

Les plaques SOI utilisées mesurent 200 mm de diamètre avec une épaisseur de Si de 725 μm . L'empilement des couches est constitué de quelques nanomètres d'oxyde de silicium natif (~0,5 nm), 70 nm de silicium monocristallin, 145 nm d'oxyde de silicium enterré (*BOX*, *buried oxide*), et une couche de silicium massif de 725 μm .

Après une série de nettoyage des faces de la plaque de Si, la couche de « Si monocristallin » est amincie à l'épaisseur ciblée ($6 \text{ nm} \leq \text{Epaisseur Si monocristallin} \leq 30 \text{ nm}$) par une série alternée d'oxydations thermiques et de désoxydations chimiques (à base de fluorure d'hydrogène).

L'amincissement du film de Si est suivi d'une étape de lithographie et de gravure des marques d'alignement permettant par la suite d'aligner l'ensemble des niveaux lithographiques.

Les différents motifs de canaux (nanofils, réseaux de nanofils, etc., dont deux exemples figurent en **Figure 10**) sont ensuite réalisés par photolithographie et gravure suivant les étapes de fabrication suivantes :

1. Dépôt conforme d'une résine sur la surface du substrat et détournage. La résine adhère au substrat à l'aide d'un intermédiaire chimique. Brève cuisson de la résine. Les solvants et l'eau contenus dans la résine s'évaporent, la résine se densifie.
2. Alignement du substrat et insolation de la résine photosensible via des ondes ultraviolettes qui passent au travers d'un système optique complexe (« stepper »), contenant le niveau de masque de projection correspondant aux motifs spécifiques à retranscrire dans la résine. La résine insolée aux UVs est rendue *de facto* sensible à « l'effacement » sous l'action d'un réactif chimique spécifique (résine dite « positive »). Ce réactif peut être une solution

Chapitre 2 : Développement technologique des biocapteurs à nanofils de Si | Etapes technologiques de fabrication des biocapteurs à nanofils de Si | Principales étapes de fabrication

chimique ou un plasma énergétique. Dans notre cas, nous avons utilisé une lithographie hybride (DUV pour les plus gros motifs et e-beam pour les motifs de dimensions <300nm).

3. Révélation des motifs : la résine insolée est gravée jusqu'à l'oxyde de silicium.
4. La gravure des motifs transférés dans une fine couche de SiO₂ puis dans le Si monocristallin est faite en gravure sèche.
5. La résine sacrificielle de masquage du substrat est ensuite éliminée (*stripping*). Les différentes structures de canaux de silicium monocristallin peuvent être observées et mesurées.

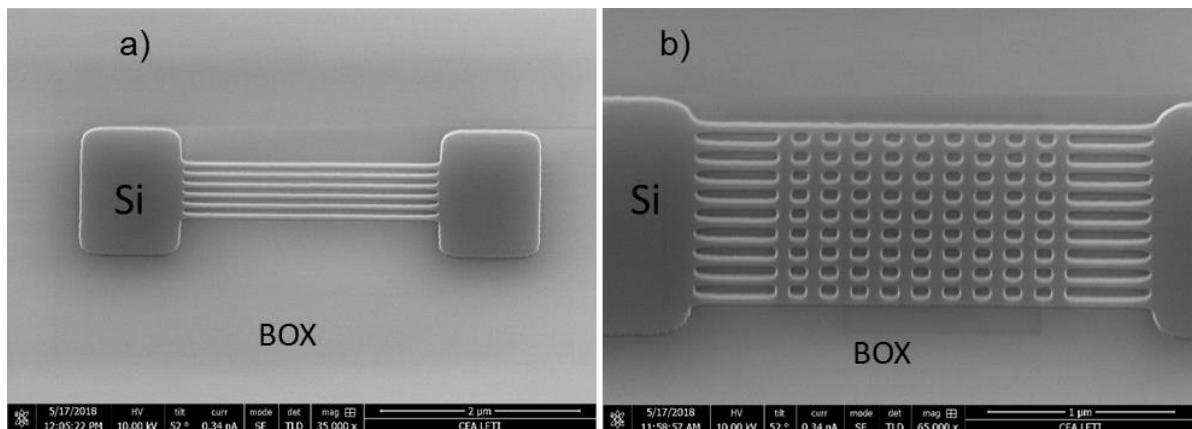


Figure 10. Exemple de deux motifs de canaux à nanofils de Si obtenus après gravure. a) réseau de 6 nanofils (dispositif D1), b) structure dite en ruche d'abeille (dispositif Z).

Ensuite, un niveau de masque spécifique d'implantation permet de doper uniquement les régions source et drain des dispositifs suivant plusieurs sessions d'implantations ioniques.

- Phosphore $1,5 \times 10^{15}$ atomes/ cm², énergie d'implantation de 4 KeV
- Arsenic, 2×10^{15} atomes/ cm², à 9 KeV,
- Phosphore, 10^{15} atomes/ cm², 3 KeV,
- Bore, $1,8 \times 10^{15}$ atomes/ cm², à 3 KeV,
- Béryllium difluoride, 2×10^{15} atomes/ cm², à 8 KeV.

Les canaux restent non intentionnellement dopés. Les dopants des régions source et drain sont activés en utilisant un recuit d'activation « *spike* ».

Après la formation des régions source et drain, une couche d'oxyde d'hafnium (HfO₂) de 2 à 3 nm d'épaisseur est déposée par ALD. Le HfO₂ est un diélectrique à forte permittivité (variant entre 17 et 25), en comparaison à la permittivité de l'oxyde de silicium SiO₂ (3,9).

Ces couches sont ensuite encapsulées sous une faible épaisseur de nitrure (SiN ~50 nm), et le nitrure est encapsulé sous un oxyde TEOS (*Tetraethyl orthosilicate*) de 100 nm (dépôt PECVD, *Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition*) comme illustré sur la [Figure 11](#).

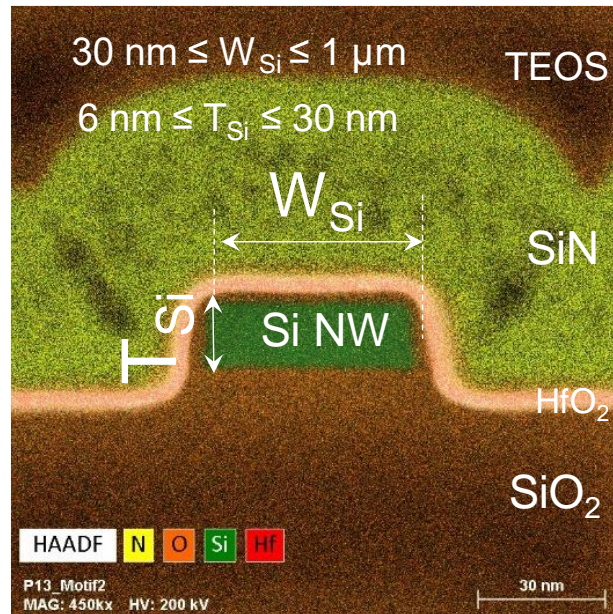


Figure 11. Micrographie EDX d'une section de nanofil de Si

Une *CMP* (*chemical mechanical planarization*) permet de planariser la couche d'oxyde TEOS.

Après cette étape de planarisation, nous procédons à l'étape de gravure des contacts. Cette étape consiste à graver des cavités verticales au-dessus des régions de source et drain de manière à pouvoir connecter ces régions source/drain aux futures lignes métalliques (**Figure 12**). Après une étape de lithographie, nous avons procédé à la gravure de la couches TEOS, puis de nitrure, suivi de la couche HfO₂, et enfin, de la couche de SiO₂, en ayant pour couche d'arrêt le film de Si sous-jacent. La résine sacrificielle est éluée après les étapes de gravures successives.

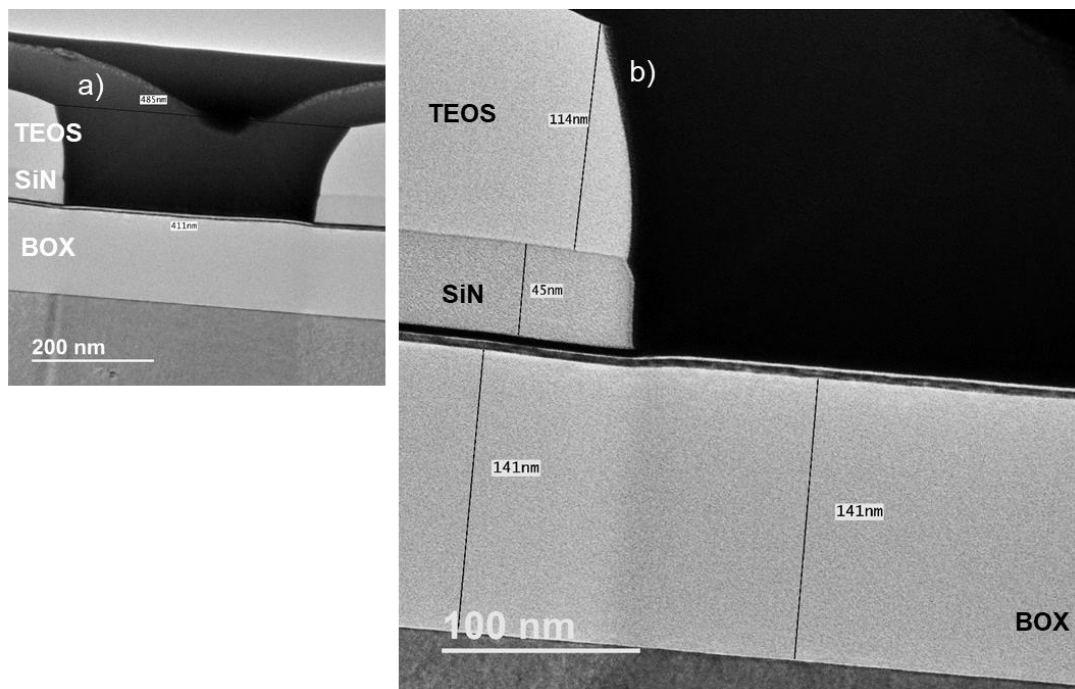


Figure 12. Micrographie TEM de gravure des contacts.

Chapitre 2 : Développement technologique des biocapteurs à nanofils de Si | Etapes technologiques de fabrication des biocapteurs à nanofils de Si | Principales étapes de fabrication

L'étape suivante consiste à réaliser un siliciure NiSi en fond de contacts. Le siliciure permet d'obtenir une faible résistance de contact entre le Si et la couche métallique. Ces cavités (ou *plugs*) sont ensuite remplies avec une couche TiN et une couche de tungstène (350 nm).

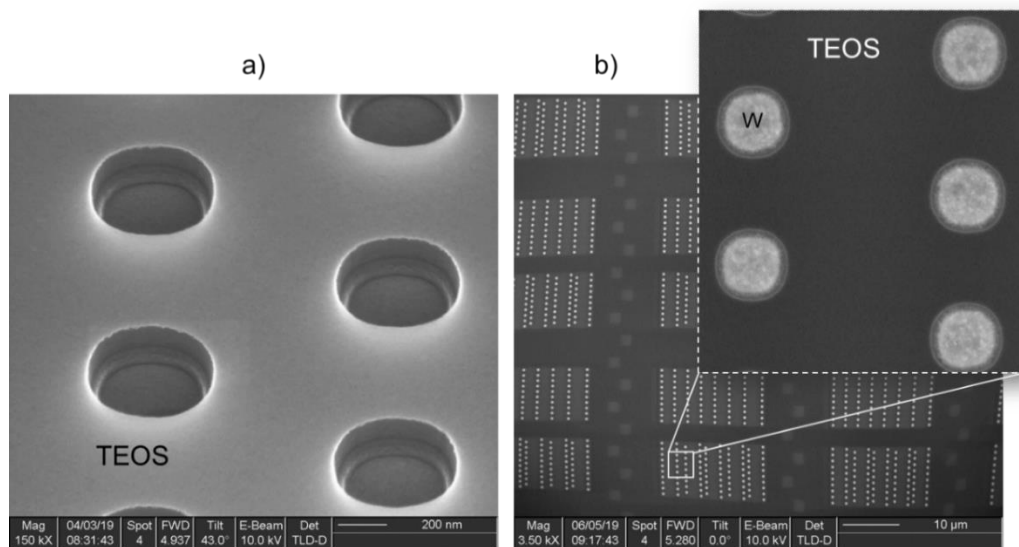


Figure 13. Micrographie MEB de régions de contacts. a) régions de contacts gravés et siliciurés, b) régions de contacts après dépôt de tungstène et planarisation.

Suite à ces dépôts, nous procédons à une *planarisation de la couche de W* qui permet de désolidariser et donc de « dé-courcircuiter » les différents contacts (Figure 13). Puis de nouvelles étapes de lithographie et de gravure (Figures 13 et 14) sont réalisées afin de définir les lignes métalliques (alliage de Cu et d'Aluminium).

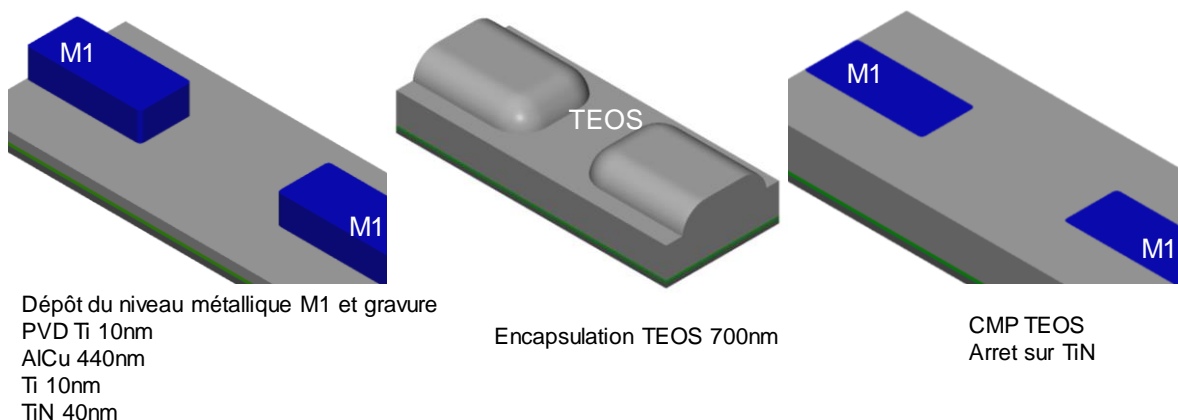


Figure 14. Illustration de l'étape de fabrication du niveau de métal 1 (M1, couleur bleue).

Ces structures sont ensuite encapsulées sous 700nm d'oxyde TEOS (*PECVD*) suivi d'une nouvelle planarisation (avec arrêt sur la couche métallique). En périphérie des puces, une couche d'oxyde d'isolation et de protection est gravée uniquement sur les régions des plots de contacts de manière à pouvoir poser les pointes lors de la caractérisation électrique des dispositifs.

Chapitre 2 : Développement technologique des biocapteurs à nanofils de Si | Etapes technologiques de fabrication des biocapteurs à nanofils de Si | Principales étapes de fabrication

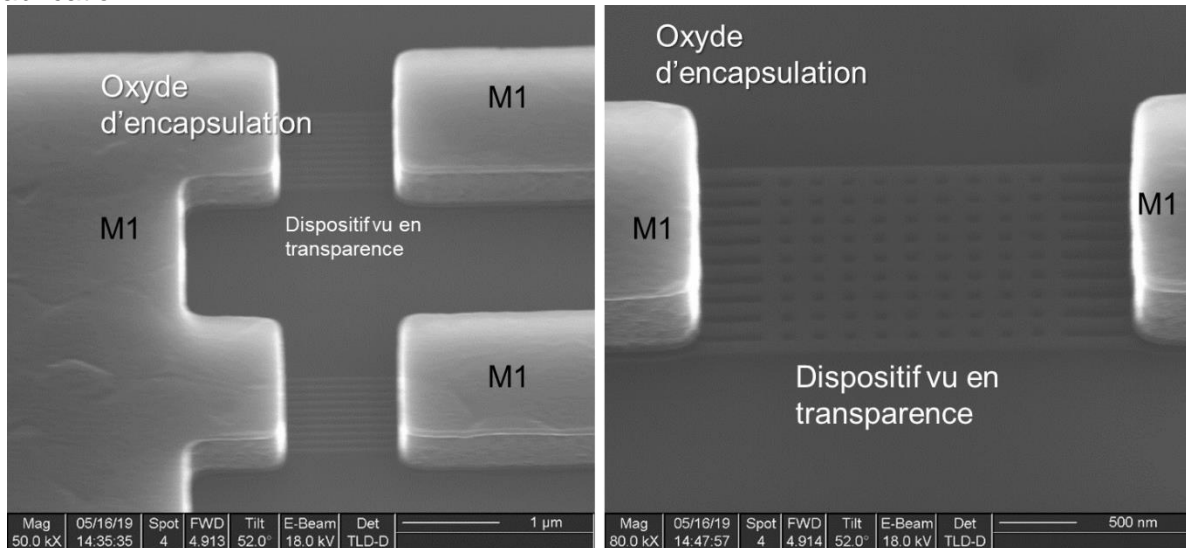
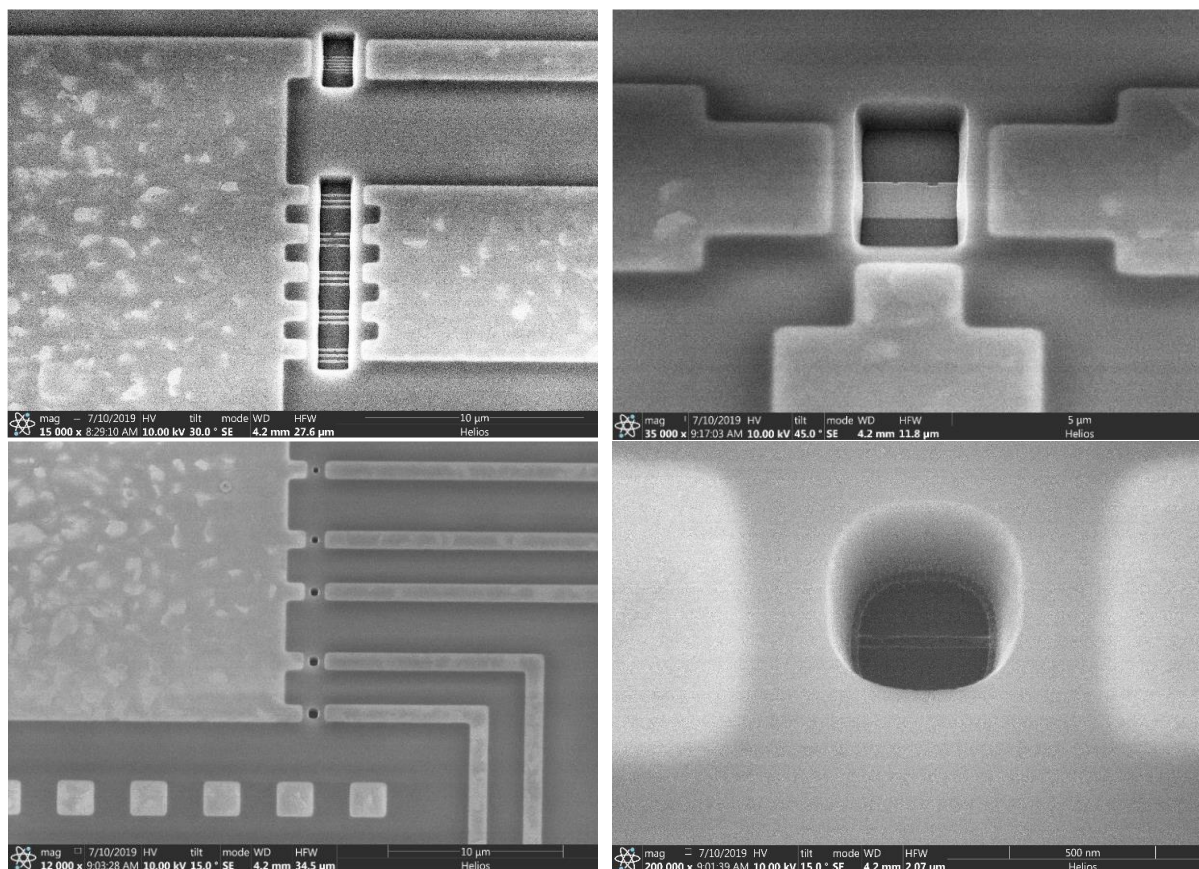


Figure 15. Micrographies MEB de dispositifs encapsulés sous un oxyde TEOS (dispositif à motif de réseau de nanofils de Si (gauche) et dispositif à motif de ruche d'abeille (droite).

La dernière étape est l'étape la plus critique des étapes de fabrication. Elle consiste à graver les couches d'oxyde et de nitrure disposées au-dessus des nanofils de Si dans le but de former les cavités microfluidiques, au-dessus de l'oxyde de grille HfO_2 des dispositifs. Pour cela, un niveau de masque spécifique est utilisé. Quelques micrographies MEB de BioFETs finalisés sont présentées sur la [Figure 16](#) après l'ouverture des cavités microfluidiques.



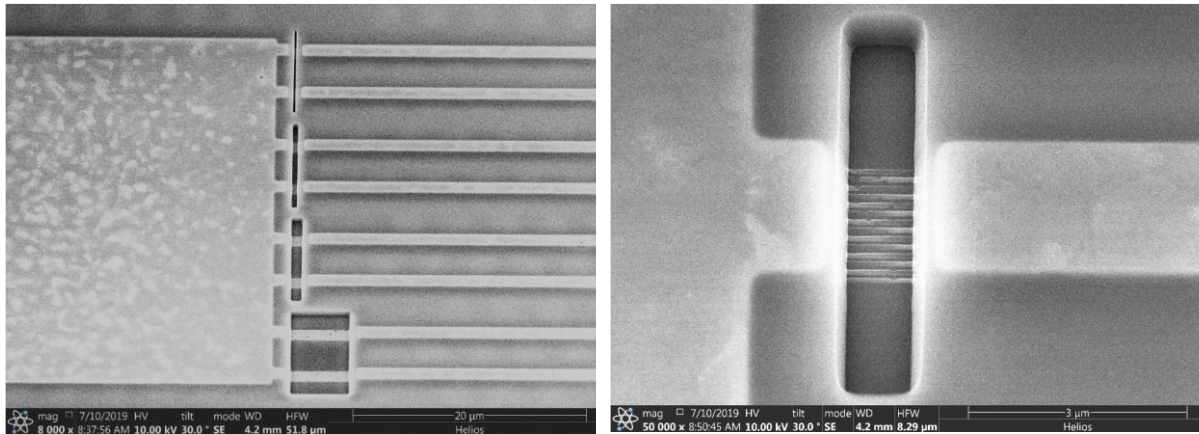


Figure 16. Micrographies MEB de quelques dispositifs BioFETs après ouverture des cavités microfluidiques. Des étapes de gravure de cavités nous permettent d'ouvrir un accès direct aux différentes structures de nanofils et de microrubans fabriqués. Ces structures peuvent être observées sur les différentes micrographies présentées. Les larges structures qui sont gravées au contact des nanofils sont des lignes métalliques d'alimentation. Certains dispositifs peuvent avoir des sources communes.

2.1.3. Photographie des biopuces fabriquées

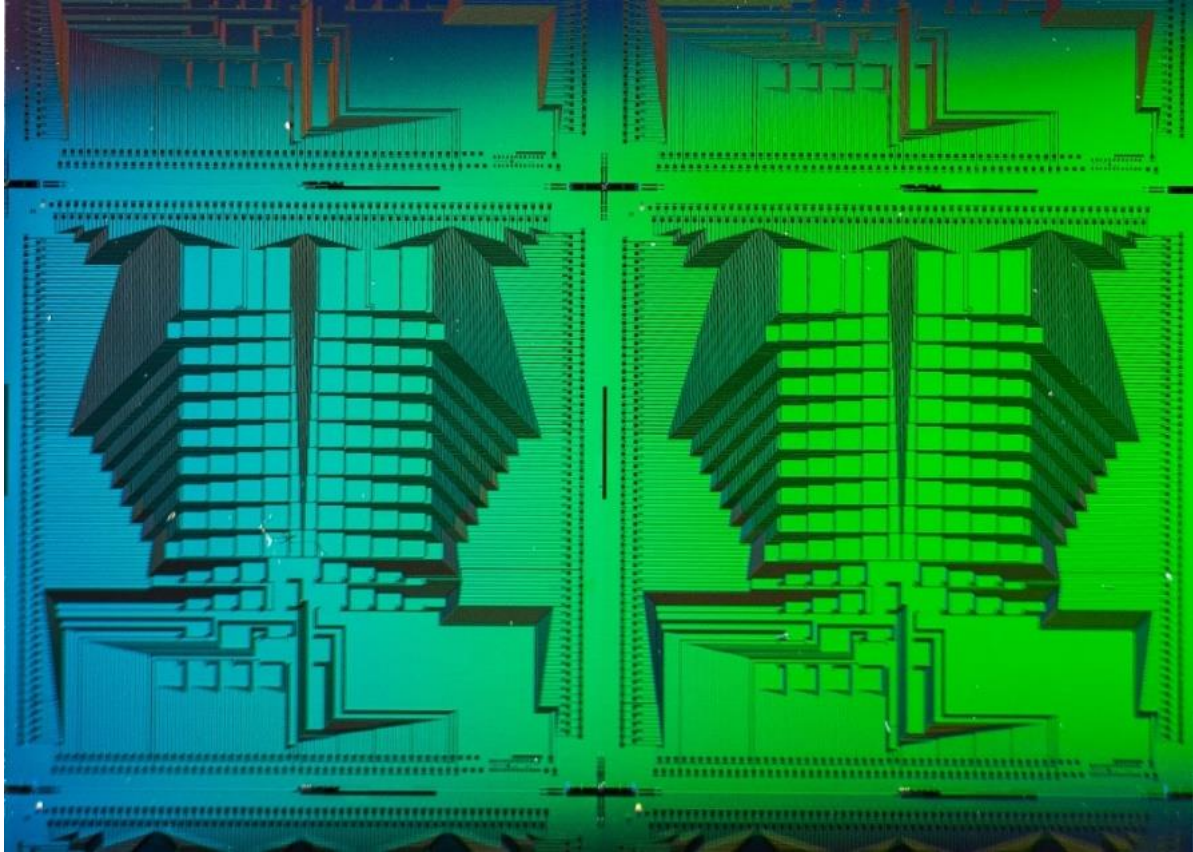


Figure 17. Photographie de deux puces après avoir réalisé toutes les étapes de fabrication. Chaque puce mesure 22 mm x 22 mm. Les puces sont délimitées par une zone de découpe (croix et lignes entre les rangées de plots).

2.2. Caractérisation électrique à sec des dispositifs BioFET

Après avoir fabriqué nos dispositifs BioFET, l'objectif était de les caractériser électriquement, à sec, pour vérifier leur bon fonctionnement. Les caractéristiques de transfert $I_{DS}-V_{BG}$ ont été réalisées en polarisant la face arrière des substrats SOI. Pour cela, nous avons utilisé une station de test sous pointes couplée à un analyseur (*Semiconductor Parameters Analyzer HP4156A*). Ces travaux sont également réalisés au LETI.

2.2.1. Caractéristiques de transfert à l'échelle de la puce et de la plaque SOI.

À titre illustratif, nous présentons sur la **Figure 18** quelques exemples de caractéristiques de transfert mesurées à sec à partir de nos dispositifs BioFET situés dans la région « matrice ». Ces dispositifs BioFET sont représentés par un réseau de 15 nanofils de Si de largeur 150 nm et de longueur 1,5 μm chacun (**Figure 8, D2**). Nous pouvons constater que l'ensemble des dispositifs est fonctionnel avec un rapport de courant I_{ON}/I_{OFF} d'environ 10^5 .

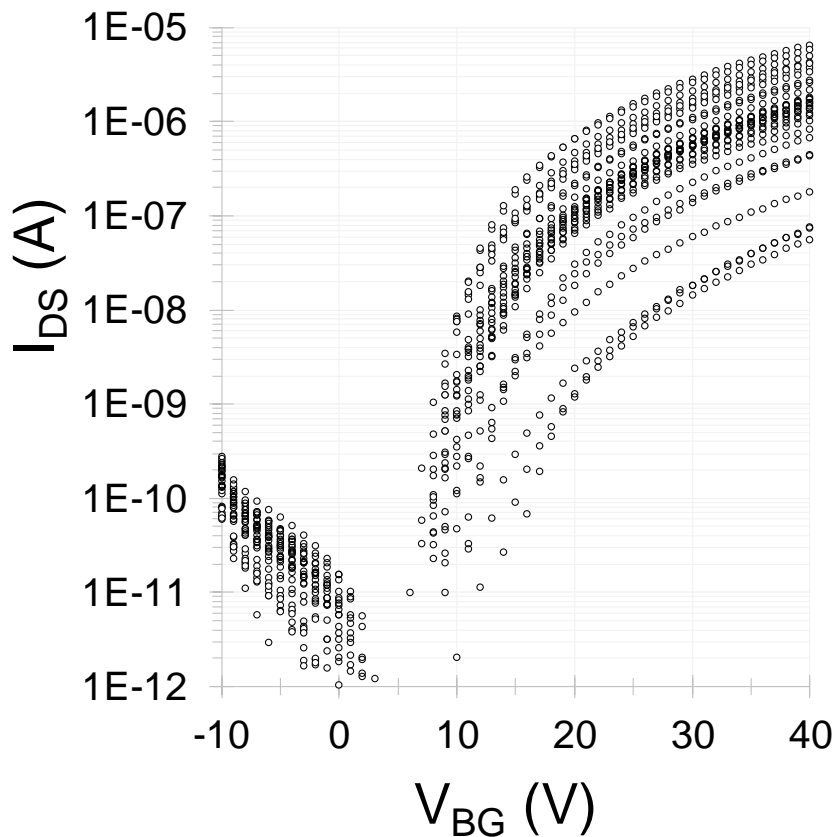


Figure 18. Caractéristiques de transfert I_{DS} - V_{BG} de plusieurs dispositifs BioFET à réseaux de nanofils de Si appartenant à une même région « matrice » d'une même puce. $V_{DS} = 1\text{V}$.

A partir de ces caractéristiques électriques, nous avons extrait la tension de seuil en prenant pour méthode celle de l'extraction du V_t au maximum de la dérivée seconde de la transconductance. Il s'agit de la valeur de la tension V_{GS} à laquelle la dérivée seconde du courant ($\frac{\partial^2 I_{DS}}{\partial V_{BG}^2}$) est à son maximum. La **Figure 19** montre un exemple d'extraction de la tension de seuil sur l'une des caractéristiques de transfert de la **Figure 18**.

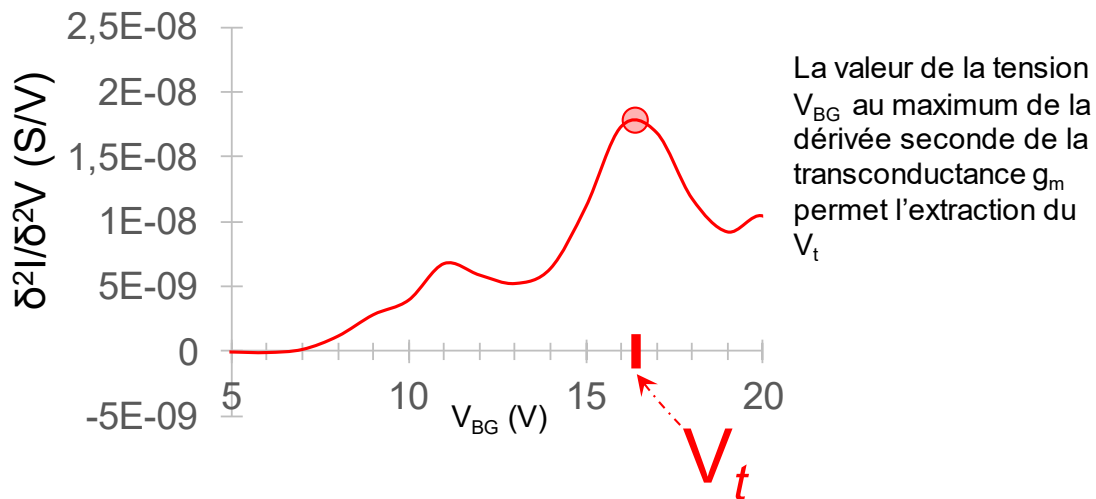


Figure 19. Exemple d'extraction de la tension de seuil d'un dispositif BioFET « D2 » (réseau de nanofils de Si).

Les tensions de seuil sont extraites et répertoriées pour chaque dispositif BioFET. Nous pouvons ainsi évaluer le niveau de reproductibilité ou de dispersion des tensions de seuil d'un dispositif à l'autre.

Par exemple, au sein de notre région « matrice », nous avons mesuré 30 dispositifs BioFET « D2 », tous identiques, sur 37 puces différentes d'une même plaque.

Les mesures de la tension de seuil sont représentées sur la **Figure 20**. Les résultats sont présentés sous forme de diagramme en boîte.

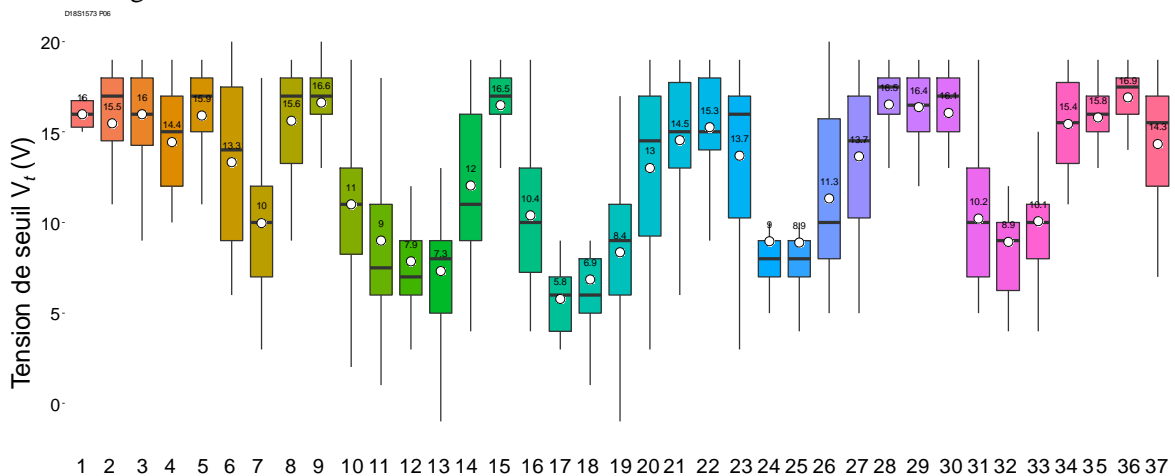


Figure 20. Un exemple de mesures des dispersions de la tension de seuil « V_t » pour des BioFETs à réseaux de nanofils situés dans la région « matrice » sur 37 puces (n° de puce en abscisse). Les moyennes de V_t sont ponctuées en blanc sur les boîtes. Ce diagramme est basé sur la caractérisation d'une plaque appartenant à l'un des premiers lots fabriqués et caractérisés. D'autres plaques présentent le même profil de dispersion de V_t d'un groupe de dispositifs de la région « matrice » d'une puce, à l'autre.

L'extraction des V_t des différents BioFETs sous forme de diagrammes en boîtes peut être un premier outil d'évaluation de nos dispositifs. Les mesures représentées sur la **Figure 20**, montrent une forte dispersion d'une puce à l'autre (dispersion **intra-plaque**). Cette dispersion est le reflet d'un manque de

Chapitre 2 : Développement technologique des biocapteurs à nanofils de Si | Caractérisation électrique à sec des dispositifs BioFET | Caractéristiques de transfert à l'échelle de la puce et de la plaque SOI.

maturité des différentes étapes technologiques utilisées lors de la fabrication des premiers dispositifs BioFET.

Dans un second temps, on peut également noter une dispersion intra-puce importante dans certains cas (avec 30 dispositifs caractérisés par « matrice »). Néanmoins, nous pouvons remarquer que certaines puces présentent des résultats plutôt satisfaisants (Figure 20, axe des abscisses : puce n° 1 ou n° 9, ou n° 15, etc.). Ces premiers résultats nous ont rapidement conduit à optimiser certains procédés de fabrication pour améliorer la robustesse et la fiabilité de notre route de fabrication.

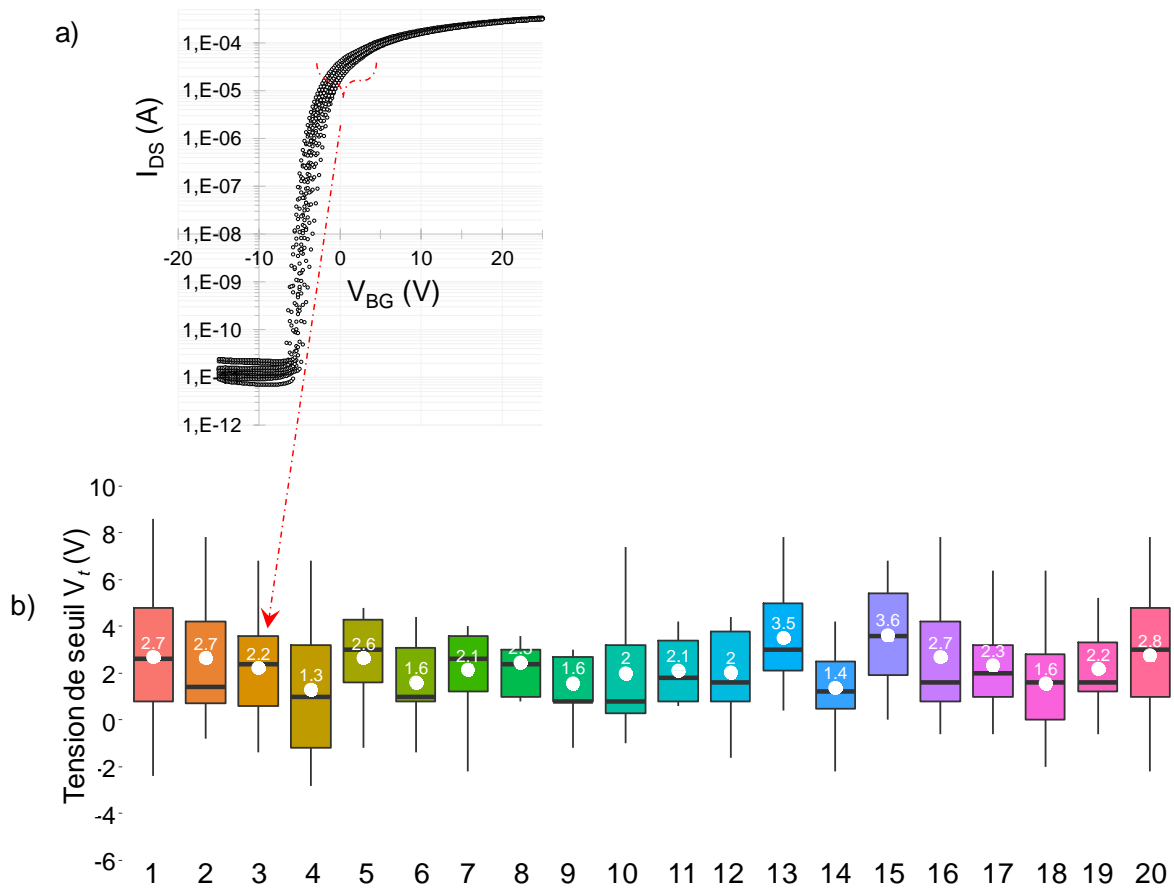


Figure 21. a) Caractéristiques de transfert I_{DS} - V_{BG} de plusieurs dispositifs BioFET à réseaux de nanofils appartenant à une même région « matrice » d'une même puce issue d'un lot dont les procédés de fabrication ont été améliorés. $V_{DS} = 1V$. b) Diagrammes en boîtes présentant la distribution des « V_t » de dispositifs BioFET à nanofils de la région matrice. 20 dispositifs BioFETs sont caractérisés dans chaque région matrice. 20 puces sont testées sur la plaque. Les moyennes de V_t sont ponctuées en blanc sur les boîtes.

Les nouvelles caractéristiques de transfert mesurées sur des BioFETs appartenant à des régions « matrice » montrent un nouveau rapport I_{ON}/I_{OFF} d'environ 10^6 et une dispersion des V_t inter-puces et intra-puce beaucoup plus faible (Figure 21). Ces changements sont principalement dus à une amélioration de la qualité des contacts source et drain des dispositifs (chacune des étapes du procédé de fabrication des contacts est mieux maîtrisée), et à une gravure des cavités mieux contrôlée, en termes de durée de gravures, afin de conserver l'intégrité des structures (oxyde de grille HfO_2 encapsulant les nanofils et silicium monocristallin).

2.2.2. Effet de la gravure de cavité sur la tension de seuil des BioFETs

Afin de quantifier l'effet de la gravure des cavités microfluidiques sur les performances électriques des dispositifs, nous avons mesuré les dispositifs de la barrette W décrite sur la **Figure 22**. Cette barrette présente l'intérêt d'avoir deux dispositifs identiques (l'un avec l'ouverture de la cavité et l'autre sans). Le dispositif BioFET dont la cavité n'est pas gravée peut ainsi servir de dispositif de référence.

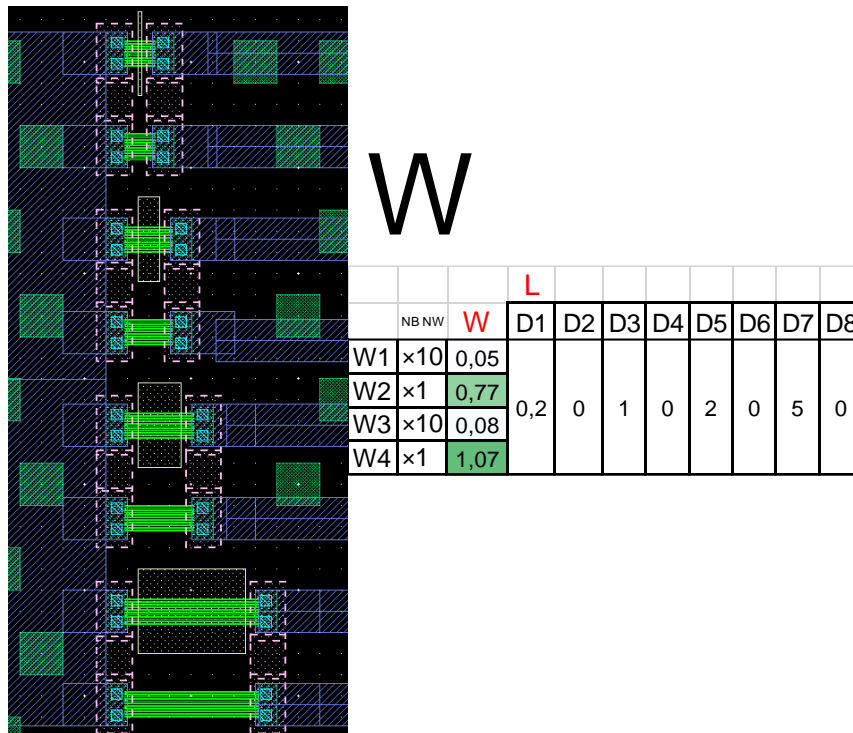


Figure 22. Motifs de la barrette W. Chaque dispositif ayant une cavité est accompagné d'un dispositif de contrôle sans cavité. La dimension L correspond à la longueur de la cavité (en μm). Une cavité « 0 μm » indique une absence factuelle de cavité.

La **Figure 23** représente une mesure de V_t avant optimisation de la gravure des cavités. Les tensions de seuil mesurées correspondent au dispositif W1 (réseau de 10 nanofils de largeur 50nm). Chaque boîte représente une mesure faite sur 47 puces (avec un seul dispositif par puce). Les tensions de seuil extraites des caractéristiques de transfert montrent des valeurs de V_t qui se décalent vers des valeurs significativement plus élevées lorsqu'une cavité est gravée au-dessus du canal du dispositif. Cette tendance se vérifie également dans le cas des transistors à microruban (dispositif W4), **Figure 24**. Cette augmentation de la tension de seuil peut être expliquée par l'exposition directe des oxydes de grille à l'air ambiant.

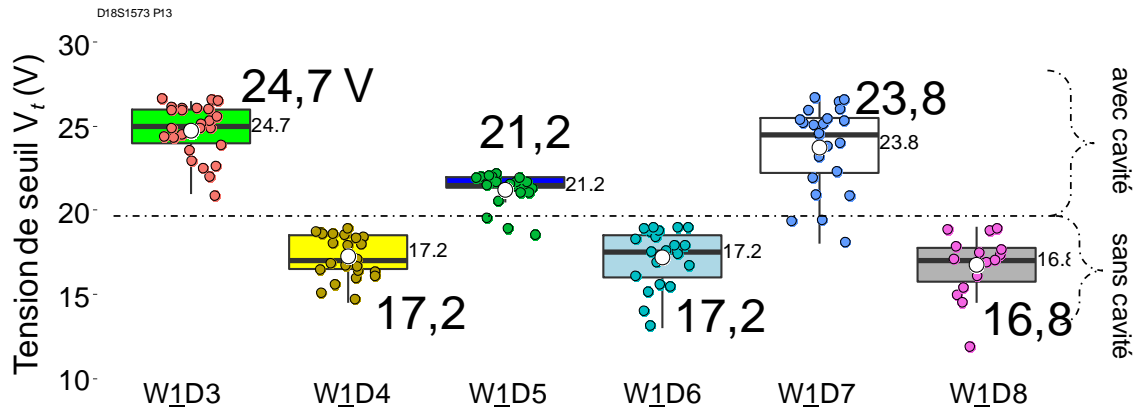


Figure 23. Effet de l'étape de gravure de cavité sur la tension de seuil de BioFETs à réseau de nanofils « W1 ». À la droite du graphique, l'information de la présence ou non d'une cavité est notée. Le procédé de gravure de cavité engendre un décalage de V_t vers des valeurs significativement plus élevées. Chaque point représente la valeur de V_t du transistor considéré, sur une puce. Un groupe de points de même couleur représente les V_t de l'ensemble des puces de la plaque caractérisée. Les points colorés représentant des V_t extraits ne sont pas ordonnés verticalement (suivant un axe vertical) pour éviter que les valeurs égales de V_t ne se superposent.

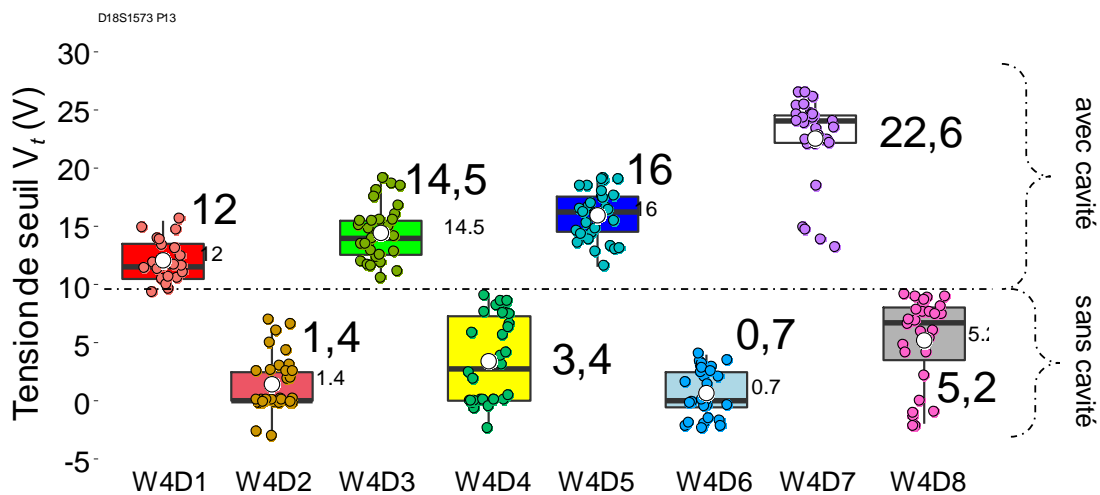


Figure 24. Effet de l'étape de gravure de cavité sur la tension de seuil de BioFETs à microrubans (« W4 »). Comme observé pour les transistors à réseaux de nanofils, le procédé de gravure de cavité induit une tension de seuil plus élevée.

Bien que des étapes systématiques de calibrations préalables des capteurs avant leur utilisation devront être envisagées, ces disparités de V_t présentes entre les dispositifs avec ou sans cavités n'est pas souhaitée. L'objectif d'avoir inclus des transistors sans cavité est de pouvoir s'en servir comme des dispositifs de contrôles négatifs (références).

Pour remédier à ce problème, nous avons mis en place un procédé de recuit au gaz inerte (*forming gas* (5% H₂/ 95% N₂)) dont l'objectif est de neutraliser les charges fixes parasites qui seraient piégées dans l'oxyde de grille et qui seraient potentiellement à l'origine de ces disparités. Ce procédé a été appliqué sur une plaque issue d'une nouvelle campagne de fabrication. La **Figure 25** présente la dispersion des V_t (après *forming gas*), parmi les dispositifs « W4 ».

Nous pouvons remarquer qu'après le procédé de *forming gas*, les V_t des BioFETs avec et sans cavité sont désormais beaucoup plus proches.

Chapitre 2 : Développement technologique des biocapteurs à nanofils de Si | Caractérisation électrique à sec des dispositifs BioFET | Effet de la gravure de cavité sur la tension de seuil des BioFETs

Si nous considérons que la seule différence entre ces mesures et les précédentes (**Figure 24** vs **Figure 25**) est la réalisation d'une étape de *forming gas*, alors ces effets peuvent être en grande partie attribués à ce recuit de « guérison » des défauts.

Nous pouvons conclure que l'étape de *forming gas* est bénéfique et intéressante dans l'optimisation de nos procédés de fabrication.

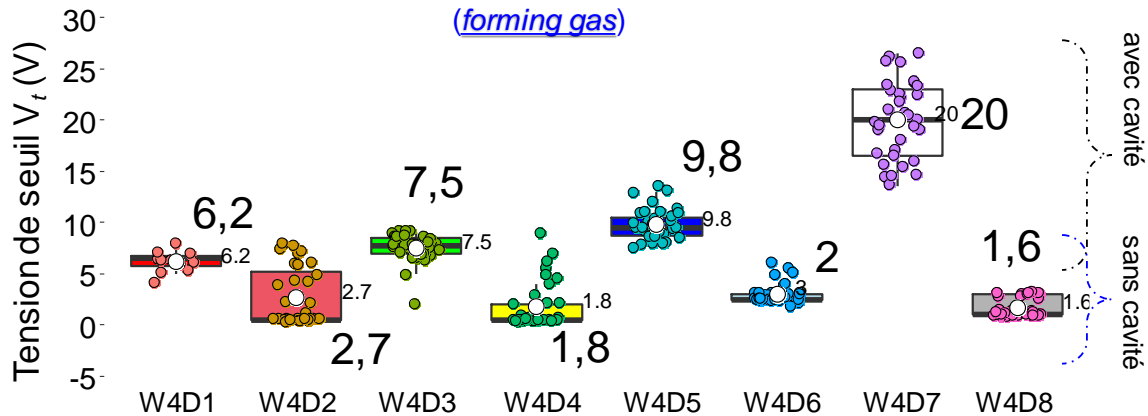
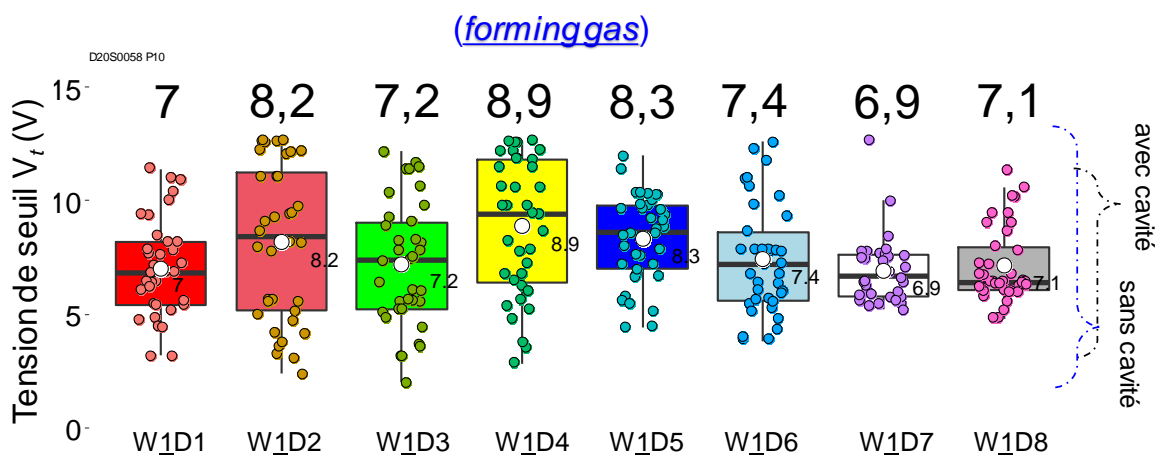


Figure 25. Ce diagramme présente la distribution des tensions de seuil de transistors à microruban « W4 » après une étape de *forming gas*.

Il est aussi intéressant de remarquer que la variation inter-puce est également significativement réduite pour les deux types de dispositifs (avec et sans cavités).

Après l'intégration systématique de l'étape de *forming gas* à la fin de notre route de fabrication, nous avons effectué des nouvelles mesures sur la dernière campagne de fabrication en date avec pour objectif de réaliser un état des lieux sur les dispersions liées au procédé de gravure de cavité.

Nous avons obtenu des résultats intéressants, montrant une absence de différence significative sur la dispersion des tensions de seuil des BioFETs de la barrette « W » (**Figure 26**). Une autre barrette « Z » a également été mesurée (**Figure 27**). Les résultats obtenus ont permis de confirmer nos observations et notre conclusion quant à l'effet positif de l'étape de *forming gas* sur la dispersion des V_t entre les dispositifs gravés, avec ou sans cavité.



Chapitre 2 : Développement technologique des biocapteurs à nanofils de Si | Caractérisation électrique à sec des dispositifs BioFET | Effet de la gravure de cavité sur la tension de seuil des BioFETs

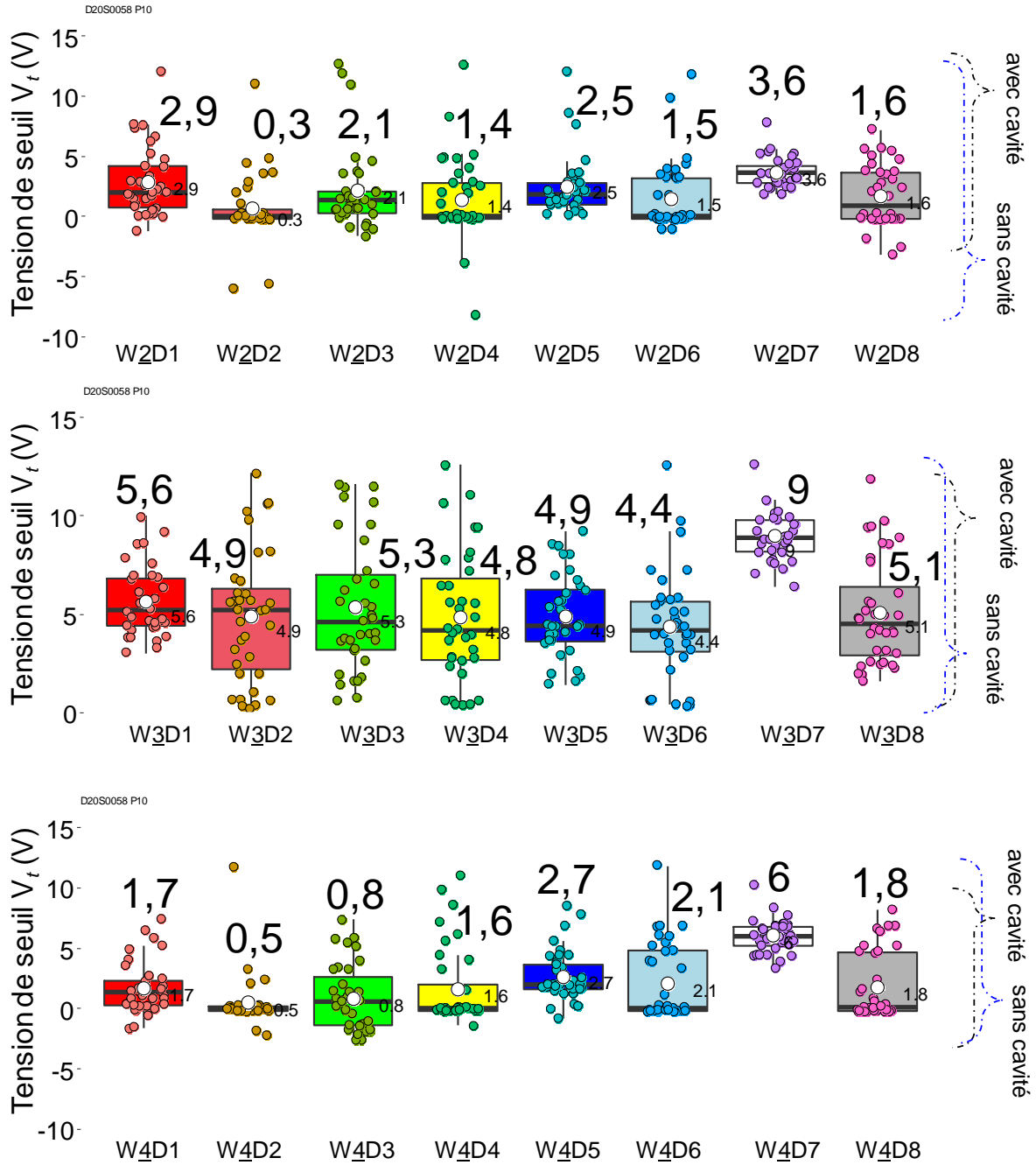


Figure 26. Impact du forming gas sur la reproductibilité de la valeur de la tension de seuil des transistors de la barrette « W ».

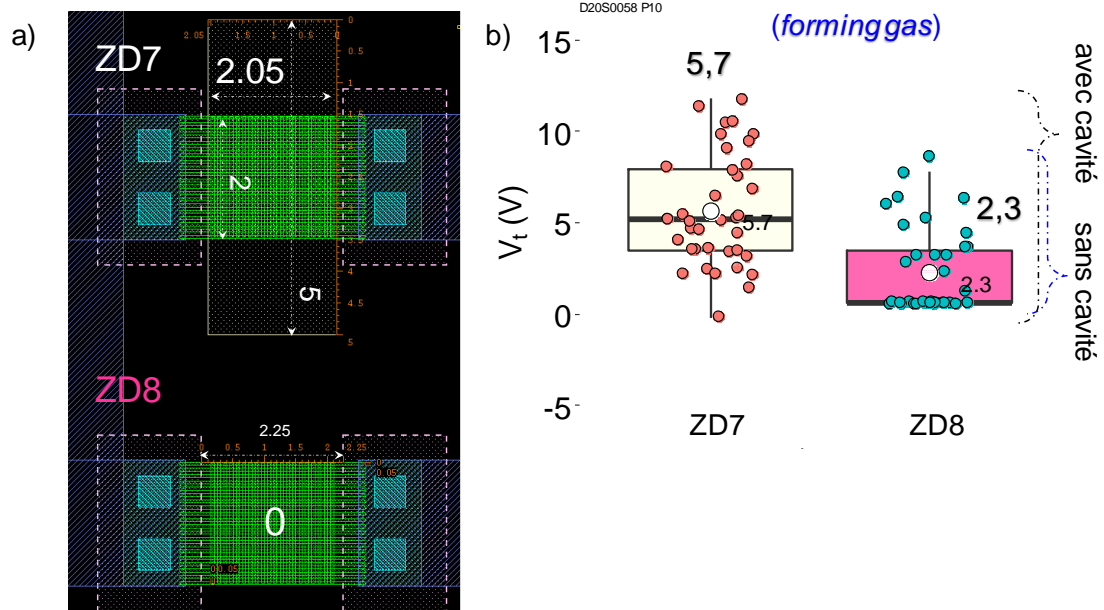


Figure 27. a) Motifs des transistors à nanofils « ZD7 » et « ZD8 » appartenant à la barrette « Z ». b) les diagrammes montrent que sur une autre barrette dont la structure diffère des barrettes précédemment mesurées, l'étape de *forming gas* réduit les disparités de tension de seuil entre les dispositifs gravés avec ou sans cavité.

2.2.3. Effet du dimensionnement des structures de type nanofils

Les mesures effectuées sur les différentes structures de transistors pour valider leur fonctionnalité nous ont également permis de mettre en lumière les effets de dimensionnement des transistors sur leur tension de seuil. Conformément à l'état de l'art, la valeur du V_t décroît avec l'augmentation de la largeur des nanofils de Si.

Cette variation de V_t liée à la largeur des fils de Si s'est confirmée sur beaucoup de barrettes. Les **Figures 28** et **29** (barrettes « F » et « M » respectivement), présentent quelques exemples (V_t en fonction de la largeur W) qui illustrent une tendance globale.

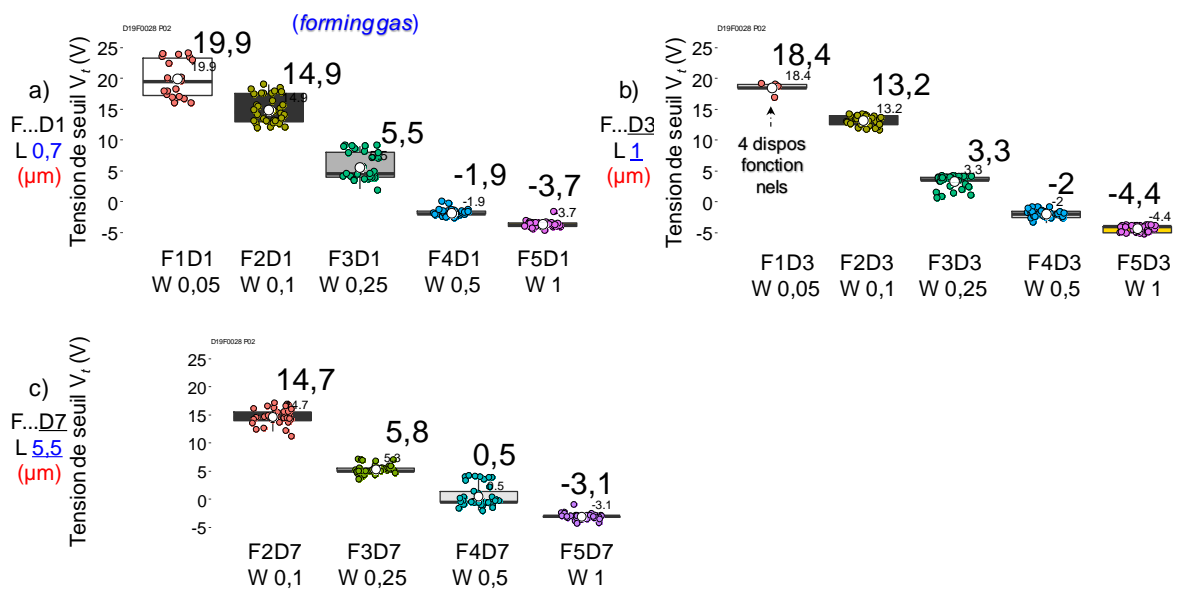
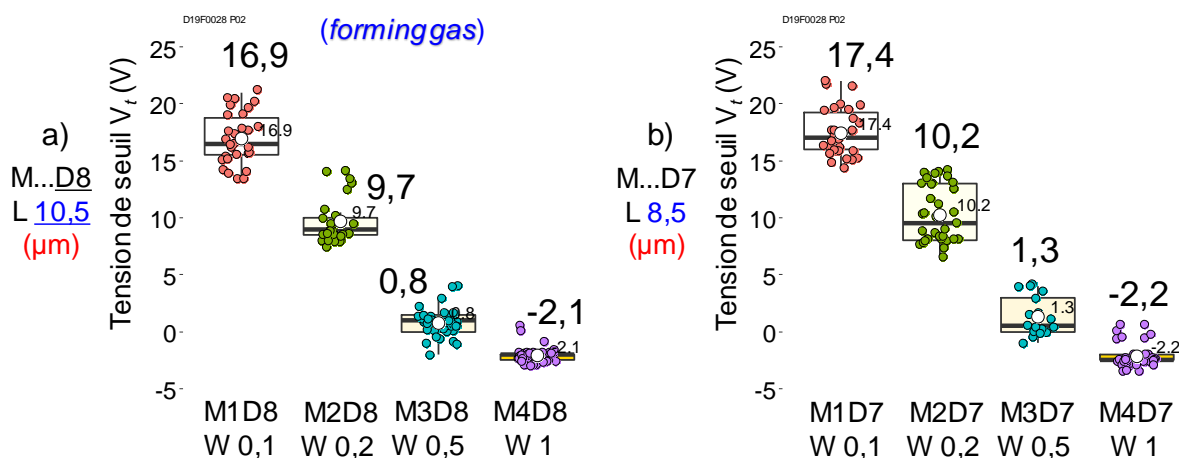


Figure 28. Effet de la largeur des nanofils sur leur tension de seuil. Quelques dispositifs de la barrette « F » sont présentés. Les nanofils dont la largeur varie ont une longueur constante de : a) $0,7 \mu\text{m}$. b) $1 \mu\text{m}$. c) $5,5 \mu\text{m}$.



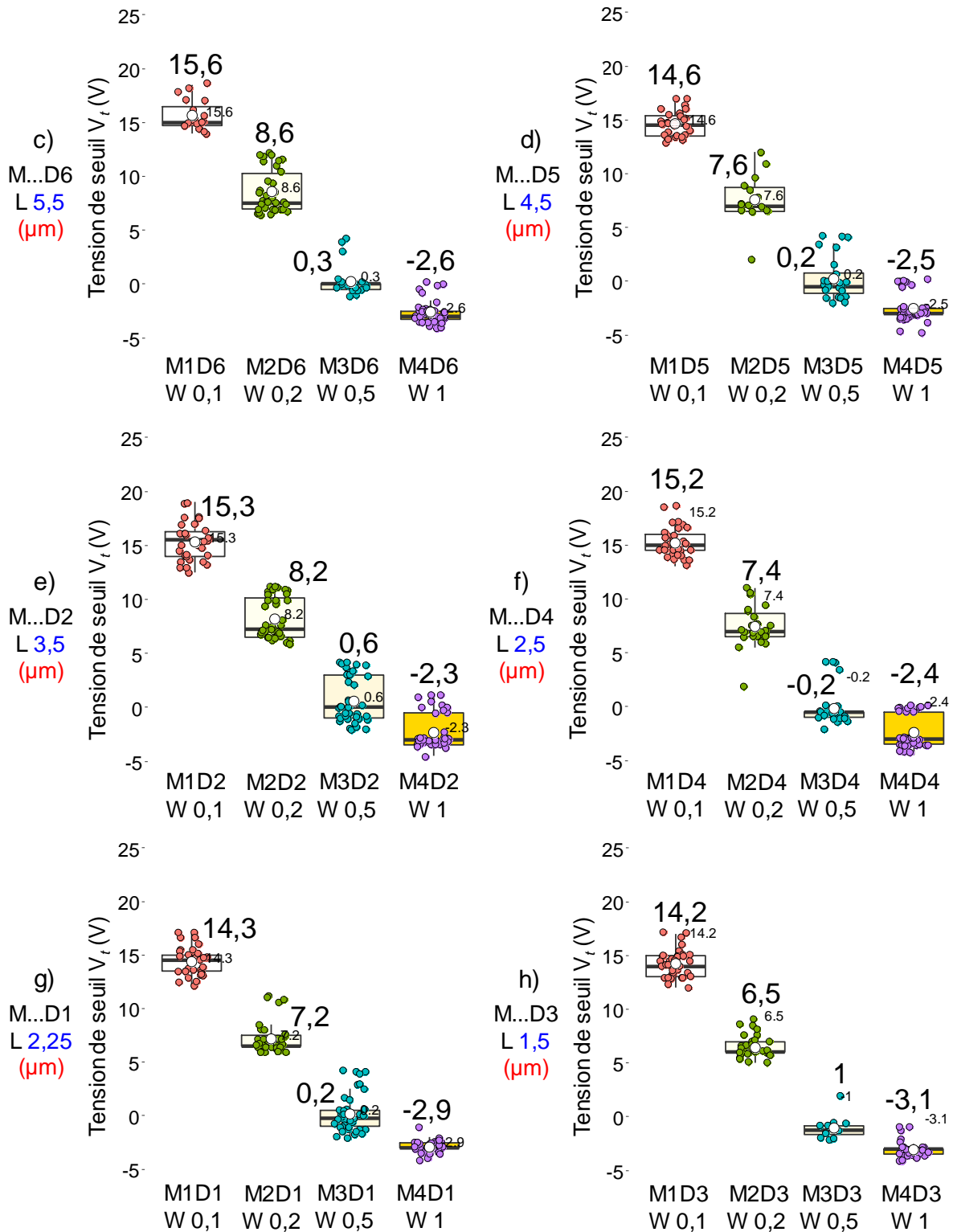


Figure 29. Effet de la largeur des nanofils sur leur tension de seuil. La barrette « M » est présentée. Les nanofils dont la largeur varie (en abscisse, W varie en μm) ont une longueur constante de : a) $10,5 \mu\text{m}$. b) $8,5 \mu\text{m}$. c) $5,5 \mu\text{m}$. d) $4,5 \mu\text{m}$. e) $3,5 \mu\text{m}$. f) $2,5 \mu\text{m}$. g) $2,25 \mu\text{m}$. h) $1,5 \mu\text{m}$. On peut observer un effet net de la largeur W sur le V_t des transistors.

La variation de la longueur des nanofils de Si n'a pas eu d'effets significatifs sur l'évolution du V_t (non illustré). La longueur des canaux est trop importante pour révéler des effets de canaux courts.

Chapitre 2 : Développement technologique des biocapteurs à nanofils de Si | Caractérisation électrique à sec des dispositifs BioFET | Effet du dimensionnement des structures de type nanofils

Cette étape de caractérisation électrique à sec de nos BioFETs a été un point de vérification systématique qui nous a permis d'établir un état des lieux sur leurs caractéristiques électriques, à sec, après leur fabrication.

3. Chapitre 3 :

Fonctionnalisation des nanofils de Si

3.1. Introduction à la notion de fonctionnalisation de surface

Dans notre contexte, le terme de « fonctionnalisation de surface » consiste en la modification chimique de la structure de surface d'un substrat solide, en y complexant un ensemble de réactifs chimiques ou biologiques. Cette modification est réalisée par le biais d'immobilisations d'éléments de reconnaissance biomoléculaire à la surface du substrat, pour lui conférer *de facto*, une fonction biochimique précise de détection spécifique d'un type de molécules d'intérêt (ions, ADN, protéine, autres petites molécules)¹¹⁰.

La fonctionnalisation de surface des substrats solides inorganiques étant un domaine de recherche et de développement à part entière, il existe de nos jours un grand nombre de techniques chimiques permettant la modification de surfaces¹¹¹. Ces différentes techniques peuvent être classifiées selon la nature des interactions qui s'établissent entre la surface inorganique fonctionnalisée et les molécules greffées. Trois types d'interactions « molécules/ substrats » permettent la classification des différentes techniques de fonctionnalisation :

1. la fonctionnalisation de surface par le biais d'**interactions électrostatiques** s'établissant entre les charges des atomes de surface du substrat et les charges portées par les molécules de l'adsorbat de fonctionnalisation. Le terme **physisorption** est également utilisé. Ces interactions électrostatiques sont considérées comme ayant de faibles énergies de liaisons (de quelques $\text{kJ}\times\text{mol}^{-1}$ à une trentaine de $\text{kJ}\times\text{mol}^{-1}$)^{112, 113}.
2. la fonctionnalisation par le biais d'établissement d'**interactions ioniques** entre les atomes surfaciques du substrat et les molécules de fonctionnalisation. Ce type d'interaction met en jeu un établissement de doublets liants électroniques entre des espèces chimiques « donneuses ou réceptrices d'électrons ». Dans un contexte de fonctionnalisation de surface, les électrons surfaciques du substrat et ceux des molécules de fonctionnalisation établissent spontanément des doublets liants en cas de déficit électronique venant d'une part ou de l'autre (substrat / molécules de fonctionnalisation). Les interactions ioniques ont des énergies de liaisons qui valent quelques centaines de $\text{kJ}\times\text{mol}^{-1}$. Lorsque les espèces chimiques qui interagissent dans les interactions ioniques ont des électronégativités inégales, l'énergie du doublet liant est moins élevée que dans le cas des liaisons covalente.
3. les **liaisons covalentes** ou ionocovalentes (interactions fortes entre éléments chimiques d'électronégativités équilibrées) mettent en jeu un ou plusieurs doublets liants électroniques (liaisons simples, doubles, ou triples), d'énergies de liaison valant plusieurs centaines de $\text{kJ}\times\text{mol}^{-1}$ entre la surface du substrat à fonctionnaliser et les agents de fonctionnalisation.

Le type d'interactions mis en jeu dans la fonctionnalisation ainsi que le choix des molécules de fonctionnalisation dépendent de la nature et des contraintes du substrat utilisé (silicium, argent, or, etc.), ainsi que des propriétés surfaciques souhaitées post-fonctionnalisation (réactivité chimique, mouillabilité, etc.).

Pour la fonctionnalisation de nos oxydes de grille, nous avons opté pour la fonctionnalisation par silanisation, technique mettant en jeu des liaisons covalentes fortes à l'interface substrat/ molécules organosilanes. La silanisation est une technique de fonctionnalisation de choix, simplement réalisable, et communément utilisée dans les laboratoires académiques et industriels, pour la fabrication de dispositifs variés, notamment dans le domaine des capteurs^{114, 115} mais également dans les applications de traitements de surfaces de verres¹¹⁶. Les organosilanes sont utilisés en tant qu'intermédiaires de couplage dans la grande majorité de leurs applications. Cette couche de silane intermédiaire entre le substrat et la couche de sondes de fonctionnalisation permet l'adjonction de molécules chimiques sondes, ainsi qu'un meilleur contrôle de leur orientation de fixation. La famille des organosilanes se compose d'un vaste choix d'organosilanes qui se différencient par la nature du groupement chimique qui établit la réaction de couplage : en effet, il peut s'agir d'une terminaison dite « aminée », « thiolée », d'une terminaison « aldéhyde », « epoxys »¹¹⁷, etc.

3.2. Généralités sur les silanes et leur utilité en tant qu'agent de fonctionnalisation

Dans les prochains paragraphes, nous détaillons la technique de silanisation de surface. Nous présentons nos protocoles de fonctionnalisation de surface ainsi que les résultats obtenus sur les différents échantillons fonctionnalisés par ces moyens. Les résultats y sont également discutés.

La silanisation est mise au point par le chimiste E. P. Plueddemann une quarantaine d'années plus tôt (1982)¹¹⁸. Tout organosilane est dérivé d'un noyau de silane (SiH_4) dans lequel au moins l'un des quatre atomes d'hydrogène est substitué par un groupement chimique différent de « H ».

« $\text{R}_n\text{-Si-X}_{(4-n)}$ » est l'expression générale des organosilanes, avec R, un groupement chimique non hydrolysable (*i.e.*, un groupement fonctionnel réactif aminé, thiolé, un aldéhyde, un acide carboxylique), « n », le nombre de groupements fonctionnels portés par l'organosilane (avec « n », un entier compris entre 0 et 4 puisque le silicium établit 4 doublets liants), « X » est un groupement chimique hydrolysable de type méthoxyl, ethoxyl, alcoxyle, halogénure, carboxylate. Ces groupements chimiques pouvant également être de nature assez variée, leur fonction consiste en l'ancrage de l'organosilane sur la surface du substrat à fonctionnaliser. Cette notion d'ancrage est développée plus en détail dans les paragraphes suivants. En résumé, structurellement, les organosilanes s'organisent en trois parties (groupements chimiques) :

1. « $\text{X}_{(4-n)}$ », ayant un rôle d'ancrage unique vis-à-vis du substrat fonctionnalisé,
2. le noyau de silicium,
3. « R_n », jouant un rôle double d'espaceur et de groupement chimique réactif vis à vis du substrat.

L'espaceur est généralement un alkyle (*i.e.*, une chaîne carbonée) ou possiblement un cycle aromatique. La variabilité de la nature du groupement « R_n » permet de nombreuses possibilités de couplage de

Chapitre 3 : Fonctionnalisation des nanofils de Si

l'organosilane avec les molécules surfaciques du substrat à fonctionnaliser. Pour rappel, les interactions organosilanes/ substrat peuvent être de nature électrostatique, ionique ou covalente.

Une surface fonctionnalisée via un organosilane présente *a posteriori* les propriétés physicochimiques propres à l'agent de fonctionnalisation utilisé. Plus particulièrement, il peut s'agir de propriété d'hydrophilie ou d'hydrophobie, de propriété d'intermédiaire de couplage (amine, thiol, etc.), de propriété de polymérisation, etc.

Les organosilanes peuvent être utilisés pour la modification covalente de tous types de surfaces hydroxylées (*i.e.*, présentant des fonctions hydroxyles libres surfaciques (-OH)) ¹¹⁹. Le phénomène de silanisation d'une surface inorganique (SiO₂ ou HfO₂ dans notre cas) se traduit par l'établissement de liaisons covalentes fortes, entre les groupements d'accroche de l'organosilane et les groupements hydroxyles surfaciques du substrat.

Dans nos travaux de fonctionnalisation, nous avons procédé à des réalisations de silanisation de surfaces d'oxyde de silicium en utilisant l'organosilane « 3-aminopropyl triéthoxysilane », (« APTES ») ¹²⁰⁻¹²², un aminosilane (organosilane à terminaison aminée (-NH₂)) bien documenté dans la littérature (**Figure 30**).

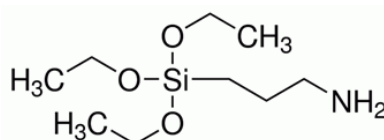


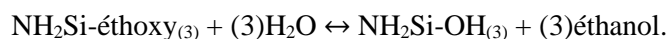
Figure 30 : schéma d'une molécule d'APTES (3-aminopropyl triéthoxysilane). La terminaison réactive -NH₂ peut servir de groupement d'adjonction aux molécules chimiques qui peuvent réagir avec les amines.

La structure de l'APTES est « R-Si-X₃ » avec « X₃ » égal à (OCH₂CH₃)₃, *i.e.*, 3 groupements « éthoxy ». Le groupement fonctionnel « R » est une amine (-NH₂) nucléophile et amphotère, portée par un bras espaceur à 3 carbones. La propriété « amphotère » de l'amine signifie que son état de protonation (-NH₂ ou -NH₃⁺) dépend du pH environnemental, selon la réaction suivante : NH₂ + H₃O⁺ ↔ H₂O + NH₃⁺.

L'APTES qui se présente à l'état liquide, est incolore à l'œil, et est relativement inodore dans les conditions normales de laboratoire *i.e.*, pression atmosphérique, température ambiante. Il s'agit d'un élément chimique corrosif avec une toxicité aigüe (pictogrammes GHS05 et GHS07).

La réaction de silanisation par APTES d'une surface d'oxyde hydroxylée se produit en 2 étapes :

1. Hydrolyse (**Figure 31**) : cas de l'APTES. La première étape s'amorce lorsqu'au contact de molécules d'eau, les groupements d'ancrage de l'organosilane (groupements « éthoxy ») s'hydrolysent spontanément pour former des groupements silanols ^{123,124} par la réaction suivante :



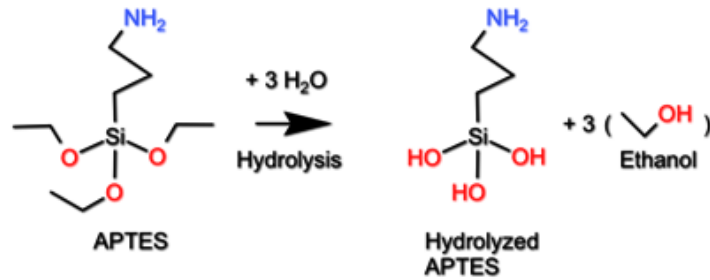


Figure 31. Réaction chimique d'hydrolyse d'un organosilane. Les molécules de H₂O hydrolysent les groupements « R' » de l'organosilane. Cette réaction produit des groupements d'ancrage de type « silanol » et la libération d'espèces chimiques de type « alcool ».

2. Polycondensation (**Figure 32**) : au cours de la polycondensation, les molécules d'APTES interagissent entre elles et s'auto-assemblent par des liaisons hydrogènes (homocondensation). Ces molécules d'APTES interagissent également avec le substrat et s'y adsorbent via l'établissement de liaisons hydrogènes APTES/ silanols (hétérocondensation). Comme toute réaction chimique, ces réactions se font jusqu'à l'obtention de l'équilibre réactionnel du système.

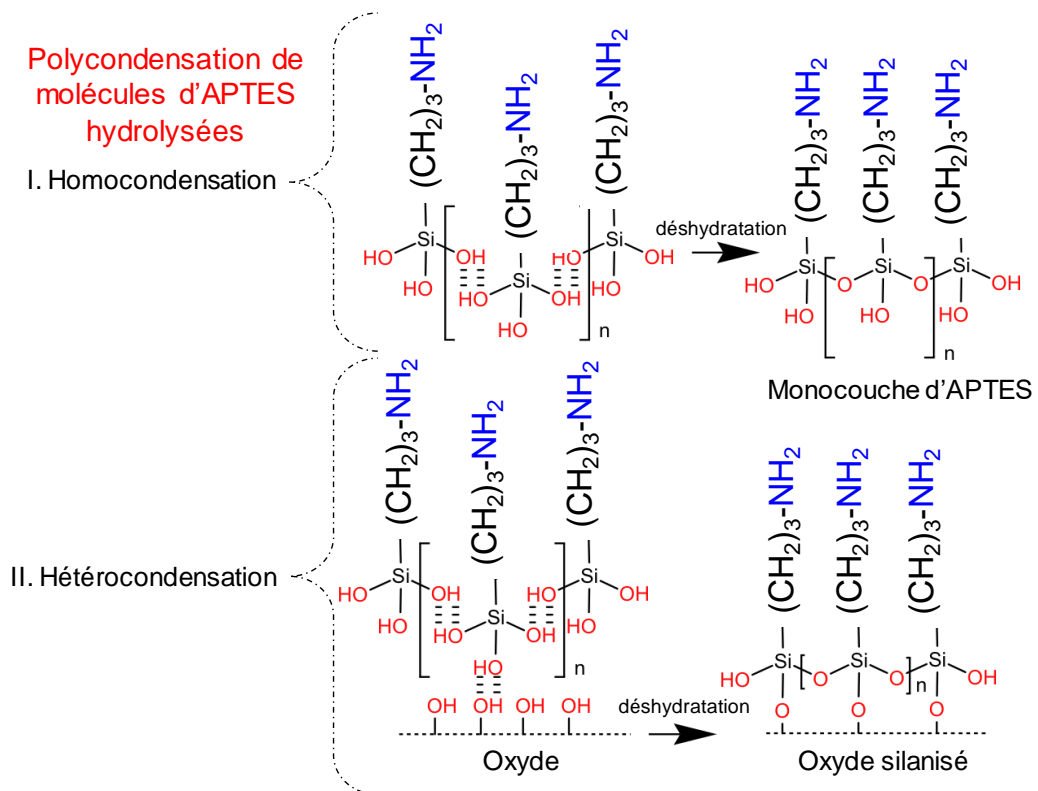


Figure 32. Phénomènes d'homocondensation et d'hétérocondensation des molécules d'organosilane. L'illustration est faite pour le cas de l'APTES. La molécule d'APTES est constituée de façon à pouvoir s'hydrolyser en présence d'eau, à s'auto-assembler par homocondensation et à s'adsorber sur le substrat par hétérocondensation. Cette voie de réticulation permet d'optimiser les chances d'obtention d'un film polymère monocouche, fixé de façon covalente et stable sur l'oxyde SiO₂.

La structure que forme la couche de silane sur la surface inorganique hydroxylée tient physiquement en place par l'intermédiaire des nombreuses liaisons hydrogènes structurales s'étant établies entre chaque couple de groupement « OH » (**Figure 32**). La déshydratation de ces liaisons « hydrogène » par recuit thermique (se faisant généralement à plus de 100°C, pendant quelques heures), libère des molécules d'eau. Ce phénomène de déshydratation mène à la production de ponts siloxanes (ponts liants covalents entre l'organosilane et la surface du substrat), comme illustré sur la **Figure 33**.

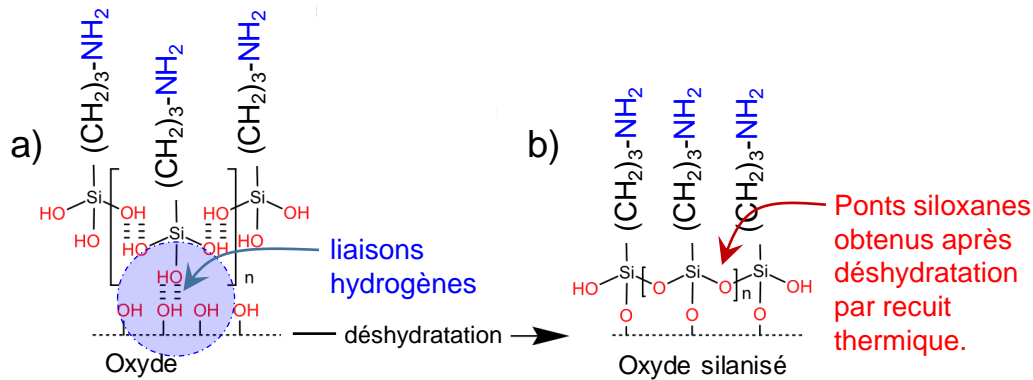


Figure 33. Schéma d'une monocouche d'APTES fixée à la surface d'un oxyde via a) des liaisons hydrogènes, et b) des liaisons covalentes.

En pratique, l'obtention d'une monocouche de silanisation bien structurée et reproductible est difficile car les silanes peuvent également s'homocondenser suivant des plans de polymérisation autres, ou former des monocouches partielles, ou également, s'adsorber par physisorption directement sur la surface hydroxylée (liaisons hydrogènes aléatoires ou liaisons électrostatiques) ^{120,125,126}. Cet aspect est un inconvénient dans les applications nécessitant une couche de fonctionnalisation monocouche et homogène ^{91,119,127}.

Toutefois, des groupes de recherche ^{119,120} ont montré des résultats convaincants où la silanisation en phase vapeur (par opposition à la silanisation en phase aqueuse), permet l'obtention d'une couche de silanisation de structure optimale. Certains paramètres tels que la réactivité de l'organosilane choisi (nombre de sites d'accroche *versus* le nombre de groupements terminaux, et longueur du groupement espaceur) ¹²⁰, l'hygrométrie à l'intérieur du système réactionnel, la concentration en silane ¹²², le temps de silanisation ¹²⁸, et la température au sein du système réactionnel permettent de contrôler et d'optimiser la qualité de la couche synthétisée. La **Figure 34** illustre différents cas de figure d'adsorption de molécules d'APTES à la surface d'un oxyde de silicium hydroxylé.

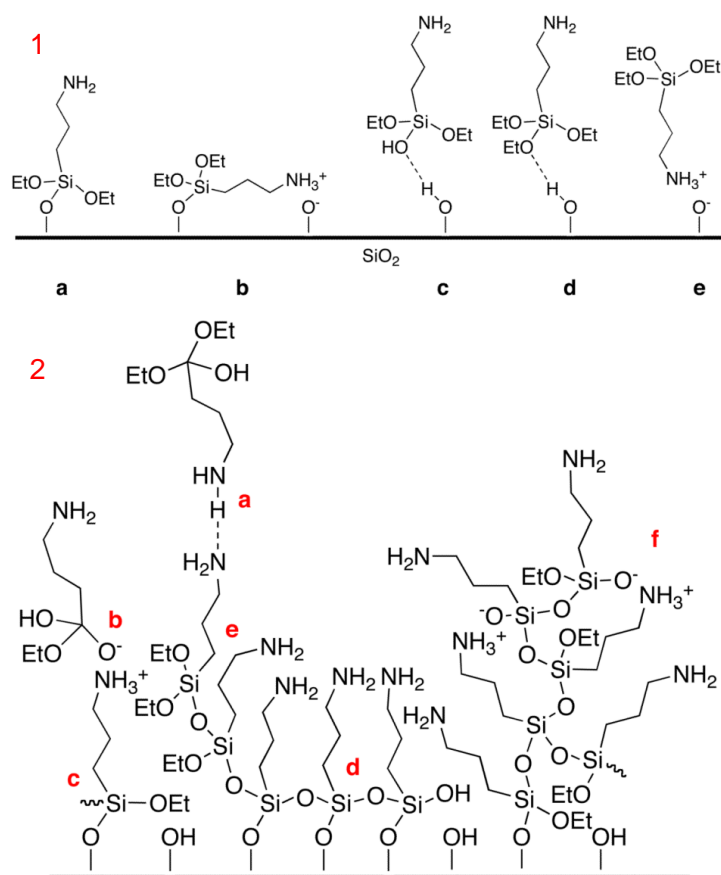


Figure 34. 1(a-e). Illustrations des différentes options d'adsorption des molécules d'APTES sur un substrat SiO_2 hydroxylé (schéma issu de ¹²⁰).

1.a). Cas d'un attachement covalent entre la molécule d'APTES et le substrat. La terminaison fonctionnelle aminée ($-\text{NH}_2$) est libre et peut donc être impliquée sans contraintes dans des réactions chimiques ultérieures (couplage d'agents chimiques autres, etc.),

1.b). Cas de figure où la terminaison aminée de la molécule d'APTES (attachée par liaison covalente à la surface du substrat) est impliquée dans une interaction électrostatique avec un hydroxyle surfacique et pourrait amorcer l'apparition de défauts dans la couche de fonctionnalisation,

1.c – e) interactions faibles de maintien des molécules d'APTES à la surface du substrat, c) liaison hydrogène établie entre une molécule d'APTES (dont l'hydrolyse n'est pas totale) et un hydroxyle surfacique, d) liaison hydrogène établie entre un groupement « éthoxy » d'une molécule d'APTES et un hydroxyle surfacique, e) interaction électrostatique entre une terminaison aminée et un hydroxyle surfacique.

2.(a-f) Illustrations des cas potentiels d'interaction entre plusieurs molécules d'APTES.

2.a) liaisons hydrogènes au sein de 2 terminaisons aminées de 2 molécules d'APTES distinctes,

2.b) interactions électrostatiques entre un groupement silanol d'une molécule d'APTES et la terminaison aminée d'une molécules d'APTES distincte.

2.c) attachement covalent entre des molécules d'APTES et la surface du substrat (configuration d'interaction souhaitée entre les molécules d'APTES et le substrat)

2.d) molécules d'APTES homopolymérisées,

2.e) molécules d'APTES homopolymérisées verticalement,

2.f) polymérisation aléatoire des molécules d'APTES.

3.3. Présentation des différentes méthodes de fonctionnalisation utilisées

Nous avons accordé un effort important à la réalisation d'une couche de fonctionnalisation de qualité car celle-ci joue le rôle primordial d'interface de détection (captation) biochimique intermédiaire entre le capteur électronique et les molécules cibles. La qualité chimique d'une telle couche de fonctionnalisation est un paramètre critique dans le développement d'un biocapteur sensible, spécifique et fiable^{91,119}. Dans un cas idéal, il s'agit d'une monocouche (sans agrégats), d'une structure régulière mesurant quelques nanomètres *i.e.*, à peu près la hauteur cumulée de chaque intermédiaire individuel de fonctionnalisation occupant la surface du substrat. Cette couche est composée de molécules de fonctionnalisation choisies pour être fortement spécifiques aux molécules de l'échantillon à analyser (molécules ciblées), en engendrant très peu d'interactions non spécifiques, lorsque les molécules ciblées n'ont pas d'affinité pour les espèces sondes appartenant à la couche greffée.

Nous avons utilisé deux différents protocoles de fonctionnalisation. Le premier protocole est celui de la silanisation par APTES en phase vapeur. Ce protocole utilise les intermédiaires APTES et glutaraldéhyde (GA) pour fixer les molécules sondes de manière covalente. Les limitations de ce précédent protocole en termes de qualité de couche de fonctionnalisation nous ont conduit à mettre en place un second protocole de silanisation utilisant un epoxysilane, le « 5,6-epoxyhexyltriéthoxysilane » ou EHTES, déposé en phase liquide et ayant permis l'obtention de résultats satisfaisants.

3.3.1. Méthode 1 : fonctionnalisation par silanisation en phase vapeur, APTES/GA

La fonctionnalisation par le protocole APTES/GA implique la conjugaison d'un complexe de 2 couches d'accroche (couche d'APTES et couche de glutaraldéhyde) à la surface du substrat (échantillon recouvert d'un film d'oxyde). Dans les paragraphes suivants, nous détaillons le protocole de fonctionnalisation « APTES/ GA » en phase vapeur que nous avons utilisé sur des échantillons d'essai SiO₂/ Si avant de le transférer sur nos puces de biocapteurs pour la fonctionnalisation des transistors.

3.3.1.1. Fonctionnalisation d'échantillons plans SiO₂/ Si

Dans un premier temps, les tests de fonctionnalisation consistent à mettre en œuvre, manuellement, des procédures de greffage de molécules d'ADN sondes ou *ssDNA* (*single strand DNA*) sur des substrats de silicium plans oxydés par oxydation thermique à 800°C. Les plaques de silicium dont sont issus les échantillons sont des plaques de silicium non dopés de 100 mm de diamètre et d'épaisseur 725 µm (CIME/Minatec, Grenoble). Après oxydation, l'épaisseur de SiO₂ est de 93 nm. Chaque plaque de silicium est ensuite découpée en lamelles mesurant chacune 10 mm × 10 mm. L'épaisseur d'oxyde thermique (93 nm) correspond à un optimum d'épaisseur pour laquelle l'intensité de fluorescence

Chapitre 3 : Fonctionnalisation des nanofils de Si

réfléchi est maximale ¹²⁹. Après fonctionnalisation puis hybridation des brins d'ADN greffés avec des brins d'ADN complémentaires fluorescents, nous évaluons les surfaces fonctionnalisées à l'aide de micrographies capturées par microscopie de fluorescence.

Différentes séquences d'oligonucléotides sont choisies et utilisés dans nos travaux. Une liste en est reportée dans le **Tableau 1**. Toutes nos molécules d'ADN sont fournies par Merck, France.

Nous avons utilisé deux types de sondes : une sonde longue « *EGFR* » de 35 bases (ou nucléotides), et une sonde courte de 14 bases (outré l'espaceur de 6×T).

La molécule d'ADN « *EGFR* » est une séquence extraite d'une version mutée du gène *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Dans un état normal (fonctionnel, non muté), ce gène code pour une protéine (tyrosine kinase), impliquée dans les voies métaboliques de différenciation cellulaire, de prolifération cellulaire, et d'apoptose. Une mutation génétique dans la séquence de ce gène peut induire une surexpression de la protéine codée (protéine du même nom, *EGFR*), avec pour conséquence, une surpopulation de cette protéine, observée dans plusieurs cas de cancers (carcinomes mammaires, coliques, et bronchiques) ¹³⁰.

La séquence courte correspond à une séquence d'étude utilisée dans le cadre d'une collaboration avec le CEA-LETI/DTBS.

Ces deux types de sondes sont complémentaires à la séquence cible correspondante appelée « séquence cible intégrale ». En outre, nous disposons de séquences sondes non complémentaires à la cible. Celles-ci ont été utilisées dans le but d'étudier les résultats d'expériences d'hybridations non complémentaires.

Les molécules d'ADN ont été modifiées au cours de leur synthèse respective. Les molécules *ssDNA* sont conjuguées avec un groupement amine au niveau de leur extrémité 5', afin de pouvoir les conjuguer aux intermédiaires de couplage, qui seront eux-mêmes ancrés à la surface du substrat. Les molécules d'ADN cibles, notés *tDNA* pour (*target DNA*) sont conjuguées avec une molécule fluorescente au niveau de leur extrémité 5'. Cette molécule fluorescente est la cyanine 3 ou indodicarbocyanine, communément notée Cy3. La Cy3 est un marqueur fluorescent de choix. Très utilisée dans la littérature¹³¹, elle présente les avantages de solubilité en phase aqueuse, de stabilité physicochimiques en cas de variations de pH entre 3 et 10, et de photo-stabilité dans le temps. La Cy3 absorbe dans le vert (~520 nm) et émet dans le rouge (~615 nm). Ce marqueur optique nous permet une traçabilité des molécules *tDNA* lors des sessions d'imagerie à fluorescence.

Liste des molécules d'ADN utilisées	séquence (sens 5' > 3')	
ADN "EGFR"	séquence sonde complémentaire	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC
	séquence sonde <i>non complémentaire</i>	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGT TGG GTG GTG AGT AGG GTG AGG GGG GAA GGA GG
	séquence sonde complémentaire sur 97% des nucléotides	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA ACT CAT CAG GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTA CC
	séquence cible intégrale	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC ATG AGC TGC GTG ATG AGT TGC
	demi séquence cible (1/2)	Cy3-AGC TGC GTG ATG AGT TGC
	demi séquence cible (2/2)	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC AT
ADN d'étude "DTBS"	séquence sonde complémentaire	NH ₂ -(CH ₂) ₆ T ₆ CGG ATA CCC AAG GA
	séquence sonde <i>non complémentaire</i>	NH ₂ -(CH ₂) ₆ T ₆ TTT TTT TTT TTT TT
	séquence cible intégrale	Cy3-TC CTT GGG TAT CCG

Tableau 1 Liste des séquences des molécules d'ADN sondes et cibles utilisées dans les études d'essais de détection optique et électronique de molécules d'ADN.

Notre processus de fonctionnalisation par silanisation en phase vapeur consiste en 5 étapes qui sont illustrées sur la **Figure 35** :

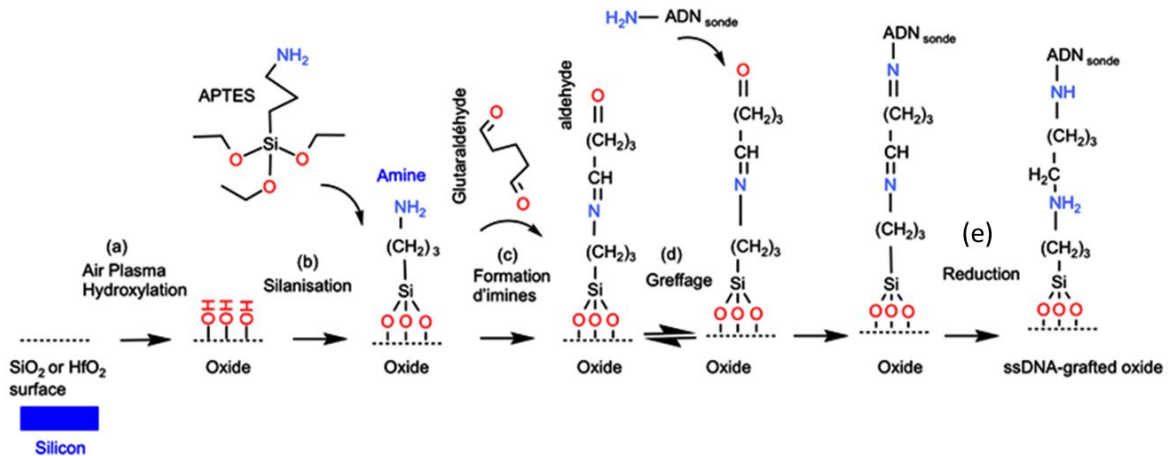


Figure 35. Illustration des différentes étapes de fonctionnalisation de surface d'oxyde par silanisation APTES/GA aboutissant au greffage covalent d'ADN sonde. (a) hydroxylation, (b) silanisation, (c) liaison de l'intermédiaire GA, (d) greffage des ssDNA, (e) réduction des imines et amines.

1. Nettoyage des échantillons et hydroxylation de surface.
2. Silanisation en phase vapeur (sous gaz inerte azote) par APTES.
3. Conjugaison de l'intermédiaire « glutaraldéhyde » (*crosslinker* aldéhydique).
4. Greffage covalent des oligonucléotides sondes (NH₂—*ssDNA*) par formations d'imines entre la couche d'agents de couplage (APTES/ GA) et l'amine en position 5' terminal des molécules *ssDNA*.
5. Réduction des liaisons imines et liaisons amines plus stables.

Le rôle du complexe APTES/GA est double : le premier est de permettre un greffage covalent, structuré et orienté des molécules *ssDNA* lorsqu'elles sont greffées sur le substrat par leurs extrémités 3' (**Figure 35 (d)**). Le second rôle est la permission d'une liberté de mouvements (liberté stérique) des *ssDNA* fixées.

Le protocole de silanisation de substrat inorganique en phase vapeur utilisé a été originellement mis au point par Fiorilli ¹³². Bien qu'ayant déjà fait l'objet d'études au sein du laboratoire LMGP (INP Grenoble), nous avons apporté quelques adaptations et optimisations, afin de l'ajuster au mieux aux objectifs de qualité de couche de fonctionnalisation fixés. Les étapes suivantes décrivent notre protocole de manipulation.

1. Préparation des échantillons SiO₂ : nettoyage et hydroxylation

Dans un premier temps, il s'agit de catalyser la production de groupements hydroxyyles à la surface de l'oxyde de silicium, qui nativement, a une surface organisée en ponts « époxy ». À cet effet, les échantillons de SiO₂ sont dégraissés et rendus propres par une série de 3 nettoyages sous ultrasons de 10 min chacun :

1. Bain d'acétone,
2. Bain éthanol,
3. Bain de rinçage avec de l'eau déionisée
4. Séchage à l'aide d'une soufflette de diazote ou d'argon.

Une fois nettoyés et séchés à l'argon, les groupements époxy surfaciques des substrats sont hydroxylés sous les actions combinées d'un plasma énergétique et de quelques molécules d'air (dihydrogène entre autres). Il se crée des groupements réactifs silanols surfaciques en substitution des ponts époxy suivant la réaction chimique : Si-O-Si + plasma énergétique Air-H₂O → Si-OH + Si-OH, **Figure 35 (a)**.

L'hydroxylation de surface est réalisée dans un Evactron® (paramétré sur 12 Watts et 4×10^{-1} Torr) durant ~5 min.

2. Silanisation « vapeur » de l'oxyde de silicium hydroxylée

Pour procéder à la silanisation de la surface (**Figure 35 (b)**), on commence par déposer un volume de 150 μ L d'APTES liquide sur une coupelle ouverte, à proximité des échantillons de SiO₂ hydroxylés. Ce dépôt d'APTES liquide est fait à l'intérieur d'une boîte à gants dont les paramètres sont contrôlés (très faible taux d'humidité de 0,8%, température ambiante de laboratoire *i.e.*, entre 20 et 25°C, atmosphère sous gaz inerte, diazote (N₂)).

Les échantillons de silicium hydroxylés, ainsi que le volume d'APTES déposé dans une coupelle sont insérés dans une enceinte en téflon, vissée hermétiquement au sein de la boîte à gant. Puis l'enceinte en téflon est transférée dans un four à 80°C pendant 45 min. Pendant ce temps réactionnel d'évaporation de l'APTES, les groupements éthoxy des molécules d'APTES s'hydrolysent (transformation des groupements éthoxy en groupements silanols, *i.e.*, Si-OCH₂CH₃ en Si-OH, suivie d'une libération de molécules d'éthanol CH₃-CH₂-OH).

Simultanément, les groupements silanols de l'APTES « s'homocondensent » pour former des polymères d'APTES et « s'hétérocondensent » avec les groupements hydroxyles surfaciques de l'oxyde de silicium. Cette « polycondensation » crée un polymère continu d'APTES structuré par des liaisons hydrogènes « silanol/ silanol ».

Après un rinçage des substrats avec de l'éthanol, (5 min sous agitateur Rotamax® à 50 *rpm*) afin d'éliminer les molécules d'APTES n'ayant pas réagi, une cuisson finale de déshydratation (1h à 110°C) de la couche d'APTES en place permet de déshydrater les hydroxyles et mène à la production de liaisons covalentes fortes de type siloxane, entre les monomères du polymère d'APTES et entre la surface de l'échantillon de silicium et la couche d'APTES.

La silanisation par les molécules d'APTES en phase vapeur est préférée à la silanisation « APTES » en phase liquide (où le substrat Si/SiO₂ est immergé), car elle permet de réduire la formation de multicouches désorganisées, fragiles, et sujettes à des réactions d'hydrolyse (**Figure 34**).

Comme en phase liquide, les paramètres influençant la qualité de la couche produite sont la concentration de l'APTES (mis à évaporer), la durée de la réaction de silanisation, la température du four, et le niveau d'humidité dans l'environnement de réaction.

Dans notre cas, la quantité d'APTES déposée est un compromis qui, en théorie, permet de limiter la formation de multicouches, tout en étant en excès vis-à-vis du nombre de sites hydroxyles libres sur le substrat SiO₂ (3 groupements hydroxyles/ nm²)¹³³.

3. Conjugaison de l'intermédiaire « glutaraldéhyde »

Après la phase de silanisation, les échantillons sont immergés sous une solution de glutaraldéhyde à 0,5 \times , placée sous rotateur à 50 *rpm*, durant 90 min, à température ambiante. Le glutaraldéhyde est un dialdéhyde saturé de formule C₅H₈O₂, communément utilisé comme intermédiaire réactionnel (*crosslinker*) pour lier deux groupements amines distincts.

Dans nos cas, le glutaraldéhyde est inséré en tant que molécule d'ancrage à double extrémité d'accroche, pour lier d'une part les groupements amines présentés par la couche d'APTES, et d'autre part, les groupements amines portés par les molécules *ssDNA* à leur extrémité 5' (**Figure 35 (c)**). En pratique, l'atome d'azote de la fonction amine (-NH₂ nucléophile) de la molécule d'APTES attaque spontanément le carbone de l'une des deux fonctions aldéhydes du glutaraldéhyde, entraînant la formation d'une imine (base de Schiff), et le départ d'une molécule d'H₂O.

Cette étape d'insertion de la couche de GA est suivie de 2 étapes de rinçage consécutifs des échantillons à l'eau déionisée pendant 5 min, sur un rotateur réglé sur 50 *rpm*. Nos échantillons sont par la suite séchés à l'argon et sont prêts pour l'étape de greffage des *ssDNA*.

4. Greffage covalent des molécules NH_2 -*ssDNA*

La solution de dilution des *ssDNA* est concentrée à 10 μM . Précisons que cette concentration peut varier d'une expérimentation à une autre, notamment pour évaluer l'impact de la concentration en *ssDNA* sur la quantité de fluorescence résultante du taux d'hybridation des *tDNA* complémentaires.

Les solutions « mères » de stockage des *ssDNA* sont concentrées à 200 μM (*ssDNA* lyophilisé + H_2O déionisée). Les solutions « filles » contiennent du *ssDNA*, diluée dans un tampon phosphate dibasique de pH 9,2, composé de 4% $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_2\text{O}$.

Sur les échantillons SiO_2/Si de tests, nous déposons les molécules de *ssDNA* suivant deux méthodes de dépôt :

- soit en microgouttes de 2 μL chacune, comme illustré sur la [Figure 36.3](#),
 - soit en une goutte unique de 90 μL de volume, recouvrant toute la surface de l'échantillon, préalablement séparée en 2 zones ([Figure 36.4](#)) :
1. une zone fonctionnalisée qui va présenter les intermédiaires APTES/GA nécessaires au greffage des *ssDNA*,
 2. une zone SiO_2 non fonctionnalisée, créée en masquant ces zones à l'aide d'un ruban adhésif pendant l'hydroxylation et la silanisation. Quant au ruban adhésif, ses propriétés de résistance à la chaleur et de « non-contamination » des surfaces en laissant des résidus de colle, ont été préalablement testées.

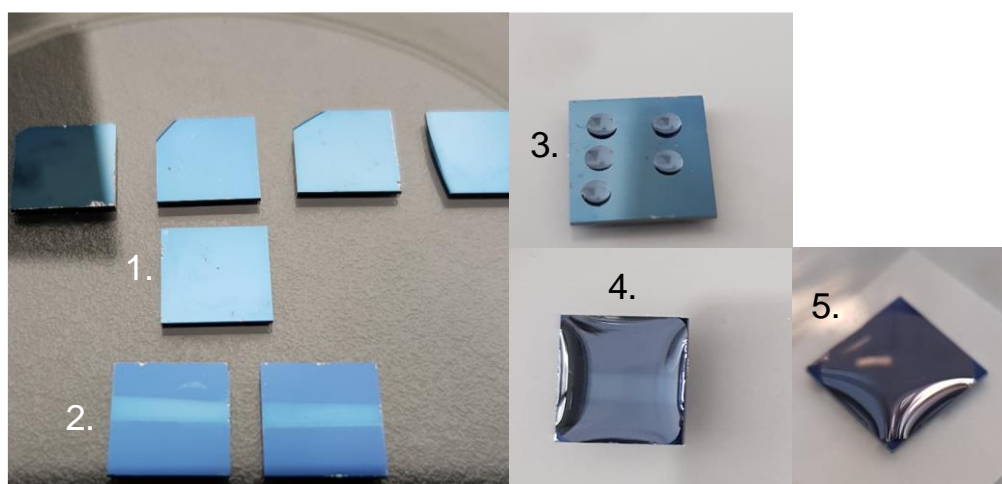


Figure 36. 1. Échantillon SiO_2 silanisé. L'échantillon mesure 1 cm \times 1 cm de côté. 2. Échantillon présentant deux zones, l'une silanisée (claire) et l'autre non silanisée (foncée). 3. Échantillon après dépôt de quelques gouttes de 2 μL chacune, de *ssDNA*. 4. Échantillon après dépôt d'une goutte unique de 90 μL de *ssDNA*. 5. Vue de côté de la goutte de 90 μL de *ssDNA*.

L'objectif de cette seconde méthode de dépôt est d'évaluer le niveau de bruit de fond généré par l'adsorption non spécifique de molécules de *tDNA* sur une surface non fonctionnalisée *i.e.*, sans APTES/GA (surface masquée pendant les étapes d'hydroxylation et de silanisation). En effet, la

différence principale entre ces deux méthodes de dépôt des *ssDNA* est la présence ou l'absence de groupements hydroxyles et d'APTES à la surface des **régions non greffées** (*i.e.*, *sans ssDNA*).

La réaction spontanée d'attachement des **amines** des *ssDNA* sur les **aldéhydes de la couche de GA** (**Figure 35 (d)**) s'effectue en 2 heures (ou parfois, nous avons laissé les échantillons sur la durée d'une nuit pour un avancement de réaction suffisant). Puis les échantillons subissent un rinçage de 5 min à l'eau déionisée, sous rotateur, 50 *rpm*, afin d'enlever les molécules d'ADN non liées et les résidus salins parfois observés.

Par ailleurs, à ce stade, nous avons voulu estimer la quantité d'ADN greffé à partir des deux volumes de gouttes sur les deux types de surfaces. En effet, déposer un volume de 90 μL de *ssDNA* peut induire une diminution du taux d'hybridation dû à la surcharge de densité des *ssDNA* à la surface des échantillons. En fait, cette surcharge de densité surfacique peut gêner l'insertion et l'hybridation des *tDNA*¹³⁴. Il est alors nécessaire d'apporter cette précision concernant les différences de volumes déposés et donc de quantités de molécules de *ssDNA* déposées pour chacune des 2 techniques de dépôt.

Pour une même concentration de *ssDNA*, déposer 90 μL ou 2 μL revient à déposer 45 fois plus ou moins de *ssDNA* dans un cas ou dans l'autre.

A partir de la relation $n = C \times V$, avec « n » exprimée en moles (unité mol), la **quantité** de matière absolue dans le volume déposé, « C » : exprimée en moles par litre ($\text{mol} \times \text{L}^{-1}$), la concentration molaire, et « V », exprimée en litre (L), le volume déposé, on peut estimer la quantité de molécules déposées.

On peut également évaluer la quantité de *ssDNA* maximale que peut accepter la surface de SiO_2 (**Figure 37**).

Une surface de SiO_2 standard présente une densité moyenne de **3 sites silanols/nm²**¹³³.

Une molécule d'APTES conjuguée à une molécule de glutaraldéhyde recouvre une surface de l'ordre du **nm²**¹³⁵.

Une molécule d'ADN hybridée (*ssDNA* \times *tDNA*) a un diamètre de 2,6 nm soit un recouvrement surfacique minimal de $\pi \times r^2$ soit **5,3 nm²** (si on fait l'approximation que la double hélice d'ADN est un cylindre posé verticalement sur la surface du SiO_2).

Puisque la surface occupée par la molécule d'ADN est supérieure à la surface des intermédiaires de greffage (5,3 nm² vs ~ 1 nm²), on ne considèrera que la surface la plus importante car c'est elle qui est limitante en termes d'encombrement stérique.

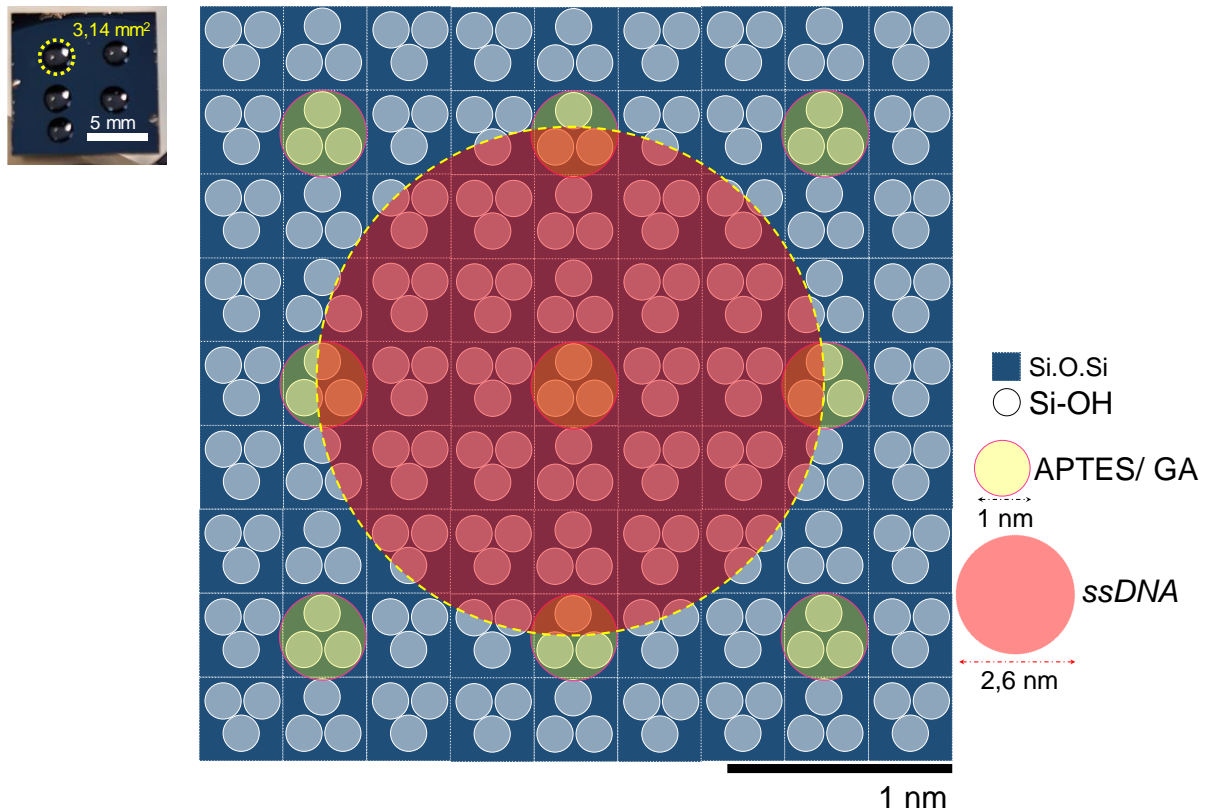


Figure 37. Photo des gouttes de 2 μL sur l'échantillon SiO_2/Si (gauche) et schéma de coupe d'une molécule de *ssDNA* greffée et hybridée sur une surface de SiO_2 hydroxylée (empilement vu du dessus et en transparence des sites hydroxylés, des sites d'APTES/GA et d'une molécule de *ssDNA* greffée et hybridée).

La quantité de molécules de *ssDNA* présentes dans une goutte de 2 μL est de $1,24 \times 10^{13}$.

Le détail du calcul permettant l'obtention de cette valeur de quantité est présenté :

$$n \ll \text{molécules} \gg = C \times V \times N_A,$$

$$C = 10 \mu\text{M}, V = 2 \mu\text{L}, \text{ et } N_A, \text{ nombre d'Avogadro} = 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}.$$

$$n \ll \text{molécules} \gg = 10 \times 10^{-6} \text{ mol} \times \text{L}^{-1} \times 2 \times 10^{-6} \text{ L} \times 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1} = 1,24 \times 10^{13}.$$

A l'interface entre la goutte de 2 μL déposée et la surface de SiO_2 hydroxylée, il y a une surface de $3,14 \times 10^{12} \text{ nm}^2$. Le nombre maximal de molécules de *ssDNA* pouvant être greffées à cette interface est de $3,14 \times 10^{12} \text{ nm}^2 / 5,3 \text{ nm}^2$ soit $5,9 \times 10^{11}$ (590 milliards *ssDNA* sur $3,14 \text{ nm}^2$ de SiO_2).

Cette surface à l'interface dispose d'un nombre excédentaire de $3,14 \times 10^{12}$ sites APTES/GA, à raison d'un recouvrement d'un nm^2 par site APTES/GA. Le rapport entre le nombre de sites d'ancrage APTES/GA et la quantité de *ssDNA* pouvant se fixer à l'interface sous une goutte de 2 μL est de $\sim 5,3$. Il y a environ 5 sites d'ancrage APTES/GA disponibles pour fixer un *ssDNA* si on considère une efficacité de greffage de « $1 \div 1, \text{ APTES/GA} \div \text{ssDNA}$ ».

Dans le cas de la goutte unique de 90 μL déposée sur toute la surface de l'échantillon, celle-ci recouvre une surface de 1 cm^2 ou 10^{14} nm^2 . A cette interface, le nombre maximal de molécules de *ssDNA* pouvant être greffés est de $10^{14} \text{ nm}^2 / 5,3 \text{ nm}^2$ soit $1,8 \times 10^{14}$. Le rapport entre le nombre de sites d'ancrage APTES/GA et le nombre de molécules de *ssDNA* à cette interface de la goutte de 90 μL est de $1/1,8$. Si on considère une efficacité de greffage de « $1 \div 1, \text{ APTES/GA} \div \text{ssDNA}$ », il y a $\sim 0,5$ sites d'ancrage APTES/GA pour fixer un *ssDNA*.

On peut constater qu'on est sur des rapports différents et inversés. Dans le cas où une microgoutte de 2 μL de sondes est déposée, il y a un *ssDNA* pour ~ 5 sites de greffage APTES/GA. Dans le cas d'un

dépôt de 90 μL de sondes, il y a environ deux *ssDNA* par site de greffage APTES/GA. Suivant le rapport d'efficacité de greffage des sondes sur les sites de greffage APTES/GA, l'une ou l'autre des techniques de dépôt peut induire un déficit (méthode de dépôt n° 1, **Figure 36.3**) ou un excès léger de *ssDNA* à la surface des échantillons (méthode de dépôt n°2, **Figure 36.4**). Toutes ces données sont résumées dans le **Tableau 2**.

Nous pensons que les excès légers de *ssDNA* peuvent augmenter les chances d'obtention d'un greffage dense des surfaces fonctionnalisées et greffées. Ces précédents chiffres apportent la notion que les quantités utilisées de *ssDNA* doivent être maîtrisées pour ne pas induire de défaut en termes de densité de greffage, ou au contraire, d'excès trop important de molécules sondes à la surface de l'échantillon, afin d'optimiser l'avancement de la réaction d'hybridation des molécules cibles *tDNA* lorsqu'elles sont complémentaires aux *ssDNA*.

Nombre de groupements hydroxyles/ nm^2 pour un oxyde de type SiO_2 hydroxylé	$3 \times \text{SiOH} / \text{nm}^2$
Surface de substrat occupée par unité d'intermédiaires de couplage APTES/ GA	1 nm^2
Surface minimale occupée par un double brin <i>ssDNA</i> \times <i>tDNA</i>	$5,3 \text{ nm}^2$
Surface occupée par une goutte de $2 \mu\text{L}$ déposée sur SiO_2	$3,14 \times 10^{12} \text{ mm}^2$
Surface d'un échantillon SiO_2	10^{14} nm^2
Capacité maximale de greffage des <i>ssDNA</i> sur $3,14 \text{ mm}^2$	$5,9 \times 10^{11}$
Capacité maximale de greffage des <i>ssDNA</i> sur 1 cm^2	10^{14}
Nombre de molécules <i>ssDNA</i> dans $2 \mu\text{L}$ à $10 \mu\text{M}$	$1,24 \times 10^{13}$
Nombre de molécules <i>ssDNA</i> dans $90 \mu\text{L}$ à $10 \mu\text{M}$	$55,8 \times 10^{13}$
Ratio « nombre de molécules déposée/ capacité de surface » (dépôt $2 \mu\text{L}$)	0,18
Ratio « nombre de molécules déposée/ capacité de surface » (dépôt $90 \mu\text{L}$)	1,8
Quantité <i>ssDNA</i> dans $2 \mu\text{L}$ à $10 \mu\text{M}$	$2 \times 10^{-11} \text{ mol}$
Nombre de <i>ssDNA</i> dans $2 \mu\text{L}$ à $10 \mu\text{M}$ (Quantité $\times N_A$)	$1,204 \times 10^{13}$
Quantité <i>tDNA</i> dans $2 \mu\text{L}$ à $2 \mu\text{M}$	$4 \times 10^{-12} \text{ mol}$
Nombre de <i>tDNA</i> dans $2 \mu\text{L}$ à $2 \mu\text{M}$ (Quantité $\times N_A$)	$2,408 \times 10^{12}$
Quantité <i>ssDNA</i> dans $90 \mu\text{L}$ à $10 \mu\text{M}$	$9 \times 10^{-10} \text{ mol}$
Nombre de <i>ssDNA</i> dans $90 \mu\text{L}$ à $10 \mu\text{M}$ (Quantité $\times N_A$)	$5,418 \times 10^{14}$
Quantité <i>tDNA</i> dans $90 \mu\text{L}$ à $2 \mu\text{M}$	$1,80 \times 10^{-9} \text{ mol}$
Nombre de <i>tDNA</i> dans $90 \mu\text{L}$ à $2 \mu\text{M}$ (Quantité $\times N_A$)	$1,0836 \times 10^{15}$

Tableau 2. Tableau récapitulatif des caractéristiques des échantillons et des quantités de molécules d'ADN contenues dans les solutions de greffage et d'hybridation utilisées.

5. Stabilisation de la couche greffée : réduction des imines en amines et des aldéhydes en alcools

Les doubles liaisons des imines ($\text{C}=\text{N}$) et les doubles liaisons des groupements aldéhydes surnuméraires ($\text{C}=\text{O}$), *i.e.*, aldéhydes n'ayant pas réagi lors de l'étape de liaison des *ssDNA*, sont réduites en liaisons simples lors d'une réaction de réduction des liaisons doubles (**Figure 35 (e)**). À cet effet, les échantillons sont immergés pendant 60 min dans une solution de NaBH_4 (tétrahydruoborate de sodium) concentrée à 0,35% (« g/mL », $\text{NaBH}_4 / \text{H}_2\text{O}$). Cette réaction produit un dégagement bulleux de dihydrogène. Les liaisons simples $\text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{R}'$ et $\text{X}-\text{C}-\text{OH}$ sont chimiquement plus stables que les liaisons doubles ($\text{R}-\text{HC}=\text{N}-\text{R}'$) et $\text{X}-\text{HC}=\text{O}$ respectivement, justifiant alors que nous procédions systématiquement à cette réaction de réduction.

À cette étape, les molécules de *ssDNA* sont greffées sur nos échantillons par l'intermédiaire de liaisons covalentes (**Figure 38**).

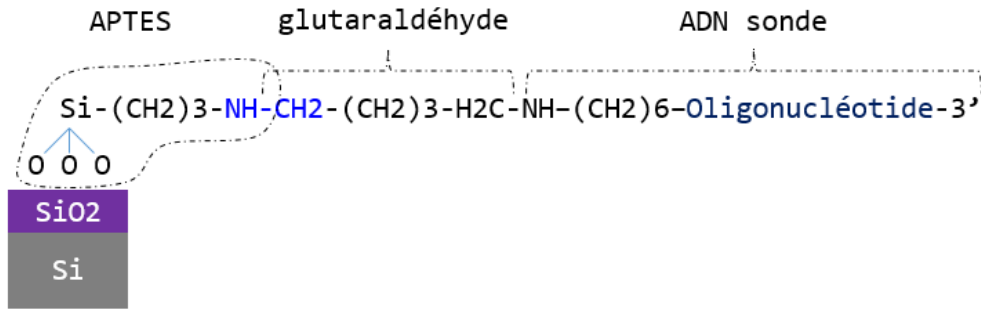


Figure 38. Illustration d'une molécule de *ssDNA* greffée à la surface d'un SiO₂ silanisé.

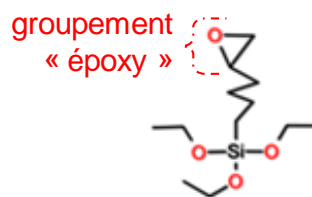
6. Rinçages des surfaces fonctionnalisées

Les échantillons sont rincés afin d'éliminer les traces de réactifs présents en surplus sur leur surface. Le rinçage des échantillons est réalisé en une succession de plusieurs rinçages consécutifs. Un premier rinçage sommaire des échantillons à l'eau déionisée est effectué. Un second rinçage à l'eau déionisée sous rotateur (50 *rpm*) pendant 5 min est effectué. Un lavage au SDS (sodium dodecyl sulfate) 0.2% est réalisé pendant 5 min sous rotateur (50 *rpm*). Le SDS est un détergent anionique utilisé en routine pour retirer les graisses. Enfin, deux autres rinçages à l'eau déionisée de 5 min chacun sont effectués et sont suivis d'un séchage à la soufflette « argon ».

On peut remarquer qu'à cette étape du greffage, des expérimentations de caractérisation de surface pourraient déjà permettre d'évaluer l'état de surface des échantillons (densité et homogénéité des *ssDNA*, vérification des régions de localisation des *ssDNA* (spécificité de localisation ou non). Ces expérimentations pourraient être réalisables par des techniques de caractérisation telles que la microscopie AFM et la spectroscopie XPS, ne nécessitant pas de tags fluorescents. Notons toutefois que ces caractérisations prennent plus de temps à être menées.

3.3.2. Méthode 2 : fonctionnalisation par silanisation en phase liquide, EHTES

Les principales différences entre la silanisation « APTES/ GA » et la silanisation « EHTES » se situent dans le procédé de l'étape de silanisation qui suit l'hydroxylation et qui permet le greffage des *ssDNA* **directement** sur l'ETHES. Ainsi cela permet d'éviter l'étape de la conjugaison du *crosslinker* GA. Toutes les autres étapes de ces deux méthodes de silanisation sont similaires. Ce protocole a été réalisé au CEA-LETI/DTBS. La molécule d'ETHES est représentée sur la **Figure 39**, suivie par les principales étapes du protocole de greffage des molécules d'ADN sondes (**Figure 40**).



5,6-époxyhexyltriéthoxysilane ou EHTES

Figure 39. Illustration d'une molécule de 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane (EHTES).

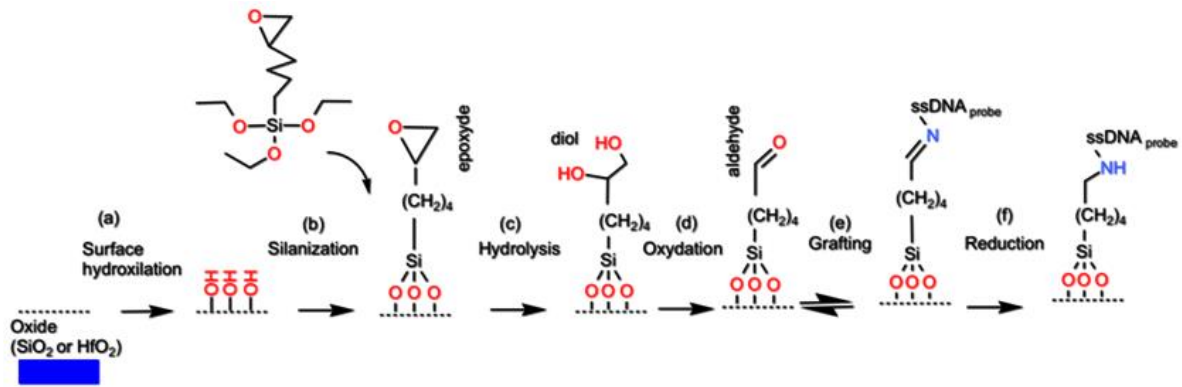


Figure 40. Illustration des différentes étapes de fonctionnalisation de surface d'oxyde par silanisation EHTES.

1. Silanisation et greffage des sondes

Après les étapes de nettoyage et d'hydroxylation (**Figure 40 (a)**), les échantillons sont immergés dans un pot en téflon contenant 0,12% de EHTES et 3,4% de triéthylamine dans un volume important de toluène liquide. Le pot en téflon est vissé hermétiquement et inséré dans un four à 80°C pendant une durée de 16 heures (**Figure 40 (b)**).

Après la silanisation, une cuisson de déshydratation à 110°C durant 180 min est réalisée pour catalyser la production des ponts siloxanes qui structurent le polymère de silane EHTES et établissent les liaisons covalentes entre le polymère et la surface de l'oxyde.

Les échantillons sont ensuite immergés et mis à réagir dans de l'acide sulfurique (H_2SO_4 , 5%, 120 min) dans l'objectif d'hydrolyser le groupement terminal « époxy » du silane EHTES en « diol » (**Figure 40 (c)**). Puis en immergeant pendant 60 min les échantillons dans une solution de périodate de sodium ($NaIO_4$) concentrée à $0,1 \text{ mol} \times L^{-1}$, les diols s'oxydent et forment des groupement aldéhydes (**Figure 40 (d)**). Ces traitements sont suivis chacun d'un rinçage à l'eau déionisée et d'un séchage à la soufflette « argon ».

Les gouttes de NH_2 -ssDNA diluées dans du tampon formiate de potassium concentré à 2 M sont déposées directement après le séchage des échantillons. Les extrémités amines de ces molécules sondes peuvent alors réagir spontanément avec les molécules de EHTES qui présentent des aldéhydes, sans étape supplémentaire d'introduction de *crosslinker* ou d'intermédiaire de liaison (**Figure 40 (e)**).

2. Dépôts localisés de plots de sondes à l'aide d'un robot de dépôt

Le dépôt des molécules sondes $\text{NH}_2\text{-ssDNA}$ a été réalisé à l'aide d'un robot de dépôt (**Figure 41**). Des microgouttes d'environ 300 pL sont déposées sur la surface des échantillons silanisés. L'intérêt de ce dépôt réside dans la reproductibilité du dépôt, dans la localisation précise du dépôt sur une position choisie, et dans son automatisation.

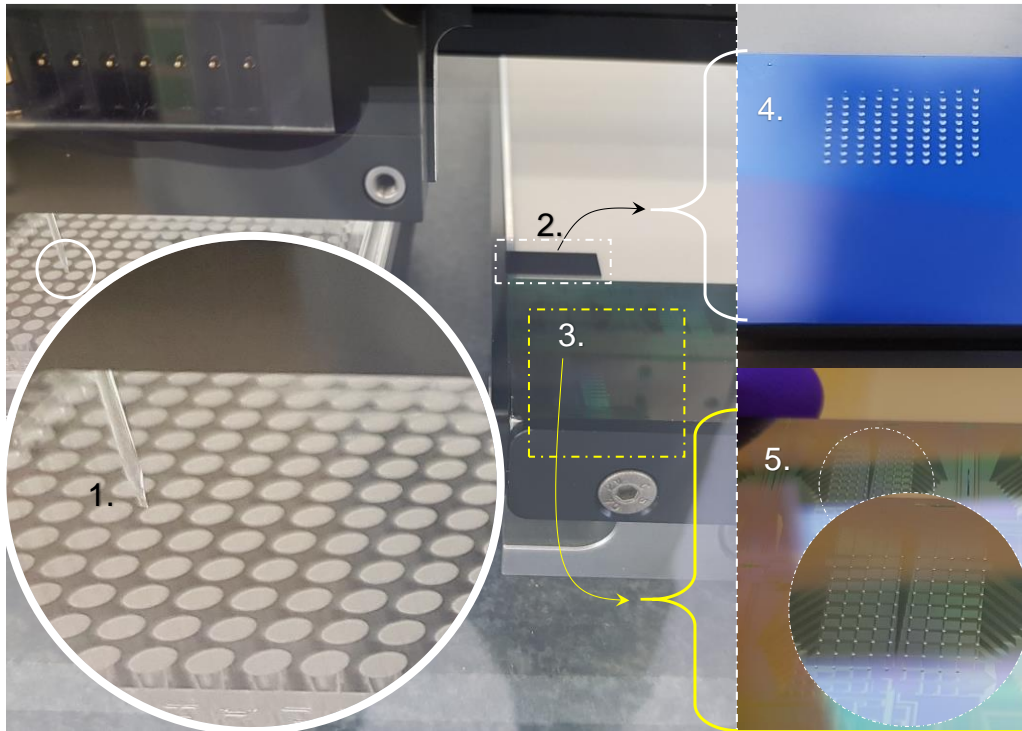


Figure 41. Banc de microdépôts (Sciencion, Sciflexarrayer). 1. Bec de « spotting » du robot de dépôt. 2. Echantillon « contrôle » de SiO_2 silanisé. 3. Pucelles de bioFETs dont les oxydes de grille sont silanisés. 4. Microgouttes de *ssDNA* déposées sur SiO_2 . 5. Microgouttes de *ssDNA* déposées localement sur les régions où sont gravées les cavités des dispositifs à nanofils de Si de la région « matrice ».

3.3.3. Caractérisation optique des échantillons fonctionnalisés

Nous avons caractérisé nos surfaces fonctionnalisées de manière indirecte, en microscopie de fluorescence. A cet effet, nous avons réalisé des essais d'hybridation par dépôt des molécules de *tDNA* conjuguées à la Cy3 (*tDNA*-Cy3). Cette Cy3 permet d'évaluer indirectement par fluorescence l'état de surface des échantillons. En effet, les *tDNA* complémentaires s'hybrident aux *ssDNA* et permettent l'obtention d'une image relative au profil de greffage des *ssDNA* sur la surface de l'échantillon.

3.3.3.1. Préparation des échantillons pour les sessions d'imagerie en microscopie à fluorescence

En cas de complémentarité de séquence entre les molécules de *ssDNA* greffées sur l'échantillon de Si et les molécules de *tDNA* fluorescents utilisées, une hybridation de ces deux oligonucléotides a lieu (nous décrivons l'environnement expérimental d'hybridation ultérieurement), et l'état hybridé « *ssDNA* × *tDNA* » peut être observé en microscopie de fluorescence. Néanmoins, précisons qu'un *tDNA*-Cy3 émettra systématiquement un signal de fluorescence lorsqu'excité (520 nm) par la source lumineuse du microscope à fluorescence, quel que soit l'état hybridé ou non hybridé, dans lequel il se trouve à la surface de l'échantillon. En effet, il peut être hybridé spécifiquement à une sonde *ssDNA* ou adsorbé de façon non spécifique sur la surface.

Pour observer un tel signal de fluorescence, plusieurs paramètres doivent concorder : les réglages de la caméra de capture doivent être optimaux, le substrat Si doit avoir une certaine épaisseur donnée de silice, favorable à la propagation constructive des ondes de fluorescence (ici, SiO₂ 93 nm / Si *bulk* 725 μm), l'échantillon ne doit pas avoir une fluorescence propre similaire à la fluorescence émise par la Cy3, les états de « blanchiment » des Cy3 doivent être vérifiés. Un marqueur de fluorescence « photoblanchi » (non fonctionnel) n'émet pas de signal de fluorescence.

Dans le cas où toutes les précédentes conditions sont validées, le résultat de fluorescence peut être interprété de façon binaire : un signal de fluorescence non nul indique une présence de *tDNA*-Cy3. Une absence de signal de fluorescence indique une absence de *tDNA*-Cy3.

3.3.3.2. Environnement expérimental d'hybridation

Dans le cas où les molécules de *ssDNA* sont déposées manuellement sous forme de microgouttes (**Figure 36.3**) ou dispensées par un automate de dépôt (**Figure 41**), après greffage, les zones greffées via ces sondes forment un *spot* de forme circulaire appelé « *spot* de *ssDNA* » ou « *plot* de *ssDNA* ».

Pour procéder à l'hybridation, une goutte de 2 μL de *tDNA*-Cy3 concentrée à 2 μM est déposée au contact du *plot* de *ssDNA*.

Le nombre de molécules de *tDNA* contenues dans une goutte de 2 μL de solution cible est de 4×10^{-12} mol (cf. **Tableau 2**), soit $2,4 \times 10^{12}$ *tDNA*. Si les *ssDNA* sont effectivement greffées dans un rapport de « 1÷1, APTES/GA÷*ssDNA* » i.e., $5,9 \times 10^{11}$ *ssDNA* sur un *spot* circulaire de surface $3,14 \times 10^{12}$ nm², alors il y a **4 fois plus** de molécules de *tDNA*-Cy3 disponibles pour une probable hybridation, que de *ssDNA* greffées sur la surface. En théorie, en considérant un taux d'hybridation *ssDNA*/*tDNA*-Cy3 de 1/1, on peut remarquer que les *tDNA*-Cy3 sont déposées en excès. En pratique, un excédent de molécules cibles n'est pas contraignant si on considère que toutes les molécules excédentaires sont efficacement éluées avec les solutions de rinçage, après les étapes d'hybridation. Cet excès de molécules cibles est alors plutôt souhaité.

La microgoutte de 2 μL de *tDNA*-Cy3 déposée est ensuite répartie sur toute la surface de l'échantillon à l'aide d'un film plastique semi dur HybriSlip®.

Ce complexe réactionnel est placé dans un cristalliseur à fort taux d'humidité (>80%), puis introduit dans une étuve à 75°C (*T_m* (*melting temperature*) des *ssDNA* calculée *via Oligo calc tool*) pendant 30 min. Puis la température est abaissée à 50°C, durant 30 min. A 75°C, nos oligonucléotides de *ssDNA* et

de *tDNA*-Cy3 qui pourraient avoir des conformations repliées (repléments « tige-boucle ») se déplient en brins linéaires sous l'effet de l'énergie thermique. À la suite de cette étape de linéarisation des oligonucléotides à température élevée, la réaction d'hybridation peut s'effectuer. L'avancement de celle-ci dépend de la température, de la durée (en particulier), de l'hygrométrie, du pH, et de la nature du tampon d'hybridation.

À 50°C, l'hybridation des *ssDNA* et de *tDNA*-Cy3 peut débuter. Puis, le cristalliseur est sorti de l'étuve et mis à refroidir sous hotte pendant au moins 15 min. Ainsi, le temps d'hybridation total est de 45 min au minimum. Ce temps total d'hybridation peut être rallongé à plusieurs heures à faible température (40°C), voire à température ambiante, pour que l'hybridation ait un avancement maximal.

Dans le cas où les molécules de *ssDNA* sont déposées sur toute la surface de l'échantillon (**Figure 36.4**), une goutte de 90 µL de molécules de *tDNA*-Cy3 à concentration de 2 µM est déposée sur la surface du substrat. Ce volume immerge ainsi complètement la surface de l'échantillon.

3.3.3.3. Rinçages post-hybridation

À la suite de l'hybridation, les échantillons sont rincés à partir de solutions salines de citrates (SSC, pH 7) de concentrations décroissantes 2× et 0,2× pendant 2 min de rinçage (150 rpm) pour chaque concentration, avant un ultime rinçage de 2 min à l'eau déionisée et un séchage délicat à la soufflette « argon ». Le but de ce rinçage est d'éliminer les molécules cibles non hybridées et donc théoriquement non fixées. Les sels contenus dans ces solutions de rinçage ont pour rôle de fixer les molécules d'ADN libres et d'entraîner leur élution. Les échantillons sont ensuite conservés à l'abri de la lumière (celle-ci pourrait en effet détériorer les Cy3). À cette étape, la surface des échantillons peut être caractérisée en microscopie à fluorescence.

3.3.4. Caractérisation des surfaces fonctionnalisées et greffées

3.3.4.1. Généralités sur la microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence est une technique de caractérisation optique fréquemment utilisée en biologie. Cette technique permet de visualiser les microstructures que la résolution de la microscopie optique classique ne permet pas d'observer (*i.e.*, matériel génétique fluoromarké, protéines fluoromarkées, autres microstructures fluoromarkées). La microscopie en fluorescence peut également permettre un suivi dynamique des interactions qui se font parmi des macromolécules fluoromarkées présentes dans un environnement réactionnel. Les microscopes à fluorescence utilisent plusieurs filtres monochromatiques interchangeables qui permettent de filtrer la lumière blanche émise par la source lumineuse (lampe tungstène ou LED) et d'émettre la longueur d'onde d'excitation spécifique du marqueur fluorescent utilisé.

Dans le cas de la Cy3, cet optimum d'excitation se trouve à **520 nm**. À la suite de son excitation, la Cy3 revient à son état initial relaxé en émettant des photons d'une longueur d'onde d'émission spécifique (entre ~**565 nm** et ~**615 nm** suivant le type de Cy3 considéré). Ces photons sont collectés par un imageur *CCD* ou *CMOS* et convertis en image par un processeur.

Comme précédemment mentionné, l'intensité des photons captés par l'imageur dépend de plusieurs facteurs, dont celui de l'épaisseur de la couche d'oxyde de silicium SiO_2 présente sur le substrat. Effectivement, il a été démontré par des calculs d'optique géométrique et des expérimentations que l'intensité de fluorescence mesurée post-excitation d'un marqueur de fluorescence tel que la Cy3 dépend de l'épaisseur de SiO_2 présente sur l'échantillon. En effet, ces molécules doivent se localiser à une distance « delta » du plan miroir situé à l'interface SiO_2/Si afin que les champs d'ondes d'excitation de la source lumineuse et ceux d'émission du marqueur de fluorescence interfèrent de façon constructive^{129,136,137}.

3.3.4.2. Interprétation d'une micrographie de fluorescence et descriptif du matériel de microscopie à fluorescence utilisé

1. Interprétation d'une micrographie

Lors de la caractérisation de la surface d'un échantillon par imagerie de fluorescence, les *duplex ssDNA* \times *tDNA*-Cy3 permettent d'obtenir une surface qui émet de la fluorescence sur les régions de greffage des plots de *ssDNA* ou de larges régions de *ssDNA*. En effet, en théorie, la configuration où les *ssDNA* et les *tDNA*-Cy3 sont complémentaires mène à des réactions d'hybridation d'ADN et donc à l'immobilisation des *tDNA*-Cy3 au contact des *ssDNA* (**Figure 42**, configuration 1).

Note sur le phénomène d'hybridation de deux molécules d'ADN complémentaires.

Dans des conditions thermodynamiques favorables de température, de pH, et de salinité, lorsqu'une molécule d'ADN arbitrairement nommée sonde (*ssDNA*) et une seconde molécule d'ADN nommée ADN cible (*tDNA*) ont des séquences nucléotidiques complémentaires, lorsqu'elles migrent l'une en direction de l'autre puis rentrent en contact, il se produit spontanément une réaction d'hybridation de ces deux molécules pour former un *duplex* de deux molécules d'ADN enroulées en hélice, l'une autour de l'autre. Ce *duplex* est le produit d'un appariement nucléotidique physique des deux séquences sonde et cible, *ssDNA* et *tDNA*, établi *via* des liaisons hydrogènes. Plus en particulier, il s'agit de **2** liaisons hydrogènes entre les paires de bases nucléotidiques complémentaires « adénine » et « thymine » (conventionnellement notés « A » et « T ») et de **3** liaisons hydrogènes s'établissant entre les paires de bases complémentaires « cytosine » et « guanine » (« C » et « G »). Notons que les paires A et C ou T et G sont non appariables entre elles (non complémentaires). C'est sur ce principe qu'est fondé la synthèse de molécules d'ADN à séquences non appariables *i.e.*, non complémentaires.

Chaque *tDNA*-Cy3 étant conjuguée par une liaison covalente forte à une Cy3, l'imagerie en fluorescence permet de révéler l'empreinte optique de chaque *tDNA*. Une micrographie de fluorescence obtenue sur la surface d'un échantillon résulte de la localisation de l'ensemble des *tDNA*-Cy3 présentes sur l'échantillon observé.

Précisons qu'en pratique, le nombre minimal de molécules fluorescentes nécessaire à la détection d'une unité de signal de fluorescence dépend aussi de la sensibilité de la caméra. Il s'agit ici de **l'efficacité quantique de la caméra** (rapport entre le nombre de photons incidents sur le capteur, et le nombre de photons collectés par le capteur). La précision quant à la position du signal de fluorescence sur l'image dépend de la résolution de la caméra (densité de pixels sur le capteur). Enfin, une caméra fiable est une caméra dont le rendu photographique est proche de la vision obtenue par l'utilisateur dans l'oculaire du microscope à fluorescence.

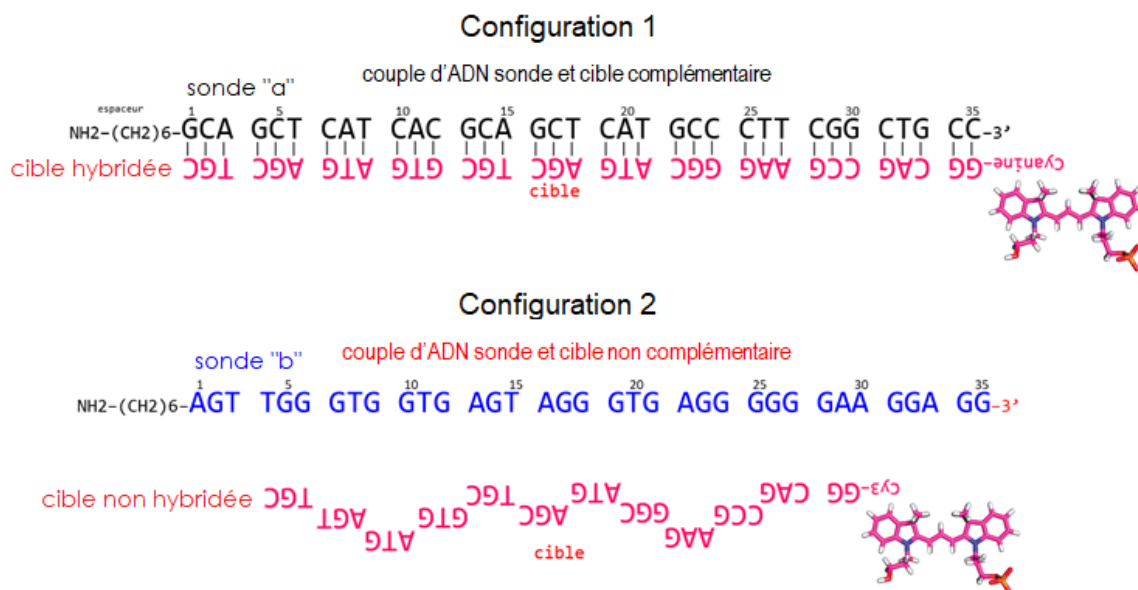


Figure 42. Duplex de ssDNA × tDNA–Cy3 (configuration 1) et contrôle négatif de non-complémentarité (configuration 2). L'exemple est donné pour les séquences EGFR complémentaire et non complémentaire, cf. **Tableau 1**, lignes n°1 et 2.

Nous avons utilisé des *ssDNA* de séquence oligonucléotidiques **non complémentaires** (Figure 42, configuration 2) comme **contrôles négatifs** (image obscure de fluorescence nulle attendue), afin d'évaluer la spécificité de la couche de *ssDNA* greffées. En effet, en cas d'incompatibilité de séquences entre les *ssDNA* et les *tDNA*–Cy3, les *duplex* ne sont pas formés et les *tDNA*–Cy3 sont éluées de la surface de l'échantillon au cours des étapes de rinçages post-hybridation.

Ainsi, les objectifs principaux de ces caractérisations de surface en fluorescence sont d'une part, l'évaluation de l'état de surface des substrats fonctionnalisés, puis d'autre part, l'évaluation de la spécificité de la couche de fonctionnalisation synthétisée.

En résumé, une micrographie de fluorescence réalisée sur un échantillon sur lequel les *duplex ssDNA* × *tDNA*–Cy3 sont formés révèle la présence des *tDNA*–Cy3 (et indirectement des *ssDNA*) par un niveau de fluorescence non nul. Une micrographie de **contrôle négatif** ne présente pas de signal de fluorescence. Néanmoins, des cas de figures de niveaux de fluorescence intermédiaires peuvent être mesurés en fonction de la quantité de *ssDNA* greffée et donc de la quantité de *tDNA*–Cy3 hybridée.

Pour une même quantité de molécules *tDNA*–Cy3 déposées, excédentaires par rapport au nombre de *ssDNA*, l'intensité de fluorescence dépend directement de la quantité *ssDNA* préalablement greffées. La quantité de *ssDNA* définit et limite la quantité de *duplex ssDNA* × *tDNA*–Cy3 et donc la fluorescence. Cette corrélation est vérifiée jusqu'à une limite où une densité trop importante *ssDNA* va gêner l'insertion et l'hybridation *tDNA*–Cy3^{134,138}.

2. Descriptif du matériel de microscopie à fluorescence utilisé

Le microscope utilisé est un microscope à fluorescence du fabricant Olympus, référencé BX41M. Le module optique de ce microscope est conjugué à une caméra de modèle « Scion CFW-1308M » embarquant un capteur *CCD* (*charged coupled device*) monochromatique Sony (ICX205AL, https://www.1stvision.com/cameras/sensor_specs/ICX205.pdf). Cette caméra a une efficacité quantique de 45% (il existe de nos jours des capteurs ayant un rendement de 90%).

Le capteur de la caméra mesure $7,6 \times 6,2 \text{ mm}^2$. Sa surface sensible mesure $6,4 \times 4,8 \text{ mm}^2$ soit environ $0,3 \text{ cm}^2$. Sa définition est de 1360×1024 pixels (1,4 mégapixel actif). Chacun des pixels mesure $4,65 \times 4,65 \text{ }\mu\text{m}^2$ (soit environ $22 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$). La sensibilité spectrale du capteur (efficacité quantique) est maximale entre 500 et 550 nm. Cette plage de sensibilité n'est pas très bien adaptée à la longueur d'onde d'émission du fluoromarqueur utilisé (Cy3, 615 nm). Néanmoins les micrographies étaient de qualité satisfaisante, lorsque nous comparions les images numériques du capteur Sony à l'image analogique directement visible dans l'oculaire du microscope. L'efficacité quantique du capteur utilisé étant de 45%, cela signifie que pour 100 photons émis par fluorescence des Cy3, 45 photons sont effectivement restitués par la caméra en intensité de niveau de gris. Le signal de fluorescence mesuré est restitué sur une profondeur de 8 bits, soit 256 niveaux de gris. Le logiciel de pilote de la caméra est un « plugin Image J ».

3. Résultats d'imagerie en fluorescence

La caractérisation en microscopie de fluorescence permet de sonder simplement l'état de surface des échantillons après les étapes d'hybridation (*tDNA*-Cy3), en se référant à l'intensité de fluorescence observée, à son homogénéité, et à la spécificité de sa localisation.

Dans l'objectif de produire une surface de fonctionnalisation densément greffée, homogène et spécifique, plusieurs expérimentations ont été menées, d'abord dans le cas de la silanisation par APTES/GA puis dans le cas de la silanisation par EHTES. Plusieurs micrographies sur différentes régions des différents échantillons sont acquises pour caractériser leur surface et avoir une vision globale de l'ensemble de la surface de l'échantillon.

Les micrographies suivantes sont choisies et présentées parce qu'elles représentent des cas typiques représentatifs de nos expériences et observations. L'ensemble de ces observations fait l'objet d'une discussion exposée par la suite.

3.3.4.3. Observation de la fluorescence après hybridation de l'ADN en utilisant le protocole APTES/GA

1. Liste des séquences d'ADN utilisées (fonctionnalisation « APTES »).

ssDNA complémentaire (5'-3') :

NH₂-(CH₂)₆-GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC

ssDNA non complémentaire (5'-3') :

NH₂-(CH₂)₆-AGT TGG GTG GTG AGT AGG GTG AGG GGG GAA GGA GG

tDNA-Cy3 (5'-3') :

Cy3-GG CAG CCG AAG GGC ATG AGC TGC GTG ATG AGT TGC

2. Cas des échantillons SiO₂ plans :

Les images suivantes sont des exemples typiques représentatifs de micrographies de fluorescence acquises sur des échantillons fonctionnalisés.

Echelle des micrographies lorsque non précisée : 0,5 mm de largeur par 0,6 mm de longueur.

L'objectif utilisé ne permet pas l'observation des microgouttes ou des larges surfaces traitées dans leur globalité.

Par conséquent, les régions d'intérêt visualisées sont :

- *soit des fractions de surface en forme de disque (forme due aux traitements par dépôts de microgouttes de 2 µL (~1 mm² de surface totale)), cf. **Figure 36 (3)** ; on peut le constater en observant les bordures circulaires permettant de différencier les zones contrastées,*
- *ou soit, des petites régions « frontières » photographier autour des intersections entre deux zones de « test » et de « contrôle négatif » cf. **Figure 36 (4)** ; on peut le voir au contraste d'intensité de fluorescence permettant de différencier les deux zones.*

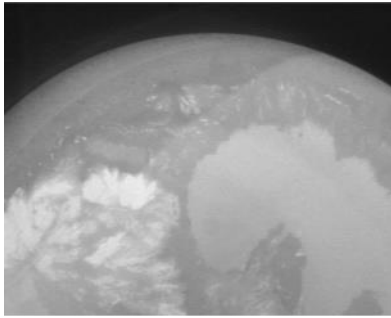


Figure 43.

Test réalisé : greffage de sondes *ssDNA* complémentaires 10 μM –2 μL , puis essai d'hybridation par dépôt de 2 μL de *tDNA*–Cy3 concentrées à 2 μM .

Résultat : La région sur laquelle sont localisées les ADN cibles *tDNA*–Cy3 correspond effectivement à la région sur laquelle les *ssDNA* ont été préalablement greffées. On peut penser qu'il y a eu une hybridation spécifique des *ssDNA* et des *tDNA*–Cy3 sur cette région. Et comme attendu, cette région prend la forme circulaire du disque déposée et contenant des sondes *ssDNA* s'étant greffées, sous cette forme, à la surface du substrat.

Conclusion : On remarque néanmoins un manque d'homogénéité de fluorescence (profil de fluorescence non uniforme sur l'entièreté de la région d'intérêt visualisée).

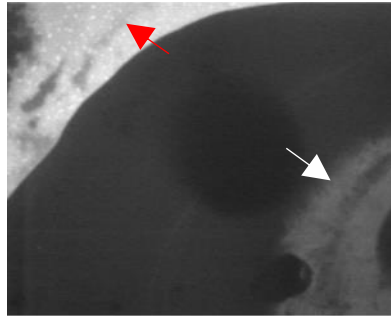


Figure 44.

Test réalisé : greffage de sondes *ssDNA non complémentaires* 10 μM –2 μL , puis essai d'hybridation par dépôt de 2 μL de *tDNA*–Cy3 2 μM .

Résultat : La fluorescence est principalement localisée en dehors de la surface greffée (flèche rouge). La surface greffée émet un niveau de fluorescence moyen quasi-nul. Ce résultat est cohérent avec le fait que les sondes greffées ne soient pas complémentaires des cibles *tDNA*–Cy3. Ceci étant, on peut remarquer une faible fluorescence (indiquée par une flèche blanche) à l'intérieur de la région greffée.

Conclusion : Il existe un taux non nul de fixation non spécifique de *tDNA*–Cy3 sur des zones où aucune molécule de *ssDNA* complémentaire n'aurait été préalablement greffée.

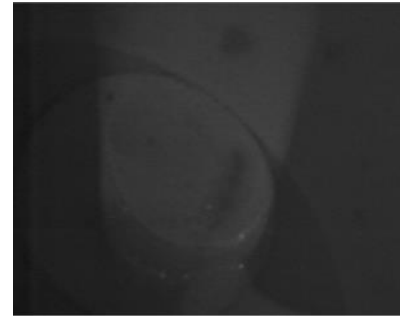


Figure 45.

Test réalisé : Echantillon fonctionnalisé APTES/ GA mais **non greffé** *i.e.*, non addition de *ssDNA* complémentaires ou non complémentaires. Une solution de *tDNA*–Cy3 2 μM est toutefois déposée pour la réalisation d'un essai d'hybridation.

Résultat : Le bruit de fond capté sur la surface de l'échantillon est non nul.

Conclusion : Présence non espérée de molécules *tDNA*–Cy3 fixées à la surface de la couche intermédiaire de greffage servant au greffage des sondes (couche composée des espèces chimiques APTES/GA). Ce signal de fluorescence est émis malgré des étapes de rinçages adaptées (cf partie 3.3.3.3).

Hypothèses :

1. inefficacité du rinçage réalisé.
2. Existence d'interactions non spécifiques entre les molécules mises en jeu (APTES/ GA/ *tDNA*–Cy3)

Dépôts uniques de « grands » volumes de 90 μL des solutions de sondes, déposées sur des échantillons délimités en zones fonctionnalisées ou non (cf. Figure 36 (2) et (4)).

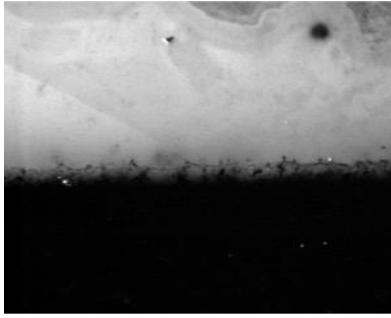


Figure 46.

Test réalisé : ssDNA complémentaire 10 μM déposées sur un échantillon délimité en zones, *tDNA*-Cy3 2 μM .

Résultat : Le bruit de fond est quasi nul (bande inférieure). C'est cohérent avec le fait que cette région n'ait pas été fonctionnalisée avec les intermédiaires de greffage.

Conclusion : En l'absence des intermédiaires de greffage (APTES/GA), les molécules de *tDNA*-Cy3 ne se fixent pas.

Hypothèse corroborée : Existence d'interactions non spécifiques entre les intermédiaires de greffage et les molécules de *tDNA*-Cy3.

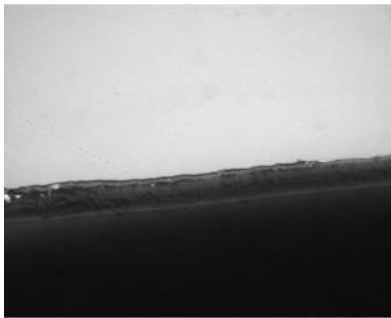


Figure 47.

Test réalisé : ssDNA complémentaire 10 μM vs *tDNA*-Cy3 10 μM .

Augmentation de la quantité de *tDNA*-Cy3 (de 2 μM à 10 μM (x5)).

Objectif : Uniformiser la fluorescence sur la surface greffée. On émet l'hypothèse de le taux d'hybridation n'est pas de 1:1, **ssDNA complémentaire : *tDNA*-Cy3.**

Résultat : Gain d'homogénéité de surface sur la région greffée avec des ssDNA complémentaires.

Conclusion : Augmenter la concentration des *tDNA*-Cy3 augmente la quantité de *tDNA*-Cy3 fixée (de façon spécifique *i.e.*, hybridée aux ssDNA, ou non spécifique) et améliore l'homogénéité de fluorescence.

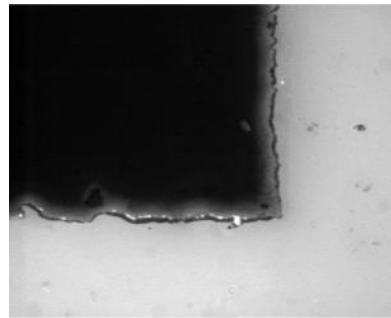


Figure 48.

Test réalisé : Un autre motif de région (en forme de « L »). ssDNA 10 μM , vs *tDNA*-Cy3 10 μM .

Résultat et conclusion : En l'absence des intermédiaires de greffage (APTES/GA), les molécules de *tDNA*-Cy3 ne se fixent pas, même dans des concentrations 5 fois plus élevée (zone de fluorescence nulle visible sur la micrographie).

Le masquage de régions lors des étapes **d'hydroxylation et de silanisation** est fonctionnel et efficace pour s'affranchir des fixations non désirées des molécules de *tDNA*-Cy3. L'hypothèse de l'inefficacité des étapes de rinçage peut être levée. (Figure 45, cf Descriptif de la micrographie, Hypothèse 1).

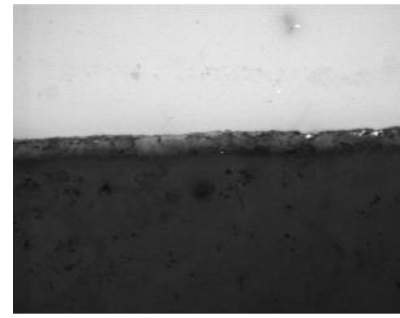


Figure 49.

Test réalisé : Echantillon fonctionnalisé APTES/GA mais **non greffé** via des ssDNA (non addition de sondes ssDNA, qu'elles soient complémentaires ou non complémentaires). Quantité de *tDNA*-Cy3 : 10 μM .

Résultat : Les intermédiaires de greffage induisent une adsorption des *tDNA*-Cy3 (10 μM) sur la région fonctionnalisée. Un léger bruit de fond peut néanmoins être observé sur la région ayant été masquée.

Conclusion : Les intermédiaires de greffage (APTES/GA), interagissent de façon non spécifique avec les molécules de *tDNA*-Cy3 et probablement avec toutes les séquences d'ADN utilisées.

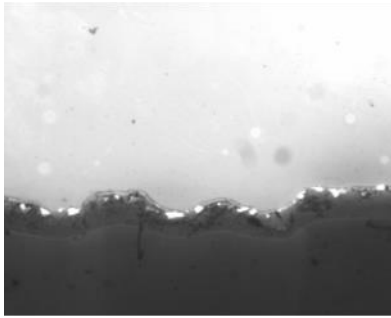


Figure 50.

Test réalisé : ssDNA complémentaire 10 µM déposés sur un échantillon délimité en zones, tDNA-Cy3, 2 µM.

Objectif : Répéter le test réalisé et illustré sur la Figure 46.

Résultat : Le résultat est conforme au résultat attendu. Un léger bruit de fond peut également être observé sur la région ayant été masquée.

Conclusion : Cette micrographie nous permet de souligner la reproductibilité du contraste de fluorescence, toujours bien marqué, entre les régions effectivement fonctionnalisées puis greffées, et les régions masquées au cours des phases d'hydroxylation et de silanisation (*i.e.*, non fonctionnalisées).

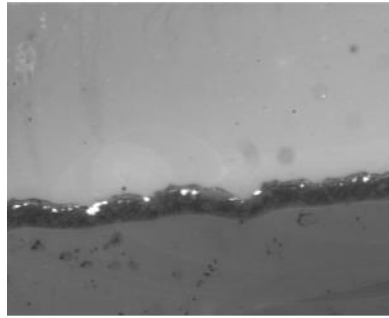


Figure 51.

Test réalisé : ssDNA complémentaire 10 µM déposés sur un échantillon délimité en zones, tDNA-Cy3 2 µM. Parce qu'un bruit de fond a pu être observé sur des régions masquées pendant les phases d'hydroxylation et de silanisation (exemple des Figures 49 et 50), nous avons essayé d'introduire un ADN non fluorescent allant jouer le rôle de molécule de passivation des sites « APTES/GA » piégeurs des tDNA-Cy3.

Objectif : Occuper les sites pièges avec des molécules de passivation oligonucléotidique pour diminuer le taux d'adsorption non spécifique des tDNA-Cy3 sur la surface de l'échantillon et donc le niveau de fluorescence non spécifique.

Mise en œuvre : Un ADN de passivation que l'on peut nommer « polyC₁₅ tDNA », concentré à 10 µM, de séquence 15 cytosines (15 fois le nucléotide « C »), et non marqué (n'induisant pas de fluorescence), est utilisé pour passiver la surface de l'échantillon entre les étapes de greffage de ssDNA et d'essai d'hybridation par l'introduction des cibles tDNA-Cy3. En théorie, l'action du polyC₁₅ tDNA sera d'occuper, et donc de passiver, les sites « APTES/GA » qui induisent les interactions non spécifiques.

Conclusion : La fluorescence globale est nettement diminuée (en comparaison à la Figure 50, acquise avec les mêmes paramètres photographiques) parce qu'en effet, les sites piègeurs d'APTES et de GA sont passivés par les tDNA de type « polyC₁₅ ».

Les polyC₁₅ tDNA n'interagissant pas avec les tDNA-Cy3, ceux-ci sont élués lors des étapes de rinçage, et l'intensité de fluorescence globale diminue.

Le taux d'interaction non spécifique pourrait être estimé. Le calcul de ce taux peut faire l'objet d'une expérimentation planifiée pour répondre à cette question.

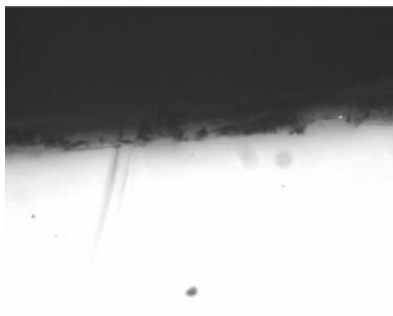


Figure 52.

Test réalisé : Echantillon fonctionnalisé « APTES/GA » mais **non greffé avec des ssDNA**, délimité en zones masquées (obscur) ou non (fluorescente). Réalisation d'un essai d'hybridation avec des *tDNA*-Cy3 (2 μ M). La différence entre ce test-ci et celui réalisé et illustré sur la Figure 49 est la

concentration de la solution de *tDNA*-Cy3 déposée pour l'essai d'hybridation.

NB : Ne pas comparer les deux micrographies Figure 49 et Figure 52 puisqu'elles ne sont pas acquises avec les mêmes réglages photographiques.

Objectif : Réaliser un contrôle supplémentaire pour confirmer l'existence d'interactions entre les oligonucléotides et les intermédiaires de greffage utilisés.

Résultat : Le résultat est conforme au résultat attendu. De manière reproductible, les intermédiaires de fonctionnalisation interagissent avec les ADN (*tDNA*-Cy3).

Hypothèse : Les interactions entre les intermédiaires de greffage APTES/GA et les ADN (*tDNA*-Cy3) seraient d'ordre électrostatique, ce qui expliquerait la reproductibilité de nos observations.

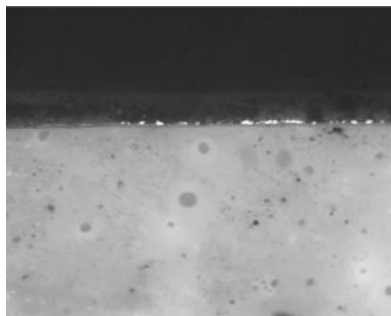


Figure 53.

Test réalisé : Echantillon fonctionnalisé « APTES/GA » mais **non greffé avec des ssDNA**, délimité en zone masquée (obscur) ou non (fluorescente). Réalisation d'une étape de passivation via l'introduction de *polyC*₁₅ *tDNA* 10 μ M, suivi d'un essai d'hybridation via l'introduction de *tDNA*-Cy3, 2 μ M.

Objectif : Reproduire l'effet de passivation que produisent les *polyC*₁₅ *tDNA* sur les intermédiaires « APTES/GA ». Cette fois ci, les *polyC*₁₅ *tDNA* sont directement déposées sur les intermédiaires réactionnels, en l'absence de *ssDNA* complémentaire.

Résultat : En comparaison à la Figure 52 (acquise avec les mêmes paramètres photographiques), on remarque que les *tDNA* de type « *polyC*₁₅ » passivent effectivement les sites interactifs formés par les intermédiaires de greffage « APTES/GA ». Il en résulte une très nette diminution du niveau de fluorescence.

Conclusion : L'utilisation d'oligonucléotides de passivation permet de constater des limitations inhérentes à l'utilisation des intermédiaires « APTES/GA ». De plus, l'utilisation des *polyC*₁₅ *tDNA* de passivation ne constitue pas une solution de contournement des limitations rencontrées.

Note : Dans les tests réalisés et illustrés sur les Figures 50 et 51, les échantillons sont greffés avec des sondes *ssDNA*. Ce qui n'est pas le cas dans les tests réalisés et illustrés sur les Figures 52 et 53. Même si les micrographies ne peuvent pas être comparées entre ces deux lots de tests, on peut souligner que les molécules de *tDNA*-Cy3 se fixent aux intermédiaires « APTES/GA » indépendamment du greffage des sondes *ssDNA* complémentaires. Comme nous avons pu le constater, le taux de fixation non spécifique peut être atténué par l'utilisation d'oligonucléotides de blocage (*polyC*₁₅ *tDNA*) mais ces interactions non spécifiques demeurent et constituent une réelle limitation à l'utilisation des ces intermédiaires « APTES/GA ».

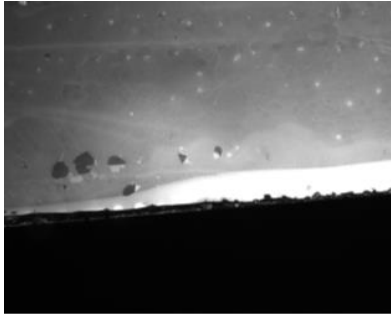


Figure 54.

Test réalisé : Echantillon délimité en zones non masquée (région fluorescente) et masquée (région obscure) puis fonctionnalisé **sans glutaraldéhyde**.

Greffage via dépôt de ssDNA complémentaires concentrées à 10 μM , et essai d'hybridation par ajout de *tDNA*-Cy3, 2 μM .

Objectif : Savoir si les molécules d'APTES seules peuvent interagir avec les *tDNA*-Cy3.

Résultat et conclusion : Cette micrographie met en évidence l'existence d'interactions non spécifiques entre la couche d'APTES et les *tDNA*-Cy3.

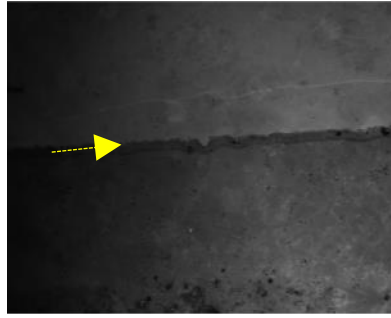


Figure 55.

Test réalisé : Echantillon délimité en zones non masquée (région supérieure délimitée par la flèche jaune) et masquée (région inférieure), échantillon non fonctionnalisé *i.e.*, **sans APTES et sans glutaraldéhyde**. Greffage via dépôt de ssDNA complémentaires 10 μM , puis de *tDNA*-Cy3, 2 μM pour l'hybridation. Précisons que les étapes de rinçages sont réalisées comme à l'accoutumée.

Objectif : Savoir s'il existe une part d'adsorption non spécifique des molécules d'ADN (ssDNA et *tDNA*-Cy3) sur la surface d'oxyde SiO_2 hydroxylée.

Résultat et conclusion : Cette micrographie met en évidence l'existence d'une certaine part d'interactions non spécifiques entre SiO_2 hydroxylé et *tDNA*-Cy3.

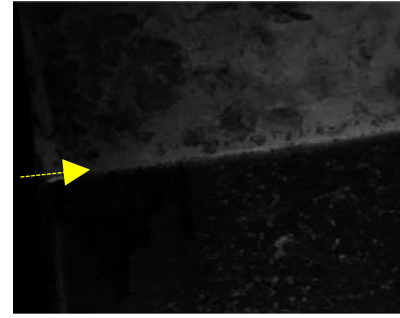


Figure 56.

Test réalisé : Echantillon délimité en zones non masquée (région supérieure délimitée par la flèche jaune) et masquée (région inférieure) mais non fonctionnalisé. *i.e.*, sans APTES et sans glutaraldéhyde, **ssDNA non complémentaire** 10 μM , *tDNA*-Cy3, 2 μM .

Objectif : Savoir si l'utilisation de sondes ssDNA non complémentaires sur une surface d'oxyde hydroxylée réduit l'intensité de fluorescence, en comparaison à une utilisation de sondes ssDNA complémentaires (cf **Figure 55**).

Résultat et conclusion : En comparaison à la micrographie de la **Figure 55** (acquise avec les mêmes paramètres photographiques que celle-ci), nous pouvons remarquer une diminution globale de l'intensité de fluorescence lorsque les molécules de ssDNA sont non complémentaires.

Conclusion : Il existe un certain taux d'adsorption non spécifique des molécules d'ADN (ssDNA et *tDNA*-Cy3) sur la surface de SiO_2 hydroxylées.



Figure 57.

Test réalisé : Echantillon délimité en zones non masquée et masquée. L'échantillon est **non hydroxylé** mais fonctionnalisé « APTES/GA ». Sondes ssDNA 10 μM , cibles tDNA-Cy3, 2 μM .

Résultat : Aucune fluorescence n'est mesurée. Les résultats sont conformes aux résultats attendus. Les liaisons hydroxyles étant absentes dès les premières étapes de fonctionnalisation, les intermédiaires « APTES/GA » ne peuvent pas être fixés sur le substrat SiO₂.

Conclusion : L'hydroxylation de surface est nécessaire à la fonctionnalisation. Les molécules utilisées n'ont pas d'affinité particulière pour le SiO₂ n'ayant pas été modifié chimiquement par les procédés d'hydroxylation de surface.

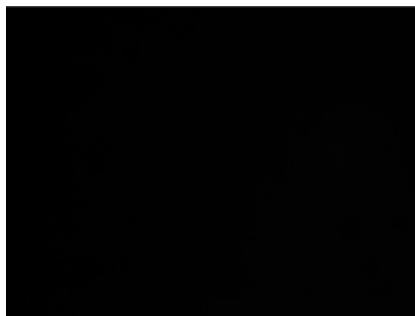


Figure 58.

Test réalisé : Echantillon délimité en zones non masquée et masquée. La surface de l'échantillon ne subit aucune modification chimique hormis le nettoyage et les étapes de rinçage. ssDNA 10 μM , tDNA-Cy3, 2 μM .

Objectif : Réaliser un test de contrôle négatif pour lequel aucun signal de fluorescence n'est attendu.

Résultat et conclusion : Aucune fluorescence n'est mesurée. Les résultats sont conformes aux résultats attendus puisqu'aucune modification chimique n'est réalisée sur la surface de l'échantillon SiO₂.

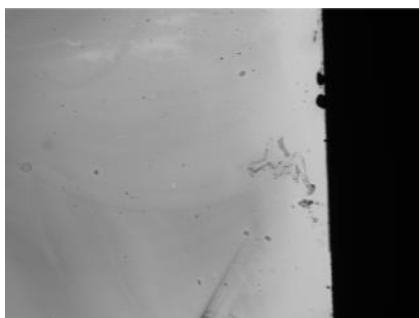


Figure 59.

Test réalisé : Echantillon délimité en zones non masquée et masquée. Notons que la région non masquée n'apparaît pas sur cette micrographie. La zone obscure à droite de l'image est une partie du support du microscope (le socle sur lequel est posé l'échantillon). L'échantillon est silanisé (APTES) mais fonctionnalisé **sans glutaraldéhyde**. Sondes ssDNA 10 μM , cibles tDNA-Cy3, 2 μM .

Objectif : Reproduire les observations d'interactions non spécifiques entre les molécules d'ADN et la couche d'APTES.

Résultat et conclusion : Cette nouvelle micrographie remet en évidence l'observation systématique du signal de fluorescence résultant des interactions qui se produisent entre les couches d'APTES (sans GA) et les molécules d'ADN (*tDNA*-Cy3).

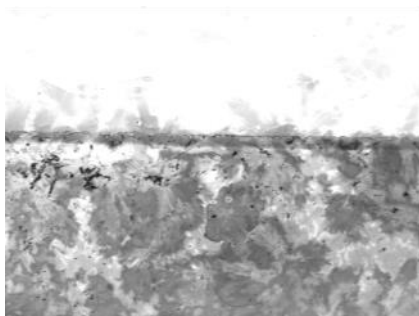


Figure 60. Test réalisé : Echantillon délimité en zones non masquée (région fortement fluorescente et saturée) et masquée (région fluorescente mais non saturée). *ssDNA* complémentaire 50 μM , *tDNA*-Cy3, 10 μM .

Objectif : Réaliser un recouvrement total et donc un blocage des sites interactifs « APTES/GA » en les saturant à l'aide de molécules *ssDNA* complémentaires.

Résultat : l'intensité globale de fluorescence est fortement accrue sur toute la surface de l'échantillon indépendamment des zones observées. De façon intéressante, il subsiste toujours un contraste de fluorescence entre la zone non masquée (préparée exprès pour les réactions d'hybridation) et la zone masquée (non fonctionnalisée).

Conclusion : En théorie, une quantité très élevée de *ssDNA* devrait passer les couches d'APTES et de GA, et c'est peut-être le cas mais le test réalisé ne permet pas de le démontrer. En effet, les *tDNA*-Cy3 sont fixés à la surface de l'échantillon mais l'information concernant leur état de fixation (hybridés aux *ssDNA* ou en interaction avec les intermédiaires de greffage) ne peut pas être déduite. Un test similaire utilisant des *ssDNA* non complémentaires est proposé dans le test réalisé et illustré sur la **Figure 62**.

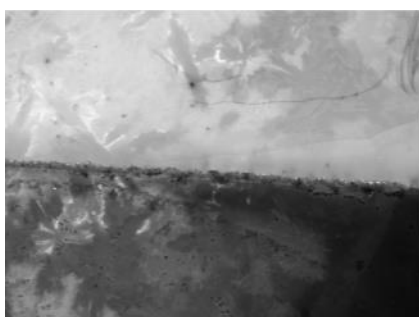


Figure 61.

Test réalisé : Echantillon délimité en zones non masquée (région fluorescente) et masquées (région inférieure moins fluorescente). Fonctionnalisation réalisée avec APTES et **sans crosslinker (intermédiaire) GA**. *ssDNA* complémentaire 50 μM , cibles *tDNA*-Cy3, 10 μM .

Objectif : Déduire de la comparaison entre cette micrographie et celle de la **Figure 60** (acquise avec les mêmes paramètres photographiques) si le crosslinker GA intervient également dans les réactions d'interactions non spécifiques se produisant avec les molécules d'ADN (*tDNA*-Cy3).

Résultat : En comparaison à la micrographie de la **Figure 60**, l'absence des molécules de GA conduit à une diminution globale de l'intensité de fluorescence.

Conclusion : Par comparaison avec la micrographie de la **Figure 60**, on peut conclure que la couche de GA induit également des interactions avec les *tDNA*-Cy3.

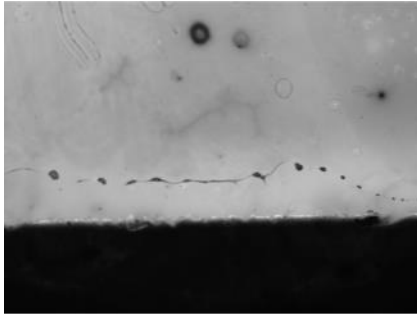


Figure 62.

Test réalisé : Echantillon délimité en zones non masquée (zone fluorescente) et masquée (zone obscure). Fonctionnalisation sans *crosslinker GA*. **ssDNA non complémentaire** 50 μM , cible *tDNA-Cy3*, 10 μM .

Objectif : Réaliser un recouvrement total et donc un blocage des sites interactifs « APTES » en les saturant à l'aide de molécules *ssDNA non complémentaires*.

Résultat : En comparaison à la micrographie de la [Figure 61](#) (acquise avec les mêmes paramètres photographiques), la nature non complémentaire des *ssDNA* utilisés pour la réalisation de ce test conduit à une diminution globale de l'intensité de fluorescence. Le bruit de fond est nul. C'est cohérent avec le fait que le peu de sondes qui y sont fixées sont non complémentaires.

Conclusion : Les molécules sondes *non complémentaires* diminuent effectivement la part d'interactions non spécifiques se produisant entre les molécules d'APTES et les *tDNA-Cy3*. Ceci étant, le dépôt d'une contraction relativement élevée de 50 μM de *ssDNA non complémentaires* ne suffisent pas à passer la totalité des sites interactifs d'APTES. Lors de silanisation, les molécules d'APTES formeraient peut-être des multicouches et des nanostructures qui auraient pour effet l'augmentation du nombre de sites où les interactions non spécifiques peuvent se produire.

3. Cas des puces fonctionnalisées (via le protocole « APTES/GA »)

Les différents tests de validation du protocole de fonctionnalisation des échantillons de SiO₂ nous ont permis d'acquérir une bonne connaissance du protocole de fonctionnalisation, de mettre en évidence les limitations liées à son usage, puis également, de pouvoir le transférer étape par étape sur nos puces de BioFETs.

Nous nous sommes concentrés sur la fonctionnalisation et le greffage des molécules au sein de la région « matrice » (cf **Figure 7** du chapitre 2). Nous avons séparé cette région en deux sous régions distinctes nommées région « test », et région de « contrôle négatif ». Sur les régions « test », des *ssDNA* de séquences complémentaires aux *tDNA* sont greffées, et sur les régions de « contrôle négatif », des *ssDNA* de séquences non complémentaires aux *tDNA* sont greffées (**Figure 63, 65 et 66**).

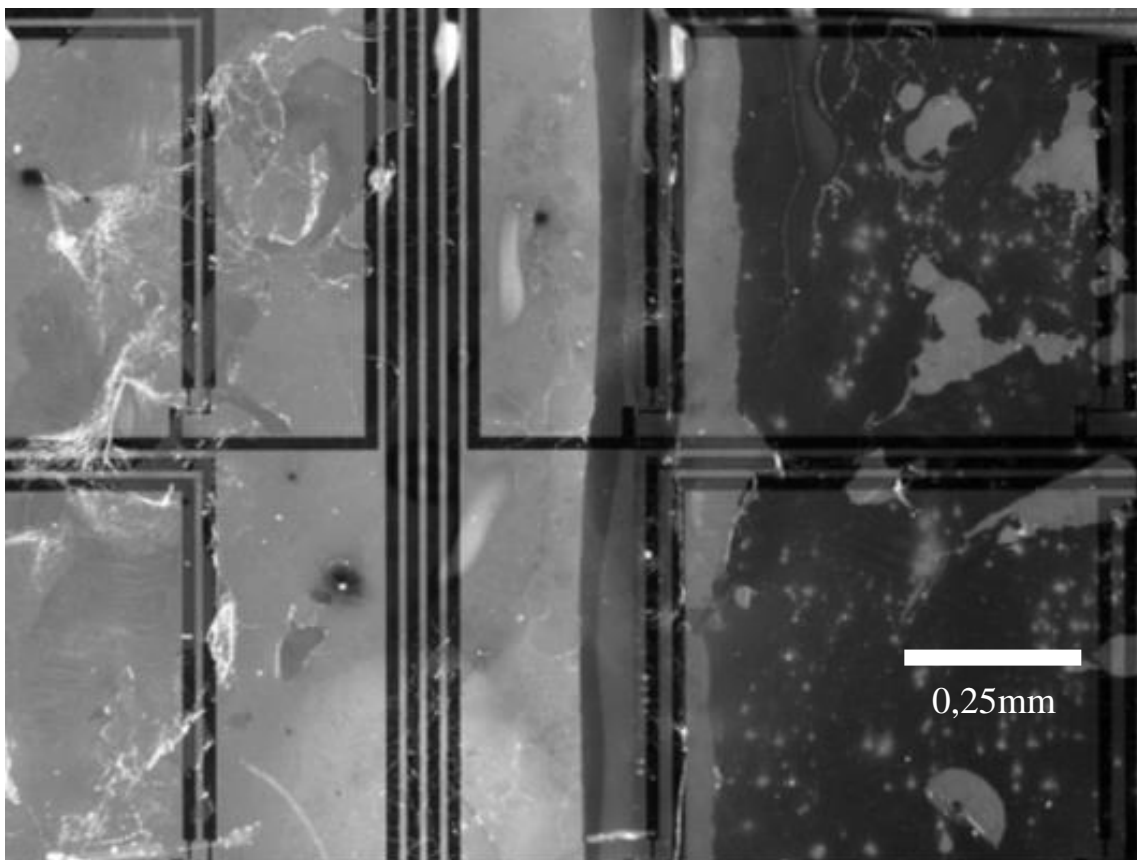


Figure 63. Micrographie d'une région de puce de *BioFETs*, fonctionnalisée suivant le protocole APTES/ GA. Cette micrographie permet de discerner un contraste de fluorescence entre les deux zones (gauche et droite). La zone de gauche est greffée avec des *ssDNA* de séquence complémentaire à la séquence des *tDNA*-Cy3 (10 μ M vs 2 μ M respectivement). La région de droite est un contrôle négatif, fonctionnalisé avec des *ssDNA* de séquence non complémentaire.

On peut constater la présence d'un profil de fluorescence inhomogène et également la présence d'un bruit de fond important sur la partie de gauche (non obscure).

3.3.4.4. Observation de la fluorescence après hybridation de l'ADN en utilisant le protocole EHTES

1. Séquences d'ADN utilisées (fonctionnalisation suivant le protocole « EHTES »).

ssDNA complémentaire (5'-3') :

NH₂-(CH₂)₆-T₆-CGG ATA CCC AAG GA

ssDNA non complémentaire (5'-3') :

NH₂-(CH₂)₆-T₆-TTT TTT TTT TTT TT

tDNA-Cy3 (5'-3') :

Cy3-TC CTT GGG TAT CCG

2. Cas des échantillons de SiO₂ plans, protocole « EHTES »

Microgouttes déposées à l'aide du robot de dispense de goutte.



Figure 64. 1. Photographie d'un échantillon de SiO₂ fonctionnalisé suivant le protocole EHTES. Des microgouttes de *ssDNA* (10 μM) d'environ 300 pL sont déposées à la surface de l'échantillon fonctionnalisé. 2. Micrographie de fluorescence réalisée après l'essai d'hybridation *tDNA*-Cy3 (2 μM). Le bruit de fond est nul.

3. Cas des puces fonctionnalisées

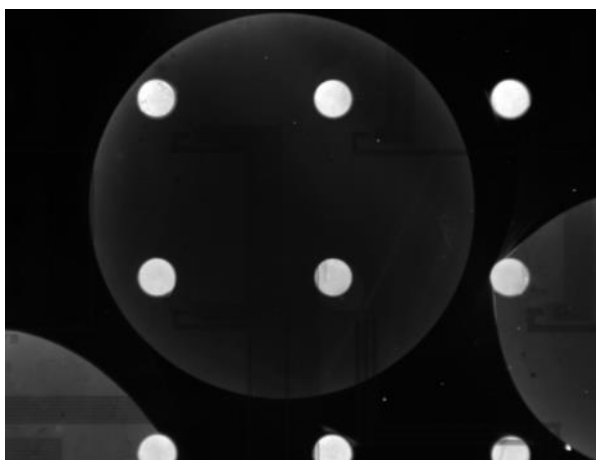


Figure 65. Micrographie d'une région de puce de *BioFETs* fonctionnalisée suivant le protocole EHTES. Après l'étape de greffage des *ssDNA* ($10\ \mu\text{M}$) par microdéposition au robot de dispense de gouttes, nous avons délibérément réparti manuellement d'autres gouttes de $2\ \mu\text{L}$ de *ssDNA* ($10\ \mu\text{M}$) à la micropipette, sur la surface de la puce. Les petits *spots* lumineux correspondent aux *tDNA-Cy3* ($2\ \mu\text{M}$) hybridées sur les plots de *ssDNA* déposées par le robot. La large surface moyennement lumineuse au centre de la micrographie correspond à l'empreinte d'une goutte de *ssDNA* (déposée manuellement) mesurant un peu plus d'un mm de diamètre, **et dont la surface est homogène.**

Le niveau de bruit de fond est quasi nul.



Figure 66. Micrographie d'une autre région de puce de *BioFETs* fonctionnalisée suivant le protocole EHTES. *ssDNA* ($10\ \mu\text{M}$) greffées par microdéposition au robot de dispense de gouttes, *tDNA-Cy3* ($2\ \mu\text{M}$). Le niveau de bruit de fond est quasi nul.

3.3.4.5. Discussion concernant les micrographies de fluorescence

1. Cas du protocole APTES/GA :

Les dépôts manuels de plots de *ssDNA* produisent des surfaces avec des résultats marqués par une inhomogénéité de surface (**Figures 43, 60, 61, et 63**).

Les dépôts de *tDNA-Cy3* en une goutte unique de volume $90\ \mu\text{L}$ sur toute la surface de l'échantillon combinés à l'augmentation de la concentration de *tDNA-Cy3* de $2\ \mu\text{M}$ à $10\ \mu\text{M}$, a permis un gain d'homogénéité de surface (**Figures 47, 48 et 49**). Cette augmentation de quantité de *tDNA-Cy3* a également induit une légère augmentation du niveau de bruit de fond (**Figure 49**). En effet, nous avons remarqué une forte adsorption non spécifique des *tDNA-Cy3* sur des échantillons sur lesquels nous n'avons pas réalisé d'étape de greffage de *ssDNA*.

Plusieurs expérimentations ultérieures nous ont permis de constater et de confirmer l'existence d'interactions non spécifiques entre l'APTES et l'ADN (**Figures 54**, et **59**), entre le *crosslinker* GA et l'ADN (**Figures 49**, **51**, **52**, et **53**), et entre les surfaces d'oxyde de silicium hydroxylées et l'ADN (**Figures 55**, et **56**). L'augmentation progressive de la concentration du *crosslinker* GA à également conduit à l'augmentation de l'intensité de fluorescence lié aux *tDNA*-Cy3 (à concentration de *ssDNA* constante).

Le bilan de ces observations nous a conduit à établir la relation selon laquelle une intensité de fluorescence mesurée équivaldrait à la somme de 2 types d'interactions :

1. les interactions spécifiques d'hybridation entre *ssDNA* et *tDNA*-Cy3,
2. les interactions moléculaires non spécifiques (probablement de nature électrostatique) entre les molécules d'ADN et les intermédiaires de fonctionnalisation hydroxyles, APTES, et GA.

On peut alors noter $I_{f0} = I_{fh} + I_{fns}$, avec I_{f0} , l'intensité de fluorescence observée, I_{fh} , l'intensité de fluorescence liée aux molécules *tDNA*-Cy3 effectivement hybridées aux sondes, et I_{fns} , l'intensité de fluorescence non spécifique liée aux interactions entre les molécules *tDNA*-Cy3 et les intermédiaires de fonctionnalisation. La reproductibilité des résultats obtenus a corroboré l'hypothèse de l'existence de ces deux composantes de fluorescence au sein d'une fluorescence totale observée.

2. Cas du protocole EHTES :

Le protocole de silanisation en phase liquide en utilisant l'epoxysilane EHTES produit des micrographies exemptes de bruit de fond (**Figures 64**, et **65**).

Avant réception des molécules d'ADN « EGFR », des expérimentations de fonctionnalisation d'échantillons SiO₂ avec de courtes séquences d'ADN (mesurant une vingtaine de nucléotides) nous ont conduits à observer des plots fluorescents marqués par une non-homogénéité et une non-spécificité de fluorescence (présence de bruit de fond). Ces observations permettent d'affirmer que la longueur des séquences utilisées dans les deux protocoles n'induit pas les imperfections de fluorescences observées dans le cas du protocole APTES/GA. Ces imperfections sont bien liées aux interactions non spécifiques précédemment décrites.

3.3.5. Effet de la quantité de *ssDNA* greffée sur l'intensité de fluorescence mesurée.

Une densité optimale de *ssDNA* greffée à la surface des échantillons augmente fortement les chances d'obtention d'une couche de fonctionnalisation dense et homogène, sans agrégats. L'objectif de cette expérience est de déterminer un rapport optimal de concentration *ssDNA*/ *tDNA*-Cy3 auquel les conditions d'hybridation en terme d'encombrement stérique seraient elles-aussi optimales. Nous avons utilisé le protocole de silanisation par APTES/ GA (greffage et hybridation par dépôt de 90 µL de solution de *ssDNA* ou de *tDNA*-Cy3, cf. 3.3.1.1.4) et avons fait varier les concentrations de *ssDNA*, à concentration de *tDNA*-Cy3 constante (2 µM). Les concentrations de *ssDNA* sont les suivantes : 0,1 – 2 – 5 – 10 – 50 et 200 µM. Le maximum de fluorescence a été mesuré pour la configuration *ssDNA* 50 µM vs *tDNA*-Cy3 2 µM, suggérant un rapport de 25 (**Figure 67**). Au-delà de ce rapport, l'efficacité d'hybridation a baissé. Ces résultats sont en accord avec des travaux publiés dans la littérature^{138,139}. En remplaçant ce résultat dans le contexte du **Tableau 2**, il y a dans cette quantité de *ssDNA*, 9 *ssDNA* par site APTES/GA de greffage, ce qui placerait expérimentalement l'efficacité de greffage APTES/GA÷*ssDNA* à un rapport de 1/9 soit environ 11%. En somme, sur un oxyde de type SiO₂ qui présente une densité de greffage d'un « APTES/GA » par nm², il faudrait 9 molécules de *ssDNA*/nm²

pour maximiser la probabilité d'un ancrage effectif du *ssDNA* et 25 fois plus de *ssDNA* que de *tDNA*-Cy3 pour une hybridation effective.

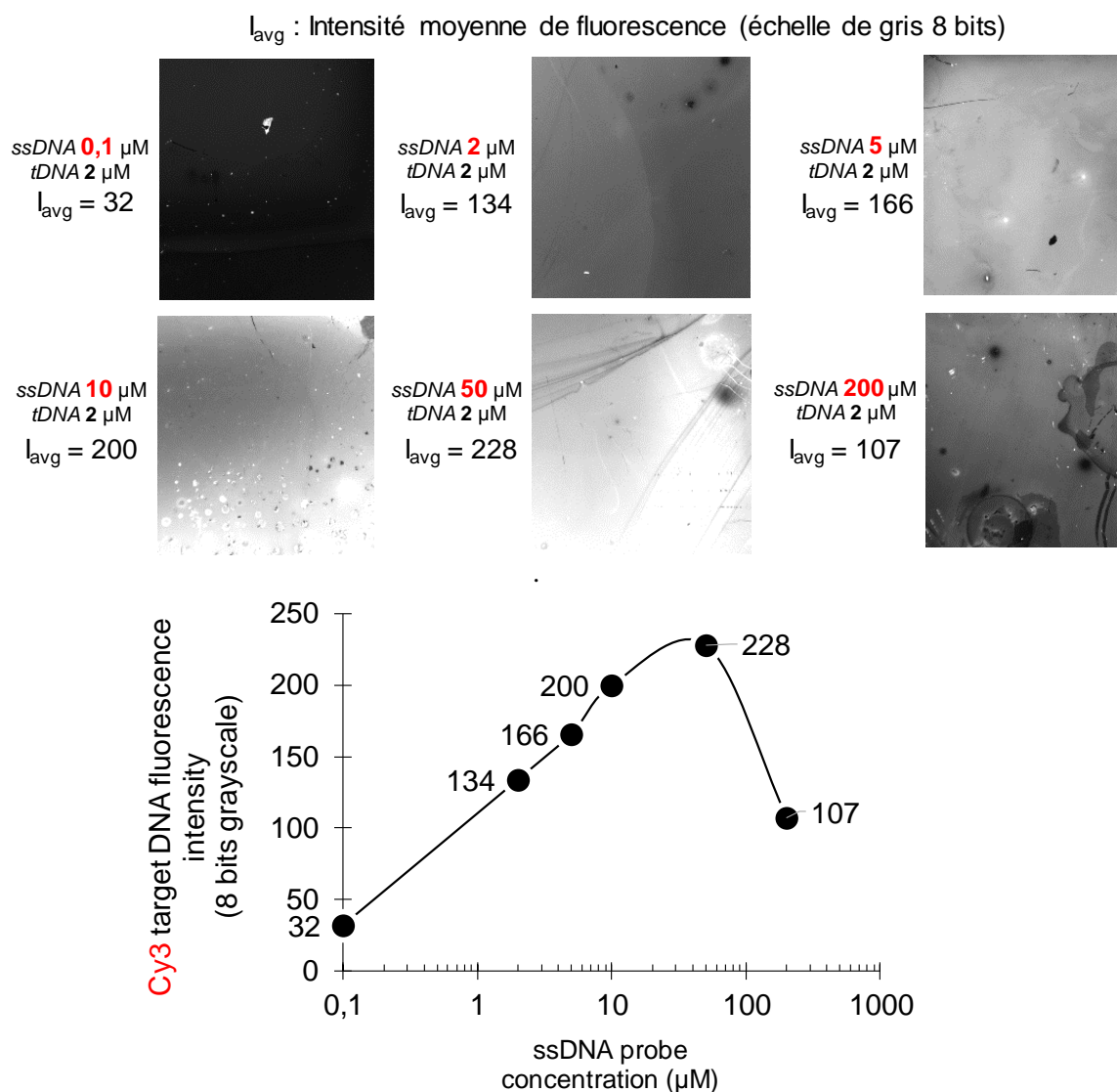


Figure 67. Effet de la concentration de *ssDNA* sur l'efficacité d'hybridation des *tDNA*-Cy3.

3.3.6. Conclusion

Dans les travaux relatifs aux aspects de fonctionnalisation de surface d'oxydes, *i.e.*, SiO₂ plan ou oxyde de grille HfO₂, dans une première partie des travaux, nous avons utilisé un protocole de fonctionnalisation en phase vapeur « APTES/GA » qui nous a permis de greffer avec succès des molécules de *ssDNA* sur la surface des oxydes. Par des illustrations de micrographies de fluorescence, nous avons mis en évidence les phénomènes d'hybridation des *tDNA*-Cy3 aux sondes greffés à la surface des oxydes SiO₂ et HfO₂. Des contrôles négatifs de non hybridation par manque de complémentarité des séquences *ssDNA* et *tDNA*-Cy3, ou par absence des molécules « intermédiaires de greffage » APTES et GA, ont également été présentés.

Chapitre 3 : Fonctionnalisation des nanofils de Si

Bien que fonctionnel, nous avons remarqué des limitations au protocole APTES/GA liées aux niveaux de bruit de fond relativement élevés. Différentes expérimentations nous ont permis de démontrer que les sources de bruit étaient les interactions non spécifiques des molécules d'ADN avec les différents intermédiaires de fonctionnalisation (hydroxyles, APTES, et GA).

Les essais d'un protocole de silanisation en phase liquide en utilisant un epoxysilane EHTES, nous évitant l'utilisation des précédents intermédiaires de greffage APTES et GA, nous ont permis de supprimer les défauts d'inhomogénéité de surface et le bruit de fond.

Nous avons également mis en évidence que la quantité de ssDNA greffé était un facteur limitant sur l'efficacité d'hybridation. Le rapport optimal entre la quantité de sondes ssDNA greffées et la quantité de cibles tDNA-Cy3 introduites pour l'hybridation est de 25. En deça ou au-delà de ce rapport, il y a un déficit ou une surcharge de la surface greffée en ssDNA.

4. Chapitre 4 : Caractérisations électriques des BioFETs

4.1. Mesure de pH

4.1.1. Introduction

La mesure de pH ¹⁴⁰ est une étape importante dans différents domaines de diagnostics comme par exemple les domaines médicaux ¹⁴¹, pharmaceutiques, et agroalimentaires. Les caractéristiques de transfert des dispositifs ISFET sont influencées par l'activité ionique (ou le pH) de l'électrolyte sondé suivant le modèle du « *site binding theory* » ^{79,142} et l'équation de Nernst ¹⁴³.

Les étapes de mesures de pH que nous réalisons sur nos dispositifs ISFET ont pour but d'évaluer leur sensibilité aux charges de surface s'appliquant sur les oxydes de grille HfO_2 ¹⁴⁴, lors d'une introduction de solutions à pH variable à l'intérieur des cavités microfluidiques (**Figure 68 (a) et (b)**).

Autrement dit, il s'agit d'une preuve de concept de détection de charges ioniques. Nos mesures nous permettent également d'évaluer le comportement « Nernstien » de nos dispositifs ISFET. Les mesures sont réalisées sur un grand nombre de dispositifs possédant des motifs et des géométries variables. Cette première mesure de pH est une étape préliminaire importante avant de mesurer d'autres espèces biologiques. Elle nous permettra de savoir si nos dispositifs fabriqués peuvent fonctionner correctement comme « capteurs » de charges.

4.1.2. Préparation des électrolytes

Les mesures de détection du pH ont été effectuées à partir de solutions tampons de pH allant de 4 à 10. Les solutions de pH 8, 9 et 10, sont des solutions de Tris (1 mol/L) ajustées au pH voulu (entre 8 et 10) par titration avec une solution de HCl. Suivant le même schéma de préparation, une solution d'acétate de sodium (100 mM) est ajustée aux pH de valeur neutre (pH 7) et acides (pH de valeur 6, 5, et 4) par titration à l'acide acétique.

Avant chaque mesure, une goutte de 20 μL de l'électrolyte de pH connu, est déposée à la micropipette à la surface de nos ISFETs. Ce volume est choisi de manière empirique. C'est un volume suffisant pour immerger le dispositif testé dans un volume d'électrolyte suffisamment important pour s'assurer que le dispositif reste approvisionné en électrolyte pendant toute la durée de la caractérisation. La mesure est effectuée environ 2 min après que la goutte ait été déposée. Entre chaque changement de pH, le dispositif est rincé à l'eau « milliQ ».

Une station de tests sous pointes combinée à un analyseur (*Semiconductor Parameters Analyzer* HP4156A) est utilisée pour la réalisation des mesures.

4.1.3. Modes de mesure

Deux modes de mesure de pH ont été utilisés : mode de mesure à simple grille et mode de mesure à double grille. Ils sont schématisés sur la **Figure 68 (c)** :

1. Dans le mode de mesure à simple grille, la tension de polarisation V_{DS} vaut 1 V et la tension V_{BG} appliquée en face arrière est fixée à 15 V. Le courant de drain I_{DS} est alors modulé par l'électrode de référence commerciale (SDR2, Ag/AgCl, WPI) que nous immergeons dans l'électrolyte sondé (en face avant).
2. Nos dispositifs ISFET fabriqués sur des substrats SOI nous permettent d'utiliser indépendamment et simultanément les deux grilles positionnées en face avant et en face arrière pour contrôler le courant I_{DS} . Pour ce second mode de mesure à double grille, nous fixons la tension V_{REF} appliquée sur l'électrode de référence de façon à maximiser la sensibilité (voir **Figure 69**) et nous faisons varier la polarisation appliquée sur la face arrière du substrat. La tension V_{REF} permet notamment de dépléter le canal de notre ISFET. Cet état de forte déplétion peut être assimilé à une capacité qui, couplée à la capacité asymétrique de la grille en face arrière, crée un canal de conduction unique positionné juste au-dessus de l'oxyde enterré (*BOX*). Le fondement physique de ce mode de mesure ainsi que les expressions mathématiques relatives au couplage capacitif sont décrites dans ces deux exemples de publications ^{143,145}. Dans notre cas, d'après la **Figure 68 (b)**, la valeur V_{REF} permettant de favoriser la sensibilité est proche de 0,5 V pour les ISFETs testés dans ce mode de mesure.

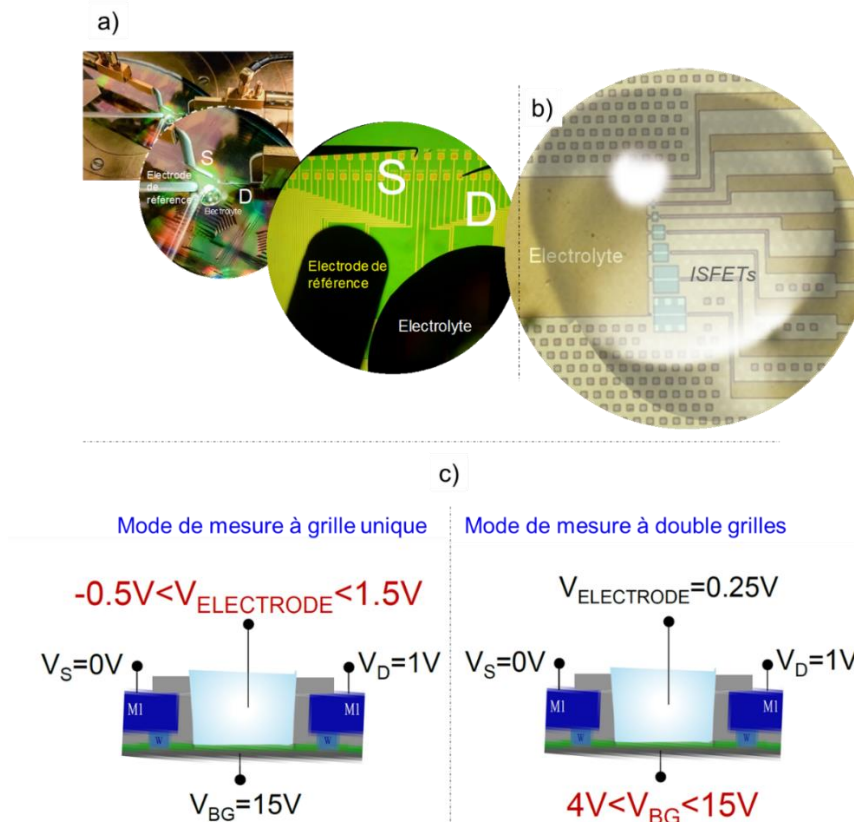


Figure 68. a) Images d'une puce apprêtée pour une mesure de pH. **b)** Schéma d'une goutte d'électrolyte déposée au-dessus des cavités de nos dispositifs ISFET. La goutte diffusera par capillarité à l'intérieur des cavités. **c)** Illustration schématique des deux modes de mesures de pH.

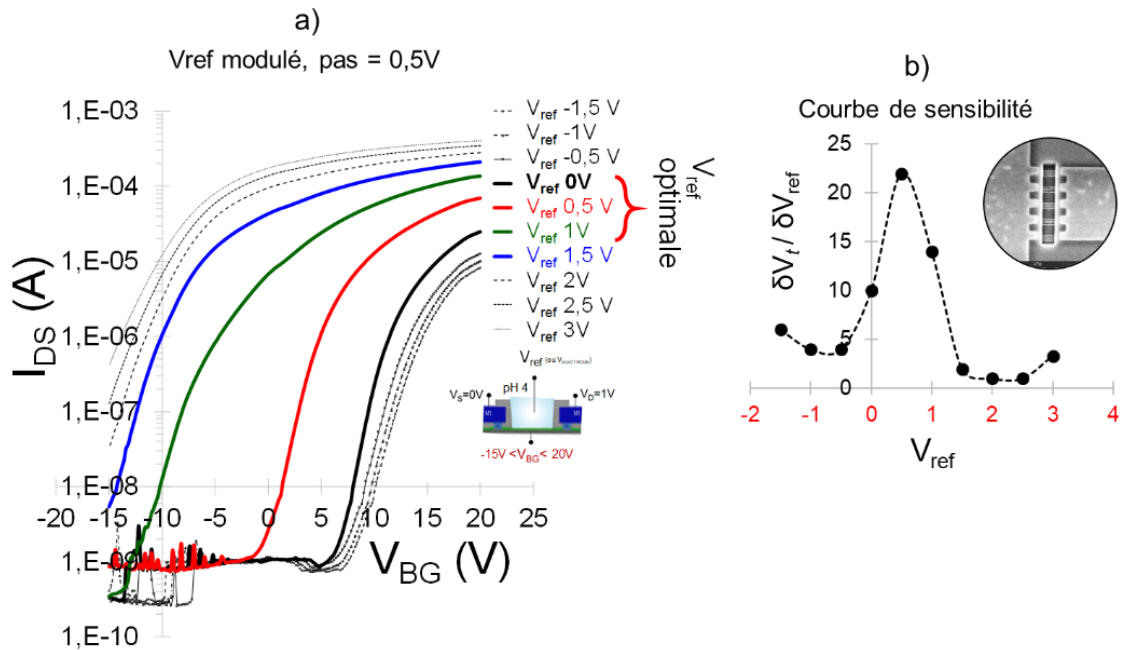


Figure 69. a) Caractéristiques électriques des dispositifs ISFET pour différentes polarisations V_{REF} permettant d'identifier le régime de fonctionnement pour lequel la sensibilité est favorisée. L'exemple est donné pour un ISFET à réseau de nanofils de Si. b) Courbe de sensibilité $\delta V_t / \delta V_{ref}$ correspondante. δV_t est extrait à $I_{DS} = 10^{-8}$ A. L'exemple est donné pour un électrolyte de pH 4 (le pH de l'électrolyte n'a pas d'influence sur la courbe de sensibilité).

4.1.4. Caractéristiques de transfert mesurées en mode « Simple grille »

La **Figure 70** présente des courbes de transfert $I_{DS}(V_{REF})$ pour différentes solutions pH. L'exemple est présenté pour deux puces distinctes pour lesquelles le dispositif ISFET mesuré est identique : ISFET à réseau de nanofils de Si avec les dimensions suivantes : $W = 150$ nm ($\times 15$ nanofils), $L = 1,5$ μ m.

Pour chacun de ces deux ISFETs, dans le régime linéaire de fonctionnement de l'ISFET, l'incrémentations du pH de l'électrolyte (de pH 4 à pH 10 via un pas de 1) induit un décalage de la tension de seuil de l'ISFET vers des tensions positives, conformément à l'effet électrostatique de la grille électrolytique sur le canal de type « n » de l'ISFET. L'extraction des tensions de seuil à un courant constant (ici, 10^{-9} A) permet la déduction d'une courbe de sensibilité au pH dont la pente correspond à la sensibilité au pH du dispositif. Ces courbes permettent d'extraire une sensibilité similaire de 68 mV/ pH sur les deux puces.

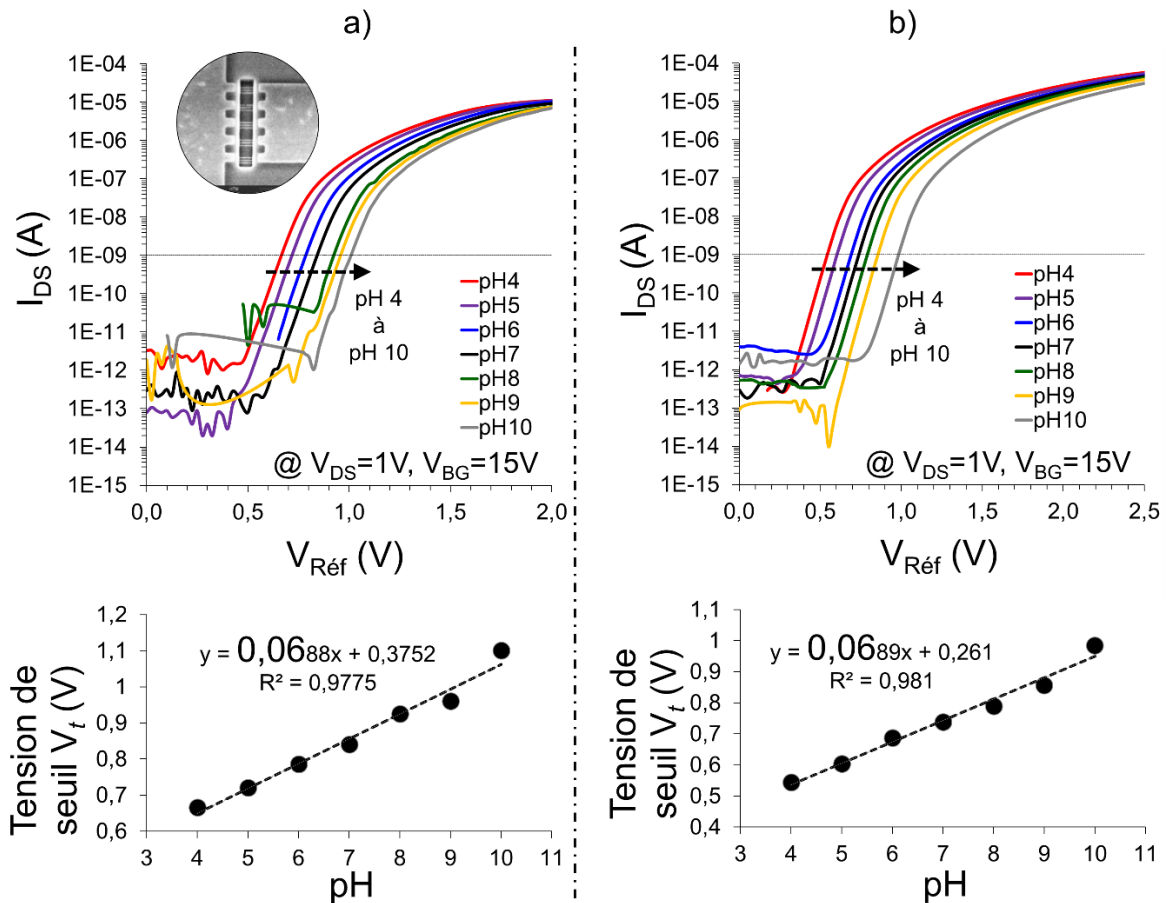


Figure 70. Caractéristiques de transfert I_{DS} - $V_{réf}$ à différents pH d'électrolyte pour des transistors à réseau de nanofils de Si. **a)** Puce n°1. **b)** Puce n°2. Les tensions de seuil V_t sont extraites à courant constant (10^{-9} A).

4.1.5. Caractéristiques de transfert mesurées en mode « Double grille »

La **Figure 71** présente des courbes de transfert $I_{DS}(V_{BG})$ pour différentes solutions pH mesurées en mode double grille. L'exemple est présenté pour deux puces distinctes pour lesquelles le dispositif ISFET mesuré est identique (même dispositif que pour le mode simple grille).

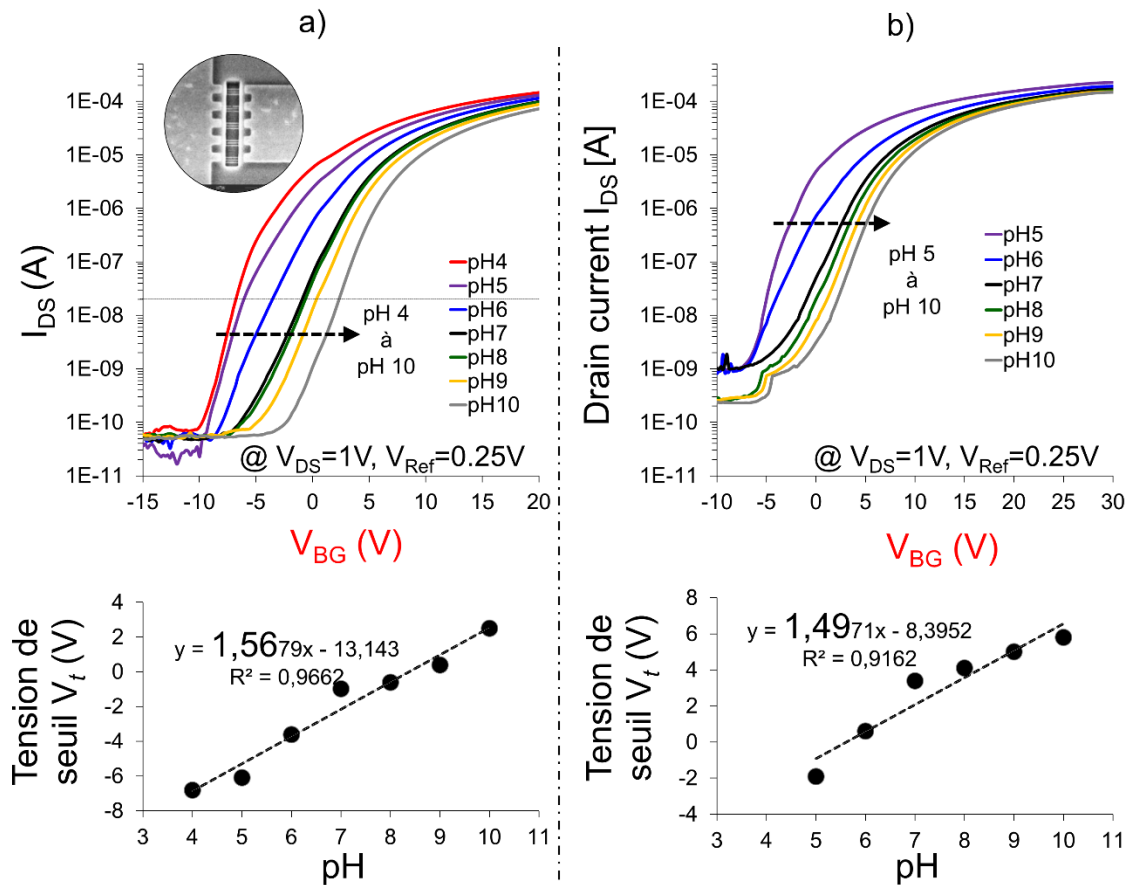


Figure 71. Caractéristiques de transfert I_{DS} - V_{BG} à différents pH d'électrolyte pour des transistors à réseau de nanofils de silicium. **a)** Puce n°1 : les tensions de seuil V_t sont extraites à courant constant (2×10^{-8} A). Ces courbes permettent d'extraire une sensibilité de 1,56 V/ pH. **b)** Puce n°2 : les tensions de seuil V_t sont extraites à 10^{-6} A. Ces courbes permettent d'extraire une sensibilité de 1,49 V/ pH.

Dans ce mode de mesure, le couplage capacitif entre la capacité de la grille électrolytique (*i.e.*, somme des potentiels électriques provenant de la « face avant » et s'appliquant sur l'oxyde de grille HfO_2 de l'ISFET) et la capacité de la grille arrière permet le contrôle électrostatique du canal de l'ISFET.

L'incrémentation du pH perturbe l'équilibre des charges dans la zone de déplétion établie par le potentiel de l'électrode de référence. Suite à cette perturbation, la neutralisation (compensation) des charges électrolytiques dans la zone de déplétion sous l'oxyde de grille implique une modification du courant dans le canal de conduction au-dessus du BOX, contrôlé directement par le couplage capacitif de la grille en face arrière et « indirectement » par la capacité de la grille électrolytique en face avant.

La différence de couplage capacitif entre ces deux grilles (due aux épaisseurs d'oxydes) fait que la grille arrière doit fournir un potentiel relativement important pour reconstituer le canal de conduction (épaisseur de BOX = 145 nm).

Pour un maintenir un même courant I_{DS} , l'incrémentation du pH demande alors une compensation en tension sur V_{BG} . Ce décalage de V_{BG} est maximal dans les régions de forte sensibilité. Dans le cas de la **Figure 71**, les tensions de seuil sont extraites à $I_{DS} = 2 \times 10^{-8}$ A pour l'ISET de la puce n°1 et 10^{-6} pour l'ISFET de la puce n°2. Les droites de sensibilité permettent de lire une sensibilité de 1,56 V/ pH pour la puce n° 1 et de 1,49 V/ pH pour la puce n° 2.

4.1.6. Influence du motif du transistor sur la sensibilité de mesures en pH

Ces mesures de sensibilité au pH ont été réalisées sur un grand nombre de dispositifs composés d'ISFETs ayant différents motifs et des dimensions variables tels que présentés dans le **Tableau 3**. Les modes d'opération utilisés ainsi que les sensibilités au pH sont également présentés dans le **Tableau 3**.

Nom	structure de canal	W(μm)	L(μm)	Mode d'opération	S (mV/pH)
XD5	nanofil unitaire	0,05	0,4	SG	67
XD6	nanofil unitaire		0,45	SG	64
XD7	nanofil unitaire		0,5	SG	68
N2D7	nanofil unitaire		1	SG	55
A2D2	réseau de nanofils	0,15 ($\times 15$)	1,5	SG	69
A2D2	réseau de nanofils			SG	69
A6D2	réseau de nanofils			SG	62
W3D7	réseau de nanofils	0,08 ($\times 10$)	5	SG	66
M3D8	microruban	0,5	10	SG	65
W4D3	microruban	1,07	1	SG	60
W4D7	microruban		5	SG	60
ZD1	ruche d'abeille	0,05 \times 0,05	1,05	SG	50
ZD7	ruche d'abeille		2,05	SG	57
A6D2	réseau de nanofils	0,15 ($\times 15$)	1,5	DG	1570
A1D2	réseau de nanofils		1,5	DG	1500
A3D2	réseau de nanofils		1,5	DG	950
A5D2	réseau de nanofils		1,5	DG	980
XD8	nanofil unitaire		0,05	0,55	DG

Tableau 3. Sensibilité au pH de nos différents dispositifs ISFET mesurés en mode simple (SG) et double grille (DG). W et L représentent la largeur et la longueur des nanofils de Si, respectivement.

Les mesures de pH réalisées sur les dispositifs à réseaux de nanofils appartenant aux régions « matrices » des puces ont été reproductibles dans le temps sur toutes les expériences réalisées (sur plusieurs mois). Les solutions de pH ont été mesurées à plusieurs reprises à l'aide d'un pH-mètre pour s'assurer de leur pH et des recalibrages de pH ont pu être effectués dans le cas où cela était nécessaire.

Dans le **Tableau 3**, les sensibilités peuvent être comparées. Certains ISFETs à nanofil unitaire avec des dimensions de cavités comprises entre 120 nm et 250 nm de diamètre n'ont pas pu être caractérisés en voie liquide en raison des dimensions trop faibles des cavités, empêchant la diffusion de l'électrolyte par capillarité vers l'oxyde de grille HfO_2 .

Pour les ISFETs ayant des cavités suffisamment larges (c'est-à-dire avec un diamètre minimal de 400 nm), les résultats de nos expérimentations permettent de conclure que les sensibilités de réponse au pH ne dépendent pas de leur structure (nanofil, nanorubans, ruche d'abeille) et sont peu sensibles aux dimensions. Nos résultats sont en accord avec une partie des travaux publiés dans la littérature ^{146,147} et en désaccord avec d'autres travaux, qui présentent des effets de dimensionnement du canal sur sa sensibilité au pH ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Ces résultats montrent une certaine cohérence avec l'équation de Nernst dont l'expression ne dépend pas des dimensions géométriques du dispositif.

Dans le mode de mesure simple grille, on peut constater que la très grande majorité de nos dispositifs ISFET présentent des sensibilités proches de la limite de Nernst (~60 mV/pH). Le mode de mesure à double grille nous a permis d'atteindre des sensibilités bien meilleures grâce au couplage capacitif des deux grilles combinées, couplage s'expliquant suivant l'**Equation 18** ¹⁵¹ :

$$\Delta V_t^B = -\frac{C_{top}}{C_{bottom}} \Delta \Psi_0$$

Équation 18. Expression du décalage de tension de seuil ΔV_t^B du canal de face arrière en mode double grille. C_{top} représente la capacité de la grille électrolytique et C_{bottom} représente la capacité de la grille en face arrière. $\Delta \Psi_0$ représente la différence de potentiel à la surface de l'oxyde de grille pour une incrémentation de pH donnée.

A noter que ces sensibilités sont bien supérieures à quelques-unes des valeurs communiquées dans la littérature pour ce mode de mesure, *i.e.*, « 107,75 mV/pH » ¹⁵², « 220 mV/pH » ¹⁴³, « 425,89 mV/pH » ⁷⁴, « 453 mV/pH » ⁷⁵, « 505 mV/pH » ¹⁵³, « 984,1 mV/pH » ¹⁵⁴, « 2085,53 mV/pH » ¹⁵¹.

4.1.7. Conclusion

La preuve de concept de sensibilité aux charges ioniques contenues dans des tampons électrolytiques a été réalisée par des mesures de pH sur des ISFETs de motifs et de dimensions variables. Dans notre cas, l'oxyde de grille est un diélectrique HfO_2 .

Deux modes de mesure ont été expérimentés. Dans le mode de mesure à simple grille, nous avons fait varier la tension sur l'électrode de référence en fixant la tension sur la face arrière de nos dispositifs. Dans ce cas, les sensibilités mesurées sont de l'ordre de 60 mV/pH, conformément à la limite de Nernst. Cette valeur change très peu pour les différents motifs ou les différentes dimensions des dispositifs. Dans le second mode de mesure à double grille, c'est l'inverse. Nous avons fait varier la tension sur la face arrière de nos dispositifs en fixant la tension appliquée sur la face avant (électrode de référence). Le canal de conduction unique résultant du couplage capacitif permet un gain notable de la sensibilité mesurée. La sensibilité maximale obtenue correspond à une sensibilité d'environ 1,6 V/pH, *i.e.*, ~27 fois la limite de Nernst.

4.2. Détection d'ADN

4.2.1. Etat de l'art sur les BioFETs à détection d'ADN

La détection d'oligonucléotides d'intérêt ¹⁵⁵ issus de matériels génétiques (ADN ou ARN) est d'une importance fondamentale dans le diagnostic des maladies infectieuses (maladies causées par un pathogène de type bactérien, viral, etc.) ou dans le diagnostic des maladies liées à des mutations génétiques ¹⁵⁶ (cancers, malformations congénitales, etc.). Les grandes avancées dans les sciences génomiques ¹⁵⁷ ont permis de comprendre l'implication des facteurs génétiques dans le développement des maladies. Chez un patient, l'analyse de fragments génétiques au cours de tests diagnostiques a pour objectif l'évaluation qualitative ou quantitative de la présence d'une séquence génétique potentiellement délétère dans son organisme. En pratique, un échantillon biologique contenant du matériel génétique lui est prélevé puis dépisté en vue d'y déceler la présence d'une séquence génétique d'intérêt causant potentiellement une anomalie.

Plusieurs technologies permettent la réalisation de tels tests diagnostiques génétiques *in vitro* ¹⁵⁸. Quelques-unes de ces technologies sont des technologies de séquençage génétique permettant de sonder la séquence génétique à l'échelle du nucléotide unique ¹⁵⁹. D'autres technologies sont basées sur l'amplification de la quantité d'oligonucléotides d'intérêt (les réactions de polymérisation en chaîne ou *PCR* ¹⁶⁰, amorçables uniquement lorsque l'oligonucléotide d'intérêt à amplifier est présent dans l'échantillon), les technologies de détection par marquage fluorescent des séquences d'intérêts hybridées telles que les puces à ADN ¹⁶¹, basées sur le principe d'hybridation entre deux brins complémentaires d'ADN ^{31,162,163}, les technologies « biocapteurs à ADN », également basées sur le principe d'hybridation de l'ADN, etc.

Les résultats des analyses diagnostiques permettent de statuer sur l'état de santé du patient à l'échelle de son matériel génétique. Au besoin, le patient suivra un traitement spécifique adapté, ou adoptera une stratégie de prévention en cas de prédisposition génétique avérée au développement d'une maladie.

Parmi les technologies d'analyse génétique précédemment citées, les biocapteurs à ADN suscitent un fort intérêt et sont devenus le sujet de recherches intensives visant à les rendre toujours plus performants et autonomes. Les biocapteurs à ADN répondent à des besoins de facilité d'utilisation, de temps de réponse fortement réduits, de transportabilité (pour décentraliser le « soin »), et de coûts d'analyse réduits, conformément aux besoins pratiques énoncés par les professionnels de la santé ^{14,164}.

Le principe analytique des biocapteurs à ADN est fondé sur les phénomènes d'hybridation ou de polymérisation des molécules d'ADN ou d'ARN. A cet effet, ils sont dotés d'une interface de biorecognition sur laquelle est sondée l'échantillon contenant le brin d'ADN complémentaire ou les monomères nucléotidiques de polymérisation. L'hybridation ou la polymérisation induit un changement physicochimique que les biocapteurs « convertissent » proportionnellement en grandeur physique mesurable (tension ou courant électrique, capacité, intensité de fluorescence, réflectance, fréquence, masse).

Comme précédemment abordé, bien que principalement fondé sur les principes d'hybridation ou de polymérisation, les méthodes permettant la transduction du signal vers des grandeurs physiques mesurables et interprétables sont très diversifiées, ce qui peut complexifier la classification des biocapteurs à ADN.

Les biocapteurs à ADN utilisent plusieurs modes de transduction des signaux. Ces transductions peuvent être de nature électronique (biocapteurs basés sur des transistors à effet de champs ^{165,166}, sur des systèmes micro/nano électromécaniques (micro/nano cantilevers mécaniques vibrants ^{167,168}, microbalances, etc.), sur des électrodes de mesures électrochimiques ^{169,170}, ou sur des systèmes optiques (détection via des effets de fluorescence ¹⁷¹, de plasmons de surface ^{172,173}, de spectrométries.). Ces différents modes de transduction sont également catégorisés en deux types de systèmes de détection : les systèmes de détection « directe » ¹⁷⁴ ne nécessitant pas de molécules ou d'éléments de marquage fluorescent ou radioactif, et les systèmes de détection « indirecte » impliquant la conjugaison ou l'incorporation d'éléments de marquage (fluorochrome, isotope radioactif, etc.), et auquel cas l'analyse diagnostique est basée sur la mesure de l'évolution du marqueur.

Les biocapteurs à ADN ¹⁷⁵ utilisant des modes de transduction électronique sans étapes de marquage reçoivent une attention spéciale ^{57,176,177} du fait de leur simplicité à l'usage, de leur temps de réponse optimaux, des coûts analytiques plus intéressants, et des opportunités qu'offrent les récentes avancées en nanotechnologie ¹⁷⁸.

La miniaturisation de l'élément transducteur à travers l'utilisation de nanostructures « 1D » et « 2D » telles que les BioFETs à nanofils ^{179,180}, les BioFETs à nanotubes ¹⁸¹/nano-feuillets ¹⁸²⁻¹⁸⁵ ou les BioFETs à nanoparticules ^{186,187}, a permis un gain de sensibilité de détection du fait des effets de dimensionnement ¹⁷⁶.

Les travaux concernant les différentes stratégies de fonctionnalisation des oxydes de grilles des BioFETs ¹⁸⁸, les travaux de comparaison des performances de différents matériaux d'oxyde de grille ¹⁸⁹, le développement de plateformes pour la réalisation de détections multiplexées ^{91,190-192} et l'intégration des BioFETs avec des plateformes microfluidiques ¹⁹³ permettent de nets progrès vers le déploiement des BioFETs en tant qu'instruments légitimes de diagnostic médical répondant aux enjeux et besoins de la médecine ^{164,194}.

Dans ce contexte, notre exercice consiste à réaliser une preuve de concept de détection de molécules d'ADN sur des BioFETs à réseau de nanofils de Si fabriqués (~50 nm de large) suivant nos procédés de fabrication compatibles avec les procédés de fabrication des composants « CMOS ».

4.2.2. Réactifs expérimentaux et méthodologie de détection des oligonucléotides

Tous les oligonucléotides utilisés dans ce travail proviennent de Merck, France. Leurs séquences respectives sont listées dans le **Tableau 4**.

	Liste des molécules d'ADN utilisées	séquence (sens 5' > 3')
ADN "EGFR"	séquence sonde complémentaire	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC
	séquence sonde <i>non complémentaire</i>	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGT TGG GTG GTG AGT AGG GTG AGG GGG GAA GGA GG
	séquence sonde complémentaire sur 97% des nucléotides	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA ACT CAT CAG GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTA CC
	séquence cible intégrale	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC ATG AGC TGC GTG ATG AGT TGC
	demi séquence cible (1/2)	Cy3-AGC TGC GTG ATG AGT TGC
	demi séquence cible (2/2)	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC AT
ADN d'étude "DTBS"	séquence sonde complémentaire	NH ₂ -(CH ₂) ₆ T ₆ CGG ATA CCC AAG GA
	séquence sonde <i>non complémentaire</i>	NH ₂ -(CH ₂) ₆ T ₆ TTT TTT TTT TTT TT
	séquence cible intégrale	Cy3-TC CTT GGG TAT CCG

Tableau 4. Liste des séquences des molécules d'ADN utilisées dans les études d'essais de détection électrique d'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires.

La détection des molécules d'ADN est réalisée sur les BioFETs à réseau de nanofils gravés dans notre région « matrice » dans laquelle nous disposons de 100 dispositifs, tous identiques.

Les étapes de greffage des *ssDNA* et d'essai d'hybridation avec les *tDNA*-Cy3 (**Figures 72, 73** et **Tableau 4**) ont été réalisées en ayant utilisé les deux protocoles de silanisation (APTES/GA ou EHTES). La détection a été menée avec un volume (~90 μL) de solution tampon pH 7 déposé sur notre région « matrice » de la puce afin de resuspendre les molécules contenues dans les cavités. Les BioFETs immergés sont caractérisés par voie liquide comme illustré sur la **Figure 74**.

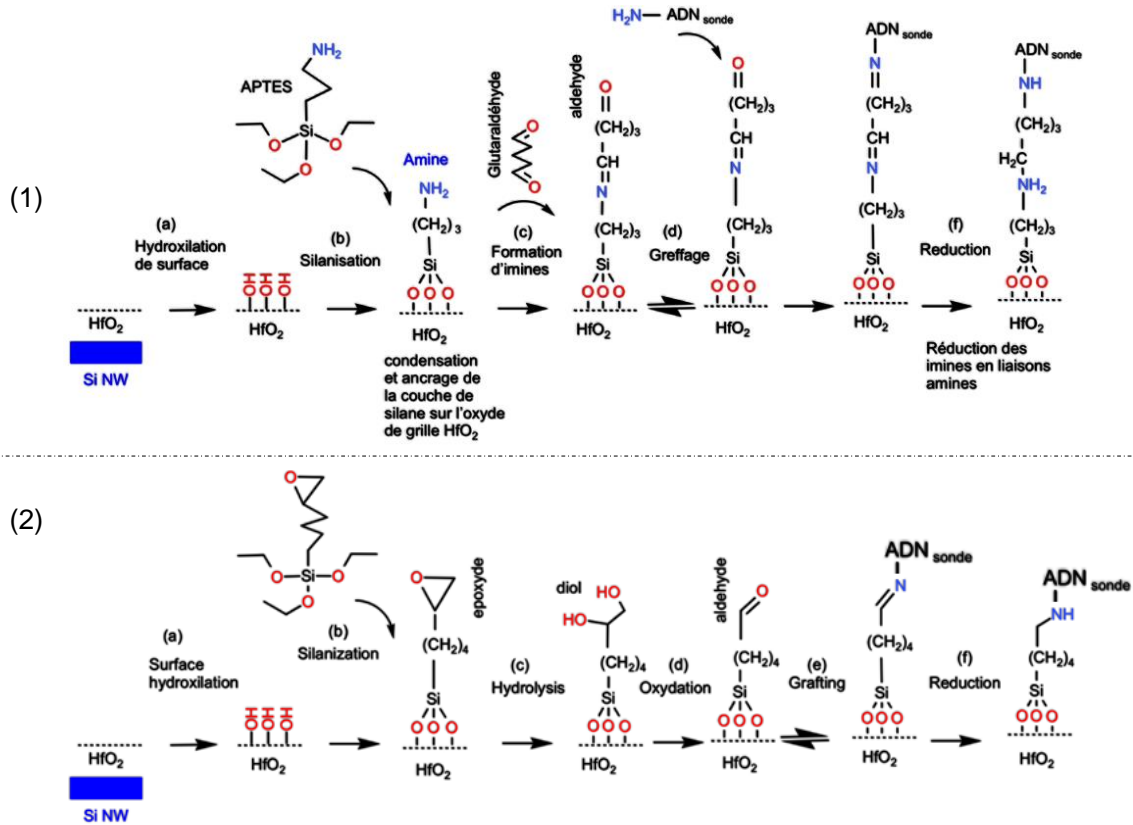


Figure 72. Illustration des protocoles de fonctionnalisation de l'oxyde de grille des dispositifs BioFET. (1) protocole de fonctionnalisation (APTES/ GA) utilisé dans les études n°1, 2 et 3 (cf. **Tableau 5**). (2) protocole de fonctionnalisation (EHTES) utilisé dans l'étude n°4 (cf. **Tableau 5**).

Nous avons mené différentes études pour évaluer l'impact de certains paramètres expérimentaux liés à la fonctionnalisation sur les décalages de V_t obtenus.

Dans le cas de la fonctionnalisation APTES/GA, nous avons étudié l'effet de concentrations variées d'ADN cible. Cela débute par des concentrations standards : $10\mu\text{M}/2\mu\text{M}$, ADN sonde/ ADN cible, respectivement : **étude 1**.

Puis, nous avons suivi l'effet de la diminution de la concentration d'ADN cible jusqu'à $0,01\mu\text{M}$ (**étude 2**) ainsi que l'effet d'une séquence d'ADN cible – ayant un défaut de complémentarité par rapport à la séquence de l'ADN sonde –, faisant ainsi varier le taux de complémentarité de séquence, et ensuite, la distance entre la zone hybridée et la surface de l'oxyde de grille HfO_2 : **étude 3**.

Enfin, l'**étude 4** se focalise sur le cas de la fonctionnalisation EHTES dans les conditions standard de concentration d'ADN ($10\mu\text{M}/2\mu\text{M}$, ADN sonde/ ADN cible).

Chapitre 4 : Caractérisations électriques des BioFETs

Dans toutes ces études, le mode simple grille a été utilisé avec $V_{BG} = 6V$ et V_{REF} modulée entre 0 et 2V, sauf dans quelques cas où cela est précisé.

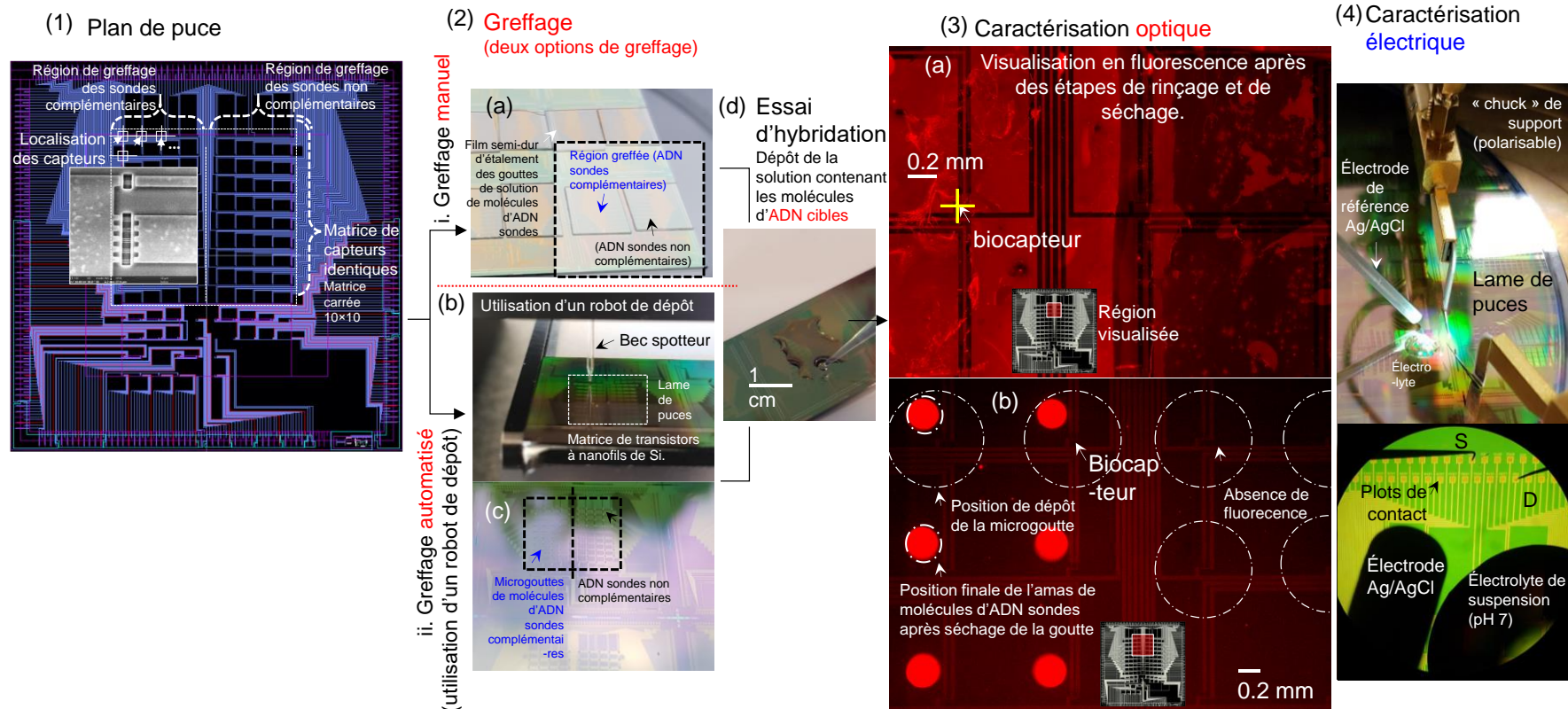


Figure 73. Illustration des différentes étapes menant à la détection électronique des ADN cibles (*tDNA-Cy3*).
 (1) Plan d'une puce, localisation de quelques *BioFETs* à réseaux de nanofils de Si dans la région « matrice » et image MEB du dispositif.
 (2)(a) Dépôt manuel de solutions de *ssDNA* à la surface des puces puis application de la solution à la région d'intérêt à l'aide de films semi-durs. Sur une même puce, la matrice de capteurs est séparée en deux régions où les *ssDNA* sont **complémentaires** ou **non complémentaires** (gauche ou droite) des *tDNA-Cy3* introduites ultérieurement. (b) dépôt localisé de microgouttes de *ssDNA* à partir d'un robot de « spotting ». (d) étape d'hybridation : une solution unique contenant les *tDNA-Cy3* est déposée à la surface de la puce.
 (3)(a-b) Micrographie en fluorescence d'une région intermédiaire permettant l'observation du contraste de fluorescence entre les deux régions différemment greffées. (4) Photographie du montage utilisé pour la caractérisation électrique des dispositifs.

Chapitre 4 : Caractérisations électriques des BioFETs

Etude	ID du lot de fabrication	Puce	Nom du couple d'oligonucléotides utilisé N = nucléotides	Séquence (sens 5'-3') des <i>ssDNA</i> complémentaires greffée dans la région de complémentarité.	Séquence (sens 5'-3') des <i>ssDNA non complémentaires</i> greffées dans la région de non complémentarité. <i>Les séquences non complémentaires sont écrites en bleu et italique.</i>	Séquence (sens 5'-3') des <i>tDNA -Cy3</i> utilisé pour les essais d'hybridation	Protocole de fonctionnalisation et voie greffage (M) = greffage manuel (A) = greffage automatisé via robot spotteur	Taux de complémentarité entre les oligonucléotides sonde et cible dans les régions de complémentarité et de non complémentarité.	Concentration des <i>ssDNA</i> A (μM)	Concentration des <i>tDNA -Cy3</i> (μM)
1	D19F0028P02	1	EGFR 35N	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGT TGG GTG GTG AGT AGG GTG AGG GGG GAA GGA GG	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC ATG AGC TGC GTG ATG AGT TGC	APTES+GA/ (M)	100% / 0%	10	2
		2	EGFR 35N	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGT TGG GTG GTG AGT AGG GTG AGG GGG GAA GGA GG	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC ATG AGC TGC GTG ATG AGT TGC	APTES+GA/ (M)	100% / 0%	10	2
		3	EGFR 35N	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGT TGG GTG GTG AGT AGG GTG AGG GGG GAA GGA GG	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC ATG AGC TGC GTG ATG AGT TGC	APTES+GA/ (M)	100% / 0%	10	2
2	D19F0028P13	1	EGFR 35N	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGT TGG GTG GTG AGT AGG GTG AGG GGG GAA GGA GG	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC ATG AGC TGC GTG ATG AGT TGC	APTES+GA/ (M)	100% / 0%	10	1
		2	EGFR 35N	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGT TGG GTG GTG AGT AGG GTG AGG GGG GAA GGA GG	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC ATG AGC TGC GTG ATG AGT TGC	APTES+GA/ (M)	100% / 0%	10	0,1
3	D19F0028P10	1	EGFR 35N	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGT TGG GTG GTG AGT AGG GTG AGG GGG GAA GGA GG	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC ATG AGC TGC GTG ATG AGT TGC	APTES+GA/ (M)	100% / 0%	10	0,1
		2	EGFR 35N	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGT TGG GTG GTG AGT AGG GTG AGG GGG GAA GGA GG	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC ATG AGC TGC GTG ATG AGT TGC	APTES+GA/ (M)	100% / 0%	10	0,01
		3	EGFR 35N SNP	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTA CC	Cy3-GG CAG CCG AAG GGC ATG AGC TGC GTG ATG AGT TGC	APTES+GA/ (M)	100% / 95%	10	2
		4*	EGFR 17N	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCA GCT CAT CAC GCA GCT CAT GCC CTT CGG CTG CC	Cy3-AGC TGC GTG ATG AGT TGC	APTES+GA/ (M)	100% / 48%	10	2
4	D19F0028P07	1	DTBS 14N	NH ₂ -(CH ₂) ₆ T ₆ CGG ATA CCC AAG GA	NH ₂ -(CH ₂) ₆ T ₆ TTT TTT TTT TTT TT	Cy3-TC CTT GGG TAT CCG	EHTES / (A)	100% / 0%	10	2
		2	DTBS 14N	NH ₂ -(CH ₂) ₆ T ₆ CGG ATA CCC AAG GA	NH ₂ -(CH ₂) ₆ T ₆ TTT TTT TTT TTT TT	Cy3-TC CTT GGG TAT CCG	EHTES / (A)	100% / 0%	10	2

* Dans l'étude n°3, sur la puce n°4, les *ssDNA* greffées sur la région de non complémentarité sont **complémentaire** de la cible *tDNA*-Cy3 à 100%. La moitié d'oligonucléotide cible indiquée est déposée uniquement sur la région de non complémentarité. Une comparaison des caractéristiques des bioFETs sur la base de la taille de la cible peut ainsi être menée.

Tableau 5. Tableau récapitulatif des différentes études menées dans le cadre de la détection électronique de molécules d'ADN. Les séquences complémentaires écrites en noir partagent 100% de complémentarité de séquence avec les molécules d'ADN cible décrites en rouges. Les sondes non complémentaires sont décrites en bleu (0% de complémentarité avec les molécules d'ADN cible). Certaines séquences peuvent être partiellement complémentaires.

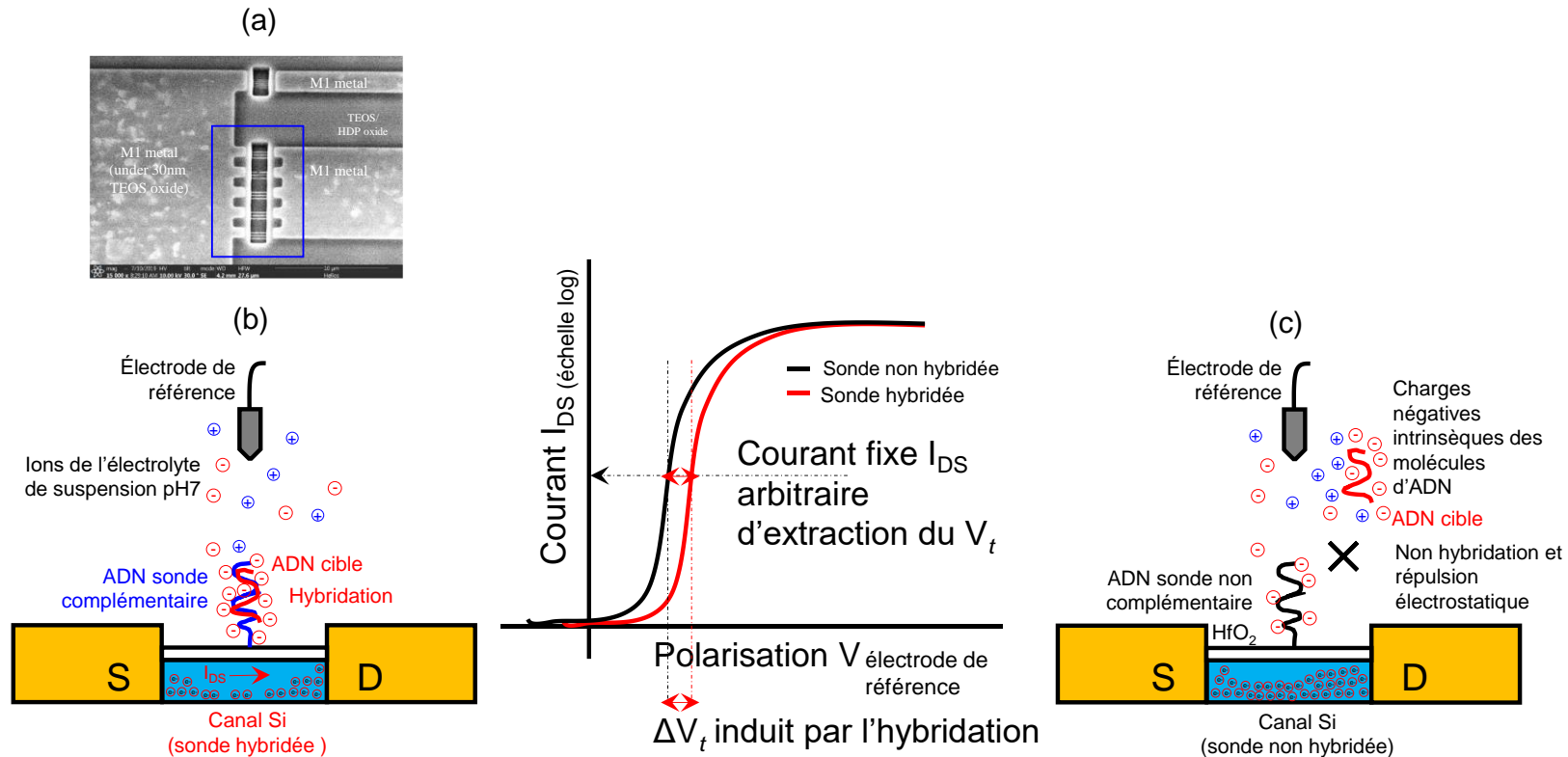


Figure 74. Représentation schématique illustrant la stratégie de détection électronique des molécules *tDNA-Cy3*.
 (a) Micrographie MEB de l'un de nos dispositifs à réseau de nanofils de Si (encadré bleu) utilisés pour les essais de détection électrique de molécules d'ADN.
 (b) Schéma d'un *duplex ssDNA x tDNA-Cy3* portant les charges négatives natives des molécules d'ADN. L'hybridation a lieu sur l'oxyde de grille HfO_2 biofonctionnalisé à cet effet.
 (c) Une seconde région de comparaison (région dite de « contrôle négatif ») est fonctionnalisée avec des *ssDNA non complémentaires* aux molécules *tDNA-Cy3*. Après les étapes d'hybridation et de rinçages, la différence de charge à la surface de l'oxyde de grille HfO_2 des *bioFETs* est caractérisé électriquement par mesure de caractéristiques de transfert $I_{\text{DS}}-V_{\text{REF}}$ permettant l'extraction de la tension de seuil des capteurs. Comme schématisé sur le graphique central, cette tension de seuil V_t est sensible au potentiel électrostatique s'appliquant à la surface de l'oxyde de grille HfO_2 .

4.2.3. Résultats et Discussion (détection électrique de deux brins d'ADN complémentaires)

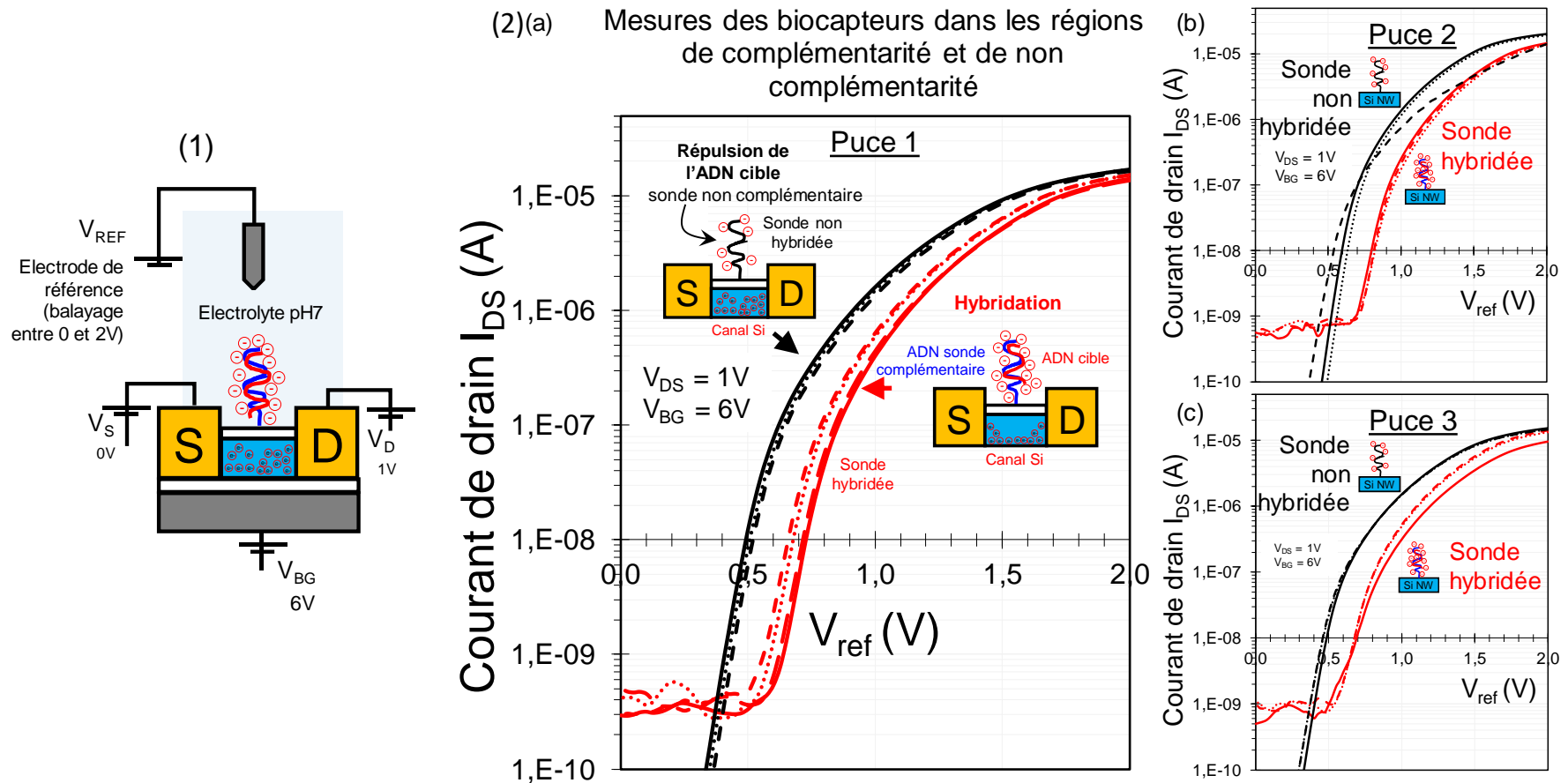


Figure 75. Caractéristiques de transfert I_{DS} - V_{REF} de nos dispositifs BioFET après greffage et hybridation. (1) Schéma du mode de mesure, (2) Courbes de transfert et décalage des tensions de seuil ΔV_t mesurées à courant constant $I_{DS} = 10^{-8}$ A. Les ΔV_t sont utilisés pour caractériser les évènements d'hybridation des *tDNA*-Cy3 aux *ssDNA*, ou celui de leur répulsion, en cas de non-complémentarité des séquences. a), b) et c) représentent les caractéristiques de transferts extraites sur 3 puces distinctes 1, 2 et 3.

La **Figure 75** présente les résultats des caractérisations électriques mesurées pour l'**étude n°1** (**Tableau 5**). L'hybridation des *tDNA*-Cy3 (2 μ M) aux *ssDNA* (10 μ M) induit un décalage moyen de V_t d'environ +200 mV sur les caractéristiques de transfert des BioFETs sur lesquels des *duplex ssDNA* \times *tDNA*-Cy3 sont formés, en comparaison aux BioFETs dits de « contrôles négatifs » greffés avec des *ssDNA* non complémentaires de la cible, et induisant des répulsions électrostatiques au vis-à-vis de celle-ci (**Figure 75** et **76**).

Ce décalage de tension de seuil est cohérent avec l'effet contributif des charges négatives intrinsèques portées par les molécules d'ADN sur nos BioFETs de type *n*. L'apport de charges négatives à la surface de l'oxyde de grille conduit à augmenter la tension de seuil de nos dispositifs.

Les résultats des études présentées dans le **Tableau 5** sont montrés sous forme de diagramme en boîte. Dans le cas de l'**étude n°1**, la représentation en diagramme en boîte est montrée sur la **Figure 76**.

Pour les **études n°2, 3 et 4**, nous nous sommes contentés de montrer les résultats sur une seule puce bien que deux puces soient systématiquement testées pour chaque cas expérimental.

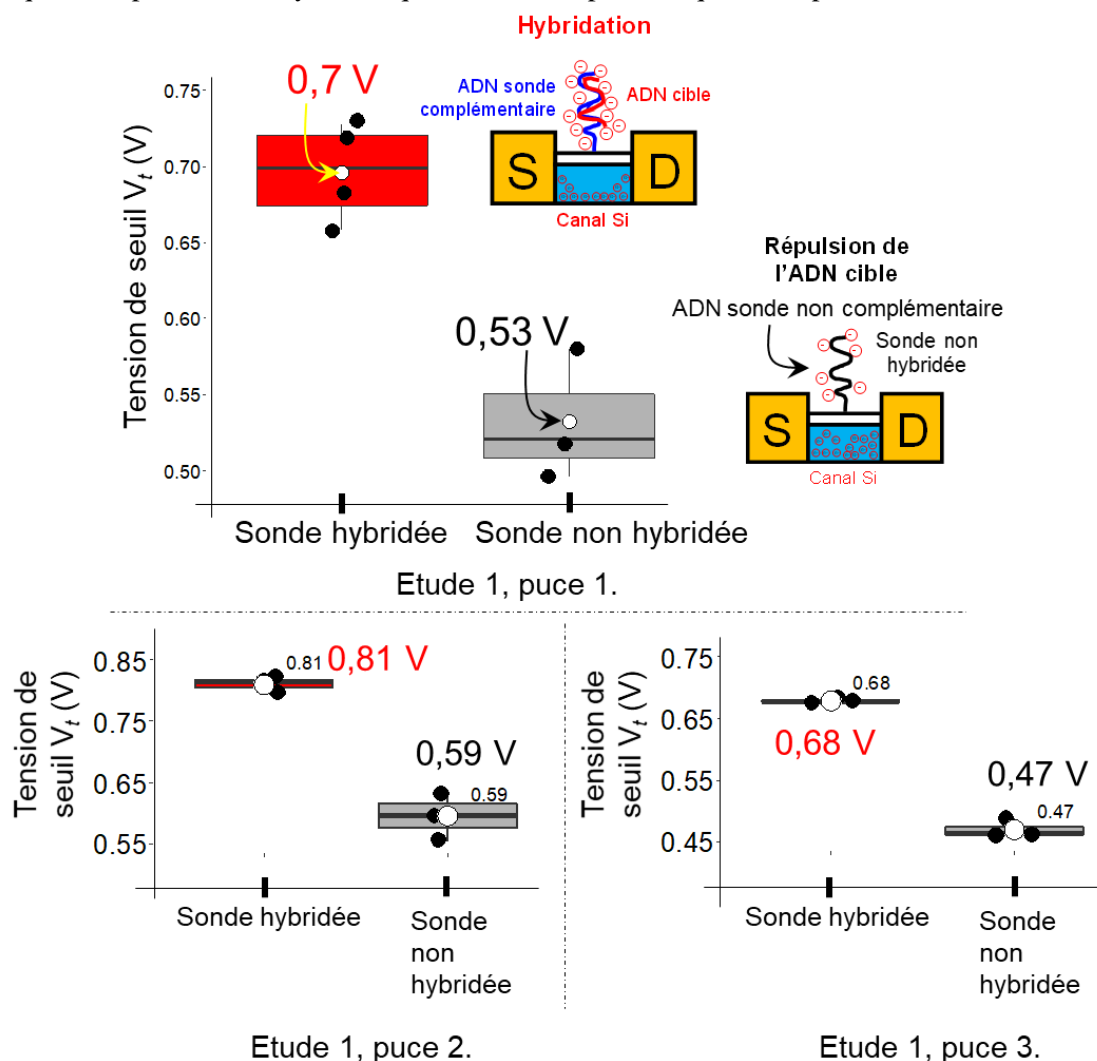


Figure 76. Représentation des résultats de l'**étude n°1** (*tDNA*-Cy3, 2 μ M + *ssDNA* 10 μ M) sous forme de diagramme en boîte. Pour cette première étude, chaque point noir appartenant à une boîte à moustache représente une tension de seuil moyenne (moyennée sur trois tensions de seuil extraites de triplicats de mesure). Pour un BioFET, le triplicat de mesures est réalisé en mesurant la caractéristique de transfert trois fois de suite. Le point blanc représente la moyenne des mesures. Les tensions de seuil V_t sont extraites à courant constant (10⁻⁸ A).

Dans l'étude n°2 (Figure 77), l'objectif est d'abaisser la concentration des *tDNA*-Cy3. Les concentrations testées sont de 1 μM et de 0,1 μM .

Pour la concentration de *tDNA*-Cy3 de 1 μM , les décalages de V_t entre les BioFETs greffés avec des *ssDNA* complémentaires et leurs « contrôles négatifs » (greffés avec des *ssDNA* non complémentaires) ne sont pas significatifs (ΔV_t moyen = -90 mV, Figure 77 (a)). Ce ΔV_t ne permet pas de conclure à une détection électrique de l'hybridation comme c'était le cas pour une plus forte concentration de *tDNA*-Cy3 (étude n°1).

Pour une concentration de *tDNA*-Cy3 de 0,1 μM , un ΔV_t moyen de +280 mV est observé sur l'une des deux puces (Figure 77 (b)). Ce ΔV_t peut être interprété comme étant l'effet de la différence de charges nucléotidiques présente entre les BioFETs sièges de *duplex* d'ADN et leurs BioFETs de « contrôles négatifs » greffés avec des *ssDNA* non complémentaires (répulsifs des *tDNA*-Cy3).

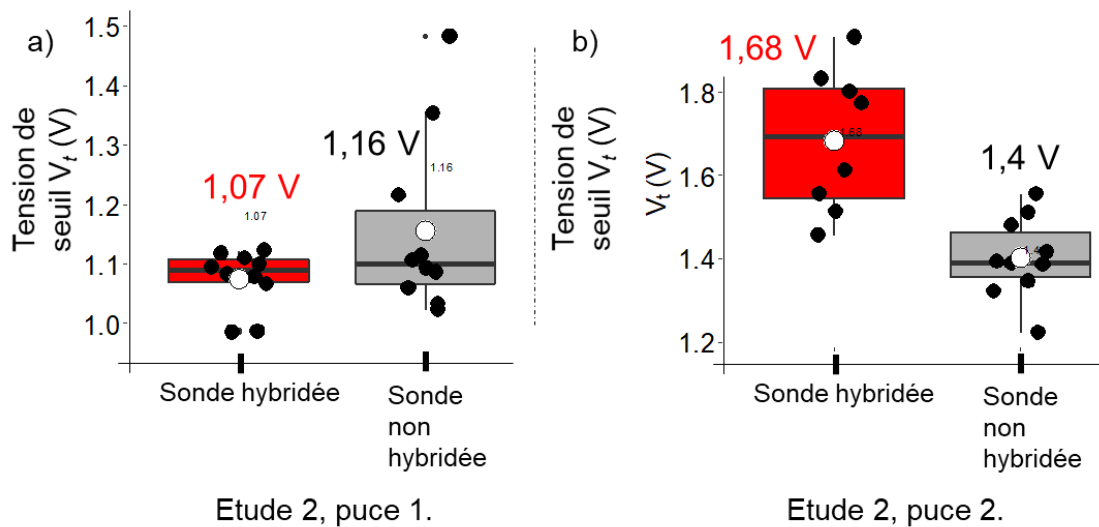


Figure 77. Etude n°2.

a) *ssDNA* 10 μM vs *tDNA*-Cy3 1 μM .

b) *ssDNA* 10 μM vs *tDNA*-Cy3 0,1 μM .

Chaque point noir d'une boîte à moustache représente une tension de seuil moyenne (moyenne effectuée sur trois tensions de seuil extraites de triplicats de mesures).

Dans l'étude n°3, nous avons commencé par reproduire cette précédente expérimentation sur d'autres puces dans l'objectif de confirmer notre observation (Figure 78 (a)). Contrairement au précédent résultat obtenu pour la détection de *tDNA*-Cy3 concentré à 0,1 μM (Figure 77 (b), ΔV_t moyen = +280 mV), le résultat de la répétition de l'expérimentation ne nous a pas permis de confirmer l'observation précédente. En effet, la nouvelle valeur de ΔV_t moyen vaut -30 mV suite aux hybridations des *tDNA*-Cy3 (concentrées à 0,1 μM).

Le diagramme montré sur la Figure 78 (b) présente les mesures d'écart de V_t sur les BioFETs, après greffage et hybridation, lorsque nous avons abaissé la concentration des *tDNA*-Cy3 à 0,01 μM . Le ΔV_t moyen mesuré vaut -90 mV. Cette valeur ne permet pas de valider la différence d'effet de charge lié aux *tDNA*-Cy3 entre les BioFETs greffés avec des *ssDNA* complémentaires et leurs contrôles négatifs.

Dans une seconde partie de l'étude n°3, nous avons voulu évaluer la capacité de nos dispositifs à discriminer des défauts de complémentarité (ou des complémentarités incomplètes).

Les mesures faites sur la puce n°3 (Figure 78 (c)) avaient pour objectif de tester l'effet d'un seul oligonucléotide non complémentaire sur toute la séquence du *duplex* *ssDNA* \times *tDNA*-Cy3. Les tensions

de seuil V_t des BioFETs sur lesquels des *duplex* normaux de $ssDNA \times tDNA-Cy3$ seraient formés sont comparés aux tensions de seuil des BioFETs sur lesquels les *duplex* auraient une paire non appariée de nucléotides, en raison de la séquence des *ssDNA* greffées (cf. **Tableau 5**).

Les décalages de V_t obtenus sont d'environ +40 mV en moyenne. Ces faibles valeurs pourraient correspondre au fait qu'une seule paire est non appariée. Mais il reste difficile de pouvoir conclure définitivement sur ce point.

Sur la puce n° 4 de cette étude n°3 (**Figure 78 (d)**), nous avons voulu évaluer l'effet de la distance entre l'oxyde de grille HfO_2 de nos BioFETs et les *duplex* $ssDNA \times tDNA-Cy3$. Des versions courtes des *tDNA-Cy3* (chaque *tDNA-Cy3* est maintenant constituée de 17 nucléotides) s'hybridant sur la région haute des *ssDNA* (chaque *ssDNA* est constituée de 35 nucléotides) sont utilisées et comparés aux *duplex* normaux ($ssDNA \times tDNA-Cy3$, de 35 nucléotides chacun.).

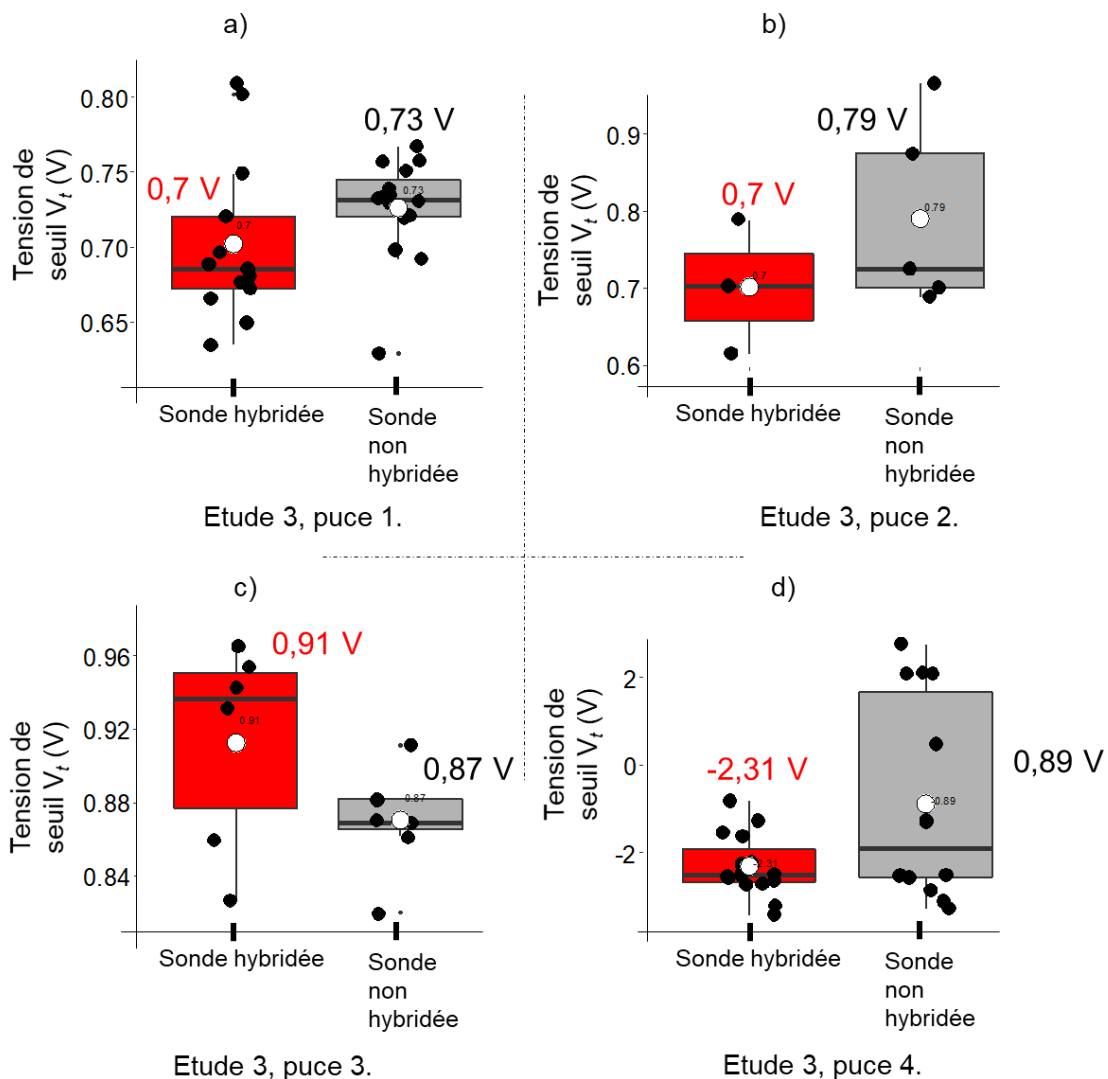


Figure 78. Étude n°3.

a) $ssDNA$ 10 μM vs $tDNA-Cy3$ 0,1 μM .

b) $ssDNA$ 10 μM vs $tDNA-Cy3$ 0,01 μM .

c) $ssDNA$ 10 μM vs $tDNA-Cy3$ 2 μM (étude « SNP » (Single Nucleotide Polymorphism ou polymorphisme d'un seul nucléotide), cf. **Tableau 5**)).

d) $ssDNA$ 10 μM vs $tDNA-Cy3$ 2 μM (étude $tDNA-Cy3$ 17 nucléotides, cf. **Tableau 5**).

Les mesures ont été réalisées en mode double grille (avec $V_{ref} = 0,5 \text{ V}$ et V_{BG} variables) dans l'objectif d'amplifier les effets de charges grâce au couplage capacitif des deux grilles. Les résultats ne montrent pas d'effet significatif de proximité des molécules *tDNA*-Cy3 vis-à-vis de l'oxyde de grille HfO_2 .

Dans l'étude n°4 (Figure 79), nous avons reproduit à nouveau les concentrations de réactifs utilisées pour l'étude initiale (étude n°1, concentrations standards) mais avec le protocole de biofonctionnalisation en phase liquide via l'EHTES. Le greffage des *ssDNA* est réalisé à l'aide du robot de dispense de gouttes. Les molécules de *ssDNA* et de *tDNA*-Cy3 utilisées sont environ deux fois moins longues que dans l'étude n°1 (cf. Tableau 5).

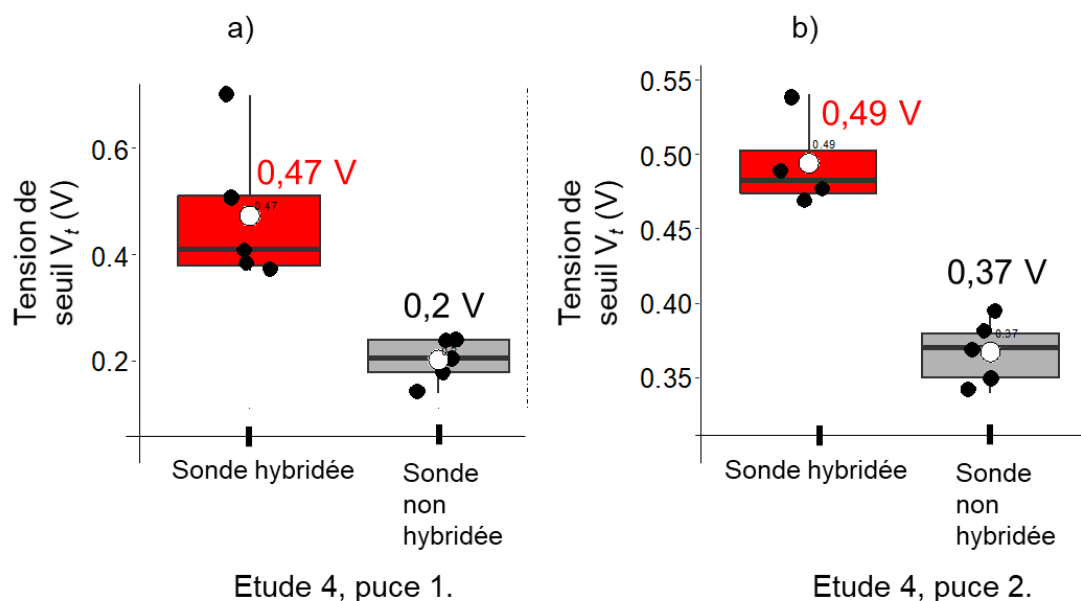


Figure 79. Etude n°4.

a) *ssDNA* 10 μM vs *tDNA*-Cy3 2 μM , puce n°1

b) *ssDNA* 10 μM vs *tDNA*-Cy3 2 μM , puce n°2 (les mesures sont refaites sur une autre puce distincte pour les besoins de répétabilité de mesures).

Les mesures de décalage de V_t sont cohérentes avec les résultats obtenus pour l'étude n°1. Sur notre première puce, nous mesurons un ΔV_t moyen de +270 mV. Sur la seconde puce, nous mesurons un ΔV_t moyen de +120 mV. Ces derniers résultats nous permettent de confirmer la preuve de concept de détection d'ADN par nos BioFETs pour une concentration de 2 μM de *tDNA*-Cy3.

4.2.4. Conclusion

Nous avons réalisé avec succès une preuve de concept de détection électrique de *tDNA*-Cy3 concentrées à 2 μM dans les deux cas de protocoles de silanisation (via APTES/GA et via EHTES). Les expériences mettant en jeu des concentrations de *tDNA*-Cy3 plus faibles (1 – 0,1 – 0,01 μM) n'ont pas permis de mettre en évidence des décalages significatifs de V_t liés aux différences de charges entre les régions de complémentarité (localisation de *duplex* de *ssDNA* \times *tDNA*-Cy3) et de non-complémentarité (absence de *duplex*, localisation de *ssDNA* dans des états « non hybridés »).

Les différenciations de V_t sur la base d'une paire de nucléotides non appariée au sein du *duplex* et sur la base de la distance entre les moitiés de *tDNA*-Cy3 (17 nucléotides) hybridées sur les portions hautes des *ssDNA* n'ont pas été concluantes. Des caractérisations de surfaces plus précises (microscopie

confocale par exemple) pourraient permettre le traçage des molécules *ssDNA* dans les cavités, des molécules *tDNA*-Cy3, et des *duplex ssDNA* × *tDNA*-Cy3 par co-localisation de fluorescence. Ces travaux pourraient être réalisés ultérieurement dans le but d'expliquer les résultats obtenus.

4.3. Détection de protéine : exemple de la thrombine

4.3.1. Bibliographie

Les biocapteurs utilisant des sondes aptamériques sont désignés par le terme aptacapteurs (« *aptasensors* ». Les aptamères ^{195,196} sont de courtes séquences oligonucléotidiques (~15 à 60 nucléotides) préconçues de manière à ce qu'ils aient des propriétés de reconnaissance pour une molécule cible donnée, de nature protéique, ou d'autre type (petites molécules d'intérêt, macromolécules, etc.). Tout d'abord « conçus » pour une application donnée, ils sont ensuite synthétisés ¹⁹⁷ *in vitro*. Contrairement aux anticorps, l'utilisation des aptamères, pour les applications de reconnaissance affine et spécifique de molécules d'intérêt, présente les avantages suivants : faible dimension, facilité de conjugaison avec des fonctions chimiques, stabilité aux variations de pH, robustesse à la dégradation chimique, repliement tridimensionnel réversible, et faible coût de fabrication ¹⁹⁸.

Dans le cadre de cette étude, un aptamère bien documenté ^{199,200}, spécifique à la thrombine, est utilisé (« thrombin binding aptamer », de séquence 5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3', **Figure 80 (1)**) pour cibler la thrombine. Mis en suspension dans une solution tampon neutre, cet aptamère « anti-thrombine » adopte une conformation tridimensionnelle dite en G-quadruplex d'environ 2 nm de diamètre ²⁰¹, structure lui conférant une fonction de sonde spécifique avec une constante de dissociation K_D relativement faible d'environ 100 nM ²⁰⁰, en présence d'autres molécules compétitives ayant elles aussi des affinités de complexation avec la thrombine.

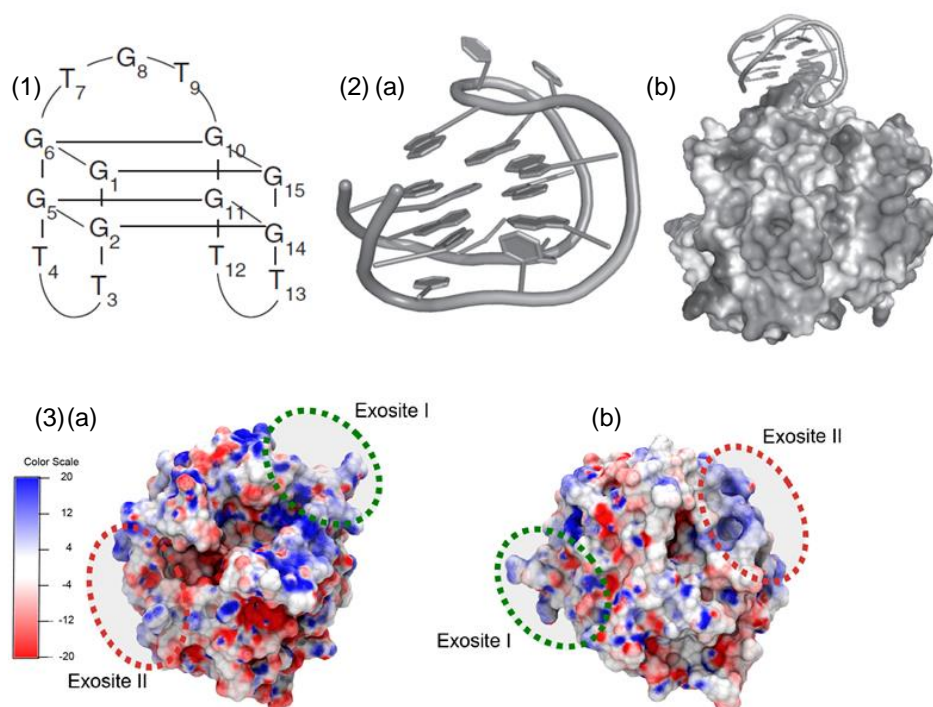


Figure 80. Illustrations d'une molécule d'aptamère antithrombine et d'une molécule de thrombine. (1) ²⁰² Représentation simplifiée de la structure G-quadruplex de l'aptamère utilisé dans la présente étude. (2) ²⁰³, (a) représentation tridimensionnelle de la conformation G-quadruplex de l'aptamère. (b) interaction aptamère antithrombine/ thrombine (l'interaction a lieu au niveau de l'exosite I. Les exosites sont des sites d'interactions entre la thrombine et ses molécules spécifiques tels que les aptamères par exemple.). (3) ²⁰⁴, (a—b) présentent deux angles de vue d'une même molécule de thrombine. La surface de la protéine est colorée suivant le potentiel électrostatique local de la protéine. Les régions électropositives ont une teinte bleue, les régions électronégatives ont une teinte rouge. La barre d'échelle varie entre +20 et -20 kT/e avec k la constante de Boltzmann, T, la température absolue en Kelvins, et e, la charge élémentaire en Coulomb.

La thrombine (**Figure 80 (3)**) est une protéase de 295 acides aminés ^{198,205}, mesurant environ 3,4 nm de diamètre ²⁰⁶, qui *in vivo*, joue un rôle central dans les métabolismes de coagulation/ anticoagulation du sang, dans plusieurs maladies cardiovasculaires, et dans l'évolution de certaines tumeurs.

Par exemple, la maladie de la thromboembolie veineuse, responsable d'environ 10 000 décès annuels en France ²⁰⁷ est due à une dérégulation de la voie métabolique de la thrombine. On comprend que le suivi du taux sanguin de thrombine dite « active » chez un patient soit d'un intérêt crucial pour la prévention et le diagnostic d'anomalies hémostatiques potentielles ²⁰⁸.

Les biocapteurs de détection de protéines « biomarqueurs » en général, ou dans ce cas présent, de thrombine, peuvent répondre à un besoin d'instrumentation facilement accessible, dédié à la mesure rapide et fiable de taux de protéines circulant dans le sang d'un patient en soin.

Plusieurs études bibliographiques ont présenté des systèmes électrochimiques de détection de thrombine sur des dispositifs de type BioFET.

Par exemple, le groupe de K. S. Kim et al. (2009) ²⁰⁹ a développé un BioFET à nanofil de Si pour la mesure de thrombine sans marqueur optique, concentrée à quelques centaines de picomolaires (pM). Le groupe de M. Hammock et al. (2013) ²¹⁰ a utilisé un BioFET de type organique (« Organic FET ») pour mener une détection en temps réel de molécules de thrombine dans une gamme de concentration allant de 0,1 à 100 nM. Les travaux du groupe de B. Ibarlucea et al. (2018) ²¹¹ ont consisté à développer des puces de transistors BioFET à réseaux de nanofils de Si (jusqu'à 10³ nanofils par dispositif) couplées avec un système microfluidique pour mener des analyses de détection de thrombine en temps réel, dans des gammes de concentration d'intérêt clinique (0,2 à 200 nM). Le groupe de N. Khan et al. (2020) ²¹² a mis en place des puces de BioFETs à feuillet de graphène qui intègrent une électrode de référence directement gravée à proximité des dispositifs. Un module microfluidique miniaturisé permet de rendre l'ensemble de leur instrument portable et apte à la mesure en temps réel de faibles concentrations de thrombine, avec une limite de détection expérimentale de 2,6 pM.

Ces études sont reportées dans le **Tableau 6**.

Actuellement, et à notre connaissance, très peu d'études proposent des expérimentations de détection de thrombine réalisées avec des structures de type BioFET à nanofils de Si.

Chapitre 4 : Caractérisations électriques des BioFETs

Ref	Transducteur	Oxyde de grille	Electrode de référence	Agent de fonctionnalisation	Aptamère anti-THR	Temporalité de mesure	LoD	Gamm de détect
K. S. Kim et al. (2009) Nanotechnology vol. 20,23 : 235501. doi:10.1088/0957-4484/20/23/235501	p-type SiNW FET Bottom-Up W10-50 nm × L1,5 µm	SiO ₂	Platinum	3-aminopropyl diethoxy-silane (3-APDES)	3'- (GGT TGG TGT GGT TGG)d-NH ₂ -5'	temps réel	330 pM	--
M. Hammock et al. (2013) ACS Nano 2013 7 (5), 3970-3980 doi:10.1021/nm305903q	Organic FET (semiconducteur organic 5,5'-bis-(7-dodecyl-9H-fluorene-2-yl)-2,2'-bithiophene complexé avec un réseau ordonné de nanoparticules d'or ("AuNP-decorated OFET"))	--	Grille en Silicium massif positionnée en face arrière du transistor OFET	Adsorption directe des molécules d'aptamère thiolé sur les nanoparticules d'or.	3'- TGGT TGG TGT GGT TGG CCC CTC TAC TTG AAT-(CH ₂) ₆ -S-S-(CH ₂) ₆ -5'	temps réel (1 mL/min)	100 pM	100 pM - 100 nM
B. Ibarlucea et al. (2018) Applied Sciences. 8. 950. 10.3390/app8060950. doi.org/10.3390/app8060950	Multi-SiNW FET non dopés Bottom-Up W22 nm × L5-10 µm	Al ₂ O ₃ (15 nm)	Ag/AgCl (commerciale)	Glycidoxypropyl triméthoxy-silane (GOPMS)	3'- GGT TGG TGT GGT TGG-T ₆ -(CH ₂) ₆ -NH ₂ -5'	temps réel (100µL/min)	200 pM	200 pM - 200 nM
N. Khan et al. (2020). The Analyst. 10.1039/D0AN00251H. doi.org/10.1039/D0AN00251H	Graphene FET Bottom-Up CVD	--	intégrée "in-plane gate electrode"	1-pyrene butyric acid N-hydroxy succinimide ester (PBASE)	3'- GGT TGG TGT GGT TGG TTC ACC TCT ACC-(CH ₂) ₆ -NH ₂ -5'	temps réel (20 µL/min)	2,6 pM	1pM - 1µM
cette étude	multi-SiNW FET, Procédé de fabrication "CMOS-compatible" 15 nanofils mesurant W0,05 × L1,5 µm	HfO ₂ (3 nm)	Ag/AgCl (commerciale)	5,6-epoxyhexyl triéthoxy silane (EHTES)	3'- GGT TGG TGT GGT TGG-T ₆ -(CH ₂) ₆ -NH ₂ -5'	point final	2,7 µM	--

Tableau 6. Résumé bibliographique des travaux de détection de thrombine sur des BioFETs de type transistors à effet de champs ²⁰⁹⁻²¹².

Dans cette étude, nous évaluons la faisabilité de la détection électrique de thrombine dans un échantillon électrolytique par l'intermédiaire de sondes aptamériques greffées à la surface de BioFETs à réseau de nanofils de Si. Encore une fois, ces BioFETs appartiennent à la région « matrice » de nos puces. Sur chaque puce, un échantillon de 30 capteurs identiques et distants d'un millimètre les uns des autres a été utilisé pour répéter l'expérimentation dans l'objectif d'inclure une approche statistique à l'étude menée. La **Figure 81** présente une micrographie d'un exemplaire de biocapteur utilisé.

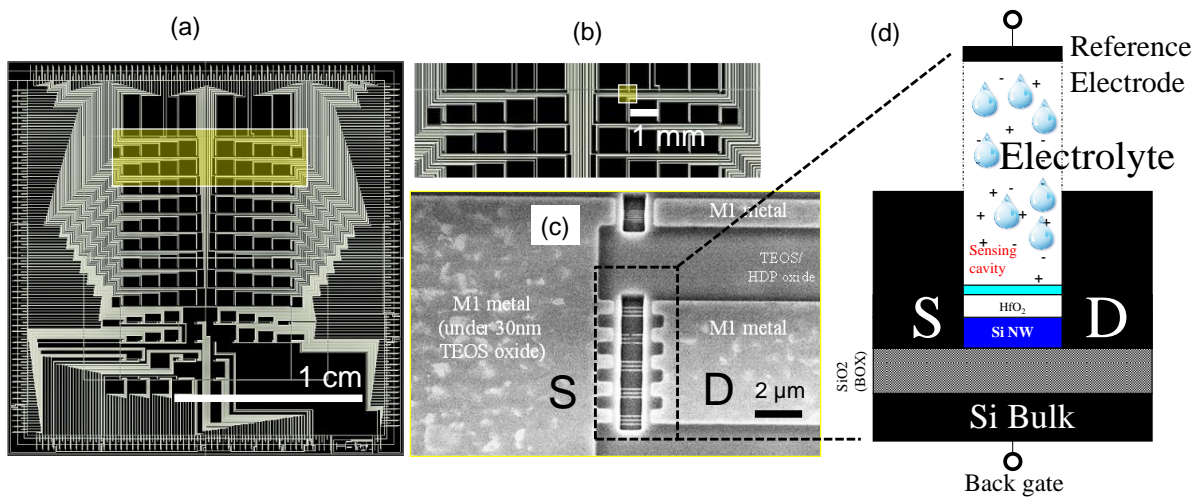


Figure 81. (a) Plan de notre puce constituée de plusieurs centaines de bioFETs indépendants, (b) Région contenant les bioFETs identiques organisés en matrice et espacés d'un millimètre les uns des autres. Les lignes blanches représentent les lignes métalliques d'alimentation des bioFETs. Ces lignes connectent les dispositifs aux plots gravés en périphérie de la puce. Les plots ne sont pas représentés, (c) un bioFET à réseau de nanofils de Si. Plus précisément, un réseau de 15 nanofils (150 nm de large et 1,5 μm de long chacun) est visible dans le fond de la cavité (1,5 μm \times 8,5 μm). (d) Représentation schématique de notre dispositif bioFET sur lequel nous sommes venus greffer une couche d'aptamères représentée en bleu turquoise.

4.3.2. Méthodes de fonctionnalisation des oxydes de grille des transistors et détection électrique des molécules de thrombine

Les molécules sondes aptamériques (DCM, UGA, France) sont diluées à la concentration de 10 μM dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (1,5125 g/L du réactif « Tris », additionné d'ions K^+ (0,0625 g/L) dont le pH est ajusté à partir d'une solution HCl à la valeur de 7,4). Les ions K^+ sont rajoutés à la solution afin que la réaction de repliement des aptamères en structure quadruplex soit avancée en faveur de la configuration repliée ²¹³ (Figure 80 (1), et (2)(a)).

Les molécules d' α -thrombine humaine lyophilisées (Merck, France) sont diluées à une concentration de 2,7 μM dans un tampon « sodium phosphate » très faiblement concentré à 0,1 mM, et de pH acide : pH = 5,4. Un électrolyte faiblement concentré en ions permet la diminution des effets d'écrantage des charges contenues dans l'électrolyte et donc une meilleure distance d'effet de charge (couplage capacitif) entre les charges biologiques contenues dans l'électrolyte et le canal de conduction du BioFET. Par exemple, pour un électrolyte concentré à 0,01 \times , la hauteur d'effet de charge électrostatique (longueur de Debye) au-dessus de l'oxyde de grille est de $\sim 7,3$ nm ^{210,212,214}.

Avant la caractérisation électrique des BioFETs, la surface des capteurs est fonctionnalisée à partir d'une silanisation par voie EHTES et suivant les étapes présentées dans la Figure 82.

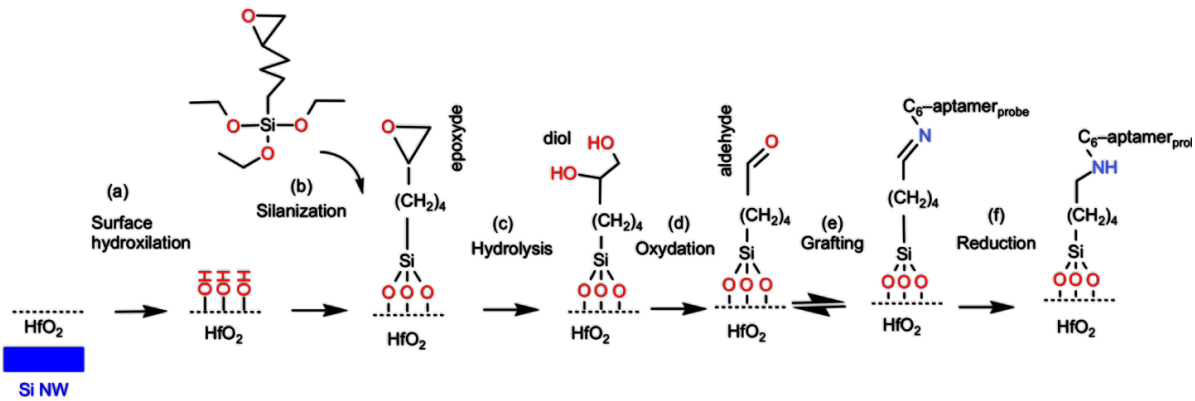


Figure 82. Illustration schématique des étapes de fonctionnalisation de surface d'oxyde de grille HfO₂ pour les expérimentations de détection électrique de molécules de thrombine. (a) L'étape d'hydroxylation de surface est réalisée par exposition des puces à un plasma « O₂ », (b) le silane est greffé en phase liquide. Le silane est un intermédiaire de fixation sur lequel les molécules sondes aptamériques sont conjuguées via des liaisons imines covalentes. (e) Un volume de 20 µL de solution de sondes aptamériques concentrées à 10 µM est déposé à l'étape de greffage. Ce volume suffit à recouvrir la totalité de la surface des transistors à greffer. (f) L'étape finale du procédé de fonctionnalisation consiste à stabiliser les doubles liaisons de « jonction » pontant les couches de silane et d'aptamère, en liaisons simples imines moins réactives et plus stables.

4.3.2.1. Détails du protocole de fonctionnalisation

Après le nettoyage aux solvants de la surface des biopuces, les BioFETs sont exposés à un plasma O₂ d'hydroxylation de surface, permettant un nouveau nettoyage de leur surface, et la création de radicaux hydroxyles à la surface de l'oxyde HfO₂ recouvrant les nanofils de Si (**Figure 82 (a)**). Les puces sont ensuite silanisées (**Figure 82 (b)**) en phase liquide dans une enceinte close, contenant une solution d'epoxysilane 5,6-epoxyhexyltriethoxysilane (EHTES) 0,12% et de triéthylamine 3,4%, diluées dans du toluène absolu (*cf.* **chapitre 3, III, 2**).

Après une première phase réactionnelle réalisée dans un four (80°C, durant 16h), une seconde phase de recuit de la couche de silane formée sur les surfaces précédemment hydroxylées est effectuée (110°C durant 180 min). Les fonctions époxydes terminant les molécules d'epoxysilane EHTES sont hydrolysées en « diols » en présence d'acide sulfurique H₂SO₄ 5% (120 min) **Figure 82 (c)** et la mise en solution des échantillons dans du réactif NaIO₄, (1h) permet la formation de fonctions terminales « aldéhyde » surfaciques (**Figure 82 (d)**).

Le greffage des sondes aptamériques « antithrombine » terminées par une fonction amine en position 5' (3'-GGTTGGTGTGGTTGG-T₆-(CH₂)₆-NH₂-5') est réalisé manuellement par un dépôt du réactif effectué avec une micropipette. L'étape consiste à déposer un volume de 20 µL suffisant de la solution de sondes aptamériques (concentrée à 10 µM) à la surface de la puce à greffer, de manière à recouvrir la surface des BioFETs et à remplir leur cavité d'approvisionnement. La solution migre par capillarité dans la cavité d'approvisionnement, arrive en contact avec la surface de l'oxyde de grille HfO₂ silanisée et réagit avec celle-ci. La réaction de greffage débute son avancement (**Figure 82 (e)**).

La puce est conservée dans un cristallisoir clos à fort taux d'humidité pendant 48h, durant lesquelles la réaction de greffage des sondes aptamériques sur la couche de silane se fait par formation de liaisons imines pontant les aptamères à la couche de silane.

Après le greffage des aptamères, un rinçage simple des échantillons à l'eau déionisée est réalisé.

Les différentes couches de fonctionnalisation sont stabilisées (réduction des doubles liaisons en liaisons simples) lors d'un traitement de surface qui consiste à immerger les puces dans une solution de NaBH_4 durant 60 min à température ambiante (**Figure 82 (f)**).

L'étape finale de fonctionnalisation consiste en un nettoyage des échantillons avec du détergent SDS (0,2%), suivi de plusieurs rinçages effectués à l'eau déionisée.

Cette fonctionnalisation de surface conditionne l'état de surface pour mieux fixer les molécules cibles (la thrombine) sur l'aptamère.

Les expérimentations de détection de thrombine consistent à déposer une solution électrolytique contenant la protéine, à la surface des échantillons. Le dépôt de thrombine est répété afin de garder la surface des puces toujours humide et l'électrode de référence toujours immergée.

Le temps de conjugaison de la thrombine à son aptamère est de l'ordre de grandeur de la demi-heure dans les conditions des expérimentations ²¹⁵⁻²¹⁷ menées dans la présente étude.

4.3.2.2. Etapes de caractérisations électriques

Les étapes de caractérisations électriques sont réalisées sur une station de tests sous pointes connectée à un analyseur (*Semiconductor Parameters Analyzer* HP4156A). Le courant de drain I_{DS} est mesuré en fonction de la tension de grille V_{REF} appliquée sur l'électrode de référence Ag/AgCl immergée dans l'électrolyte. Cette tension varie entre -0,5 et 2V avec un pas de 20 mV. La tension de source (V_S) et la tension de la grille positionnée en face arrière (V_{BG}) sont nulles. La tension de drain (V_{DS}) est fixée à 1V.

La **Figure 83** illustre les méthodologies de mesures des caractéristiques électriques des biocapteurs. En particulier, les caractéristiques de transfert des BioFETs ont été mesurées en milieu liquide après **4 étapes clefs** de fabrication des aptacapteurs :

1. BioFETs non fonctionnalisés, avant le greffage des sondes aptamériques, caractérisés en présence de tampon « sodium acétate » 100 mM, pH 7, volume déposé $V = 100 \mu\text{L}$ (**Figure 83 (1)(a)**)
 2. Aptacapteurs après le greffage des sondes aptamériques, caractérisés en présence de tampon « sodium acétate » 100 mM, pH 7, $V=100 \mu\text{L}$ (**Figure 83 (1)(b)**)
 3. Aptacapteurs après le greffage des sondes aptamériques, caractérisés en présence de tampon Phosphate (tampon de dilution de la thrombine), 0,01×, pH 5,4 ; $V=100 \mu\text{L}$ (**Figure 83 (2)(a)**)
 4. Aptacapteurs après introduction de thrombine (2,7 μM , pH 5,4 ; $V=100\mu\text{L}$) (**Figure 83 (1)(b)**)
- Ces mesures ont été effectuées sur 2 puces qui comptent chacune 30 aptacapteurs, tous identiques.

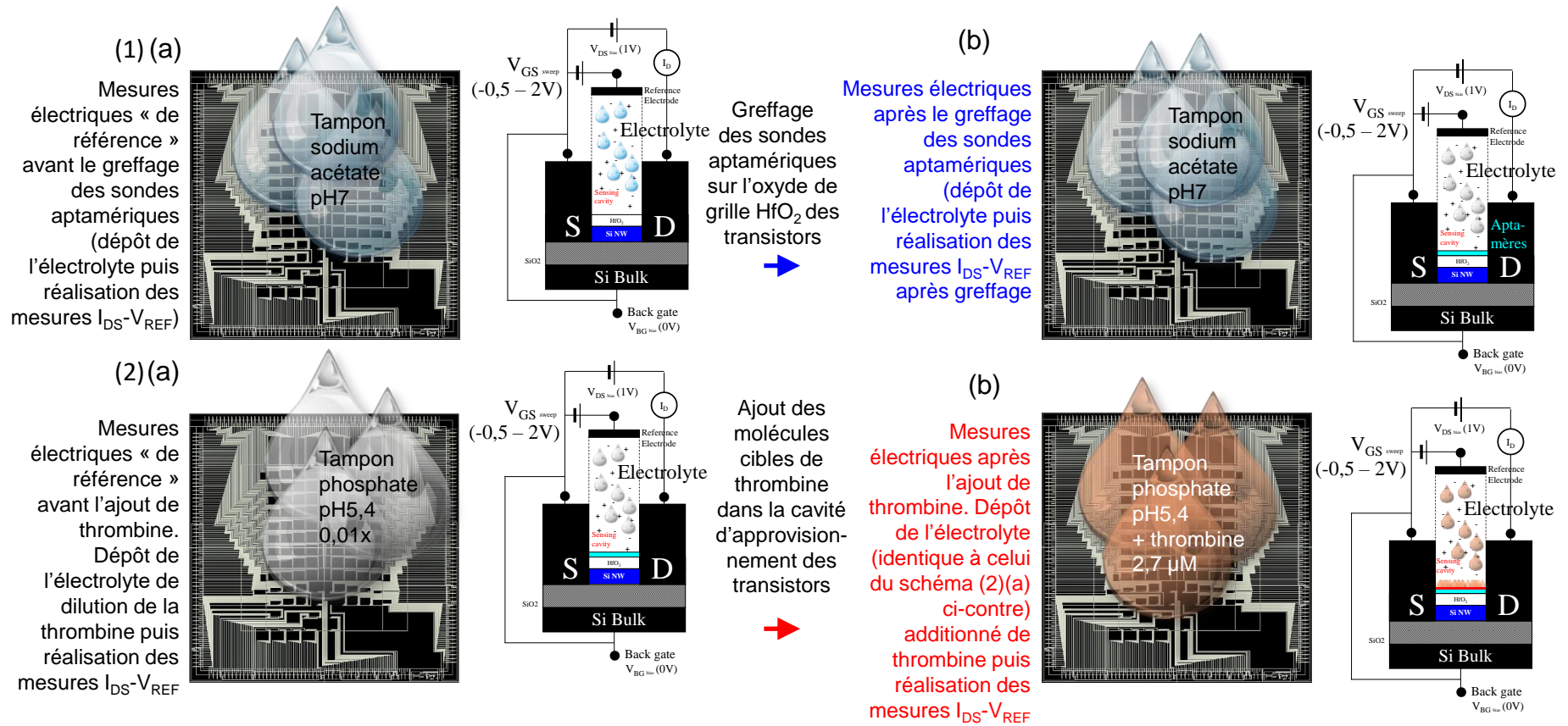


Figure 83. Illustration des différentes étapes de caractérisation électrique des BioFETs. (1)(a) Caractérisation de référence permettant l'extraction des tensions de seuil V_t des transistors utilisés. (b) caractérisation électrique post-greffage des molécules sondes aptamériques. (2)(a) Caractérisation de référence relatif à l'ajout de la solution tampon de dilution de la thrombine. (b) Caractérisation finale des BioFETs effectuée après l'ajout de la solution tampon contenant des protéines de thrombine concentrées à 2,7 μM .

4.3.3. Résultats et Discussion

4.3.3.1. Analyses de mouillabilité

L'hydroxylation de surface réalisée sur les puces implique indirectement l'hydroxylation de la surface des oxydes de grille HfO_2 . Localement, l'exposition de l'oxyde au plasma gazeux énergétique a pour effet l'excitation des atomes d'oxygène qui se délient les uns des autres et acquièrent un état transitoire hydraté « OH ». Cet hydroxyle ou radical hydroxyle constitue un site actif fortement hydrophile, expliquant la faible valeur d'angle de contact mesuré (**Tableau 7**). La silanisation de surface est réalisée après que l'étape d'hydroxylation de surface ait été confirmée par des mesures d'angle de goutte. Localement, les molécules d'organosilane réagissent par condensation avec les sites actifs hydroxyyles. La liaison définitive de la couche de silane sur la surface de HfO_2 est corroborée par une nette augmentation de l'angle de contact mesuré (augmentation de l'angle de contact de $+41^\circ$). L'étape de greffage des sondes aptamériques induit également une augmentation de l'angle de contact de goutte mesuré ($+7^\circ$). Ces mesures indiquent une fixation réussie des sondes à la surface de l'oxyde de grille des BioFETs.


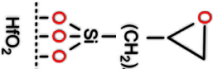
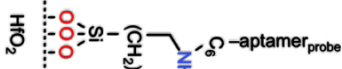
Etat de surface de la puce	Hydroxylation	Silanisation	Greffage
Schématisation de l'état de surface			
Mesure d'angle de contact	$\sim 1^\circ$	$\sim 41^\circ$	$\sim 48^\circ$

Tableau 7. Caractérisation de surface à partir de mesures d'angle de contact.

Les mesures d'angle de contact sont réalisées après le dépôt d'une goutte d'un microlitre d'eau déionisée à la surface des puces. L'angle de contact entre la goutte et la surface du substrat est mesuré par une caméra. La précision sur la mesure de l'angle se fait à $\pm 10^\circ$. Plus la goutte s'étale au contact du substrat, plus la surface est hydrophile. L'angle peut varier entre 0° et 180° . Une goutte posée sur une surface hydrophile présente un angle de contact faible. En cas de surface hydrophobe, la goutte présente un angle de contact supérieur à 90° .

4.3.3.2. Analyses des caractéristiques électriques

La **Figure 84** montre un exemple représentatif de caractéristiques de transfert obtenues sur un même aptacpteur aux 4 étapes clés de fabrication décrites plus haut. Cette figure montre, étape par étape, les décalages de tension de seuil ΔV_t observés, lesquels sont très certainement induits par le procédé de fonctionnalisation et de détection de la thrombine et donc liés aux modifications chimiques successives se produisant à la surface de l'oxyde de grille HfO_2 .

Sur la **Figure 84 (1)(a)**, la caractéristique de transfert $I_{DS}-V_{REF}$ permet l'extraction d'une tension de seuil dite de « référence » et se référant au BioFET non fonctionnalisé. Celle-ci se déplace vers la droite, comme indiqué par la flèche rouge (**Figure 84 (1)(b)**, V_t de l'aptacpteur), après le greffage des sondes aptamériques chargées négativement.

Puis, la tension de seuil des dispositifs est mesurée à nouveau, cette fois ci en présence du tampon utilisé pour la dilution des molécules de thrombine, permettant ainsi l'obtention d'une nouvelle tension de « référence » avant l'ajout de thrombine (Figure 84 (2)(a)).

Enfin, une dernière mesure électrique est réalisée après l'introduction du tampon contenant les molécules de thrombine afin d'évaluer le décalage de tension de seuil induit par la présence de charges positives introduites par la thrombine (Figure 84 (2)(b)).

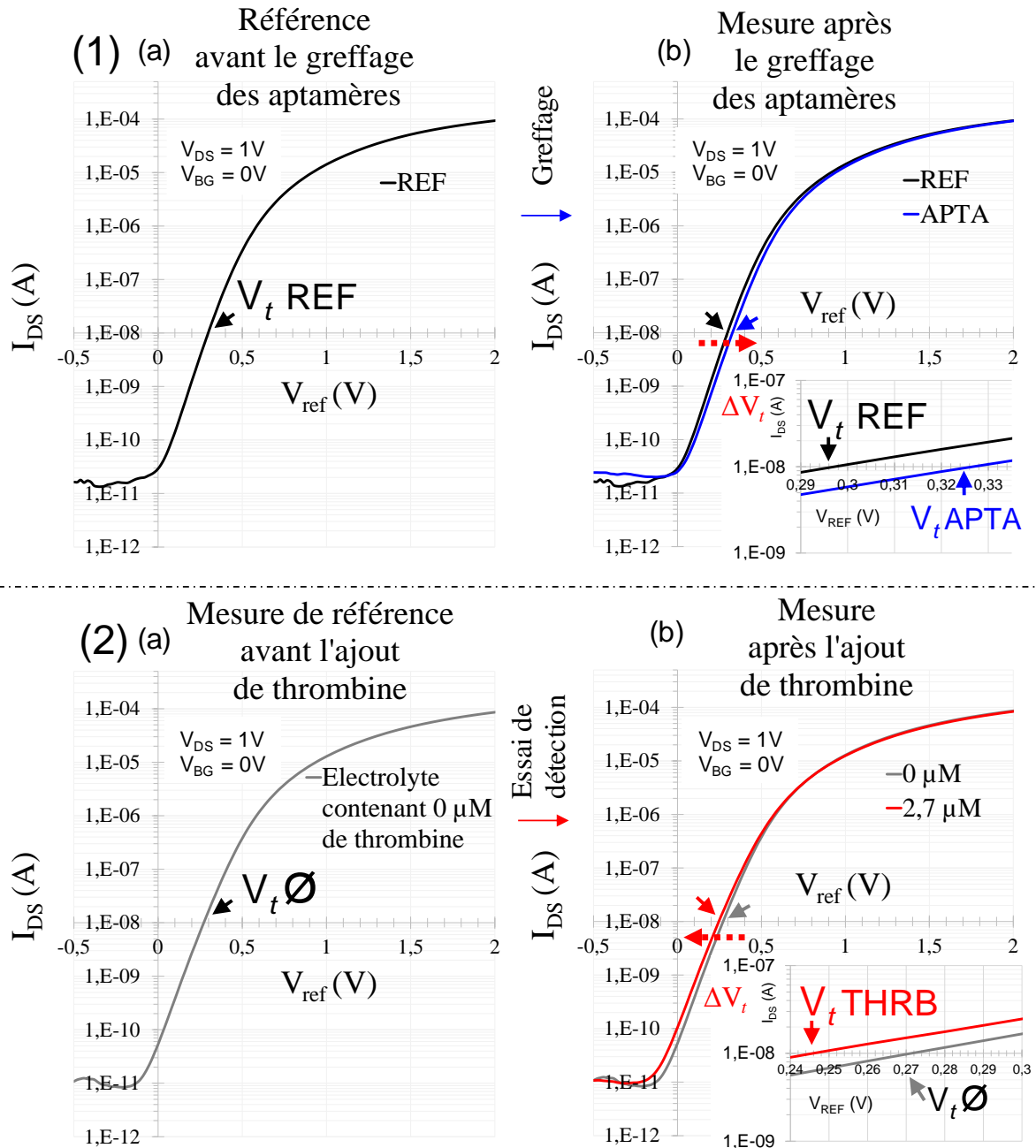


Figure 84. Caractéristiques de transfert I_{DS} - V_{REF} en milieu liquide réalisées aux quatre étapes clés de fabrication des aptacapteurs de détection électrique de thrombine. **(1)(a)** I_{DS} - V_{REF} de référence du « transistor », **(b)** I_{DS} - V_{REF} du transistor fonctionnalisé et greffé avec les aptamères (le transistor est dès lors nommé aptacapteur) **(2)(a)** I_{DS} - V_{REF} de l'aptacapteur en présence de l'électrolyte de dilution des molécules de thrombine (pH 5,4 ; 0 μM de

thrombine). **(2)(b)** $I_{DS}-V_{REF}$ réalisée après l'ajout de 2,7 μM de thrombine. Le tampon de dilution est identique au tampon utilisé pour les mesures réalisées à l'étape précédente « **(2)(a)** ».

Dans la suite, nous détaillons les différentes évolutions des caractéristiques électriques obtenues sur différents dispositifs après le greffage des sondes aptamériques et après la reconnaissance de la thrombine.

1. Mesure électrique des aptacapteurs après le greffage des sondes aptamériques.

Au cours de la première phase de mesures, le greffage des molécules sondes aptamériques sur l'oxyde de grille HfO_2 des BioFETs est évalué sur 2 puces qui comptent chacune 30 aptacapteurs. La **Figure 85** présente des exemples de caractéristiques électriques d'évaluation de greffage de sondes aptamériques à la surface de l'oxyde de grille d'aptacapteurs des puces 1 et 2.

Sur la 1^{ère} puce, entre les mesures « de référence » réalisées avant le greffage des sondes et les mesures réalisées après le greffage, 27 aptacapteurs sur 30 ont présenté un décalage ΔV_t moyen positif de +28,8 mV.

Sur la seconde puce, 22 aptacapteurs sur 30 ont également présenté un décalage ΔV_t moyen positif de +87,7 mV.

Ces décalages de tension de seuil sont très certainement indicatifs d'un changement d'état de surface de l'oxyde de grille HfO_2 des aptacapteurs, induit par l'effet électrostatique des charges négatives portées par les molécules sondes aptamériques.

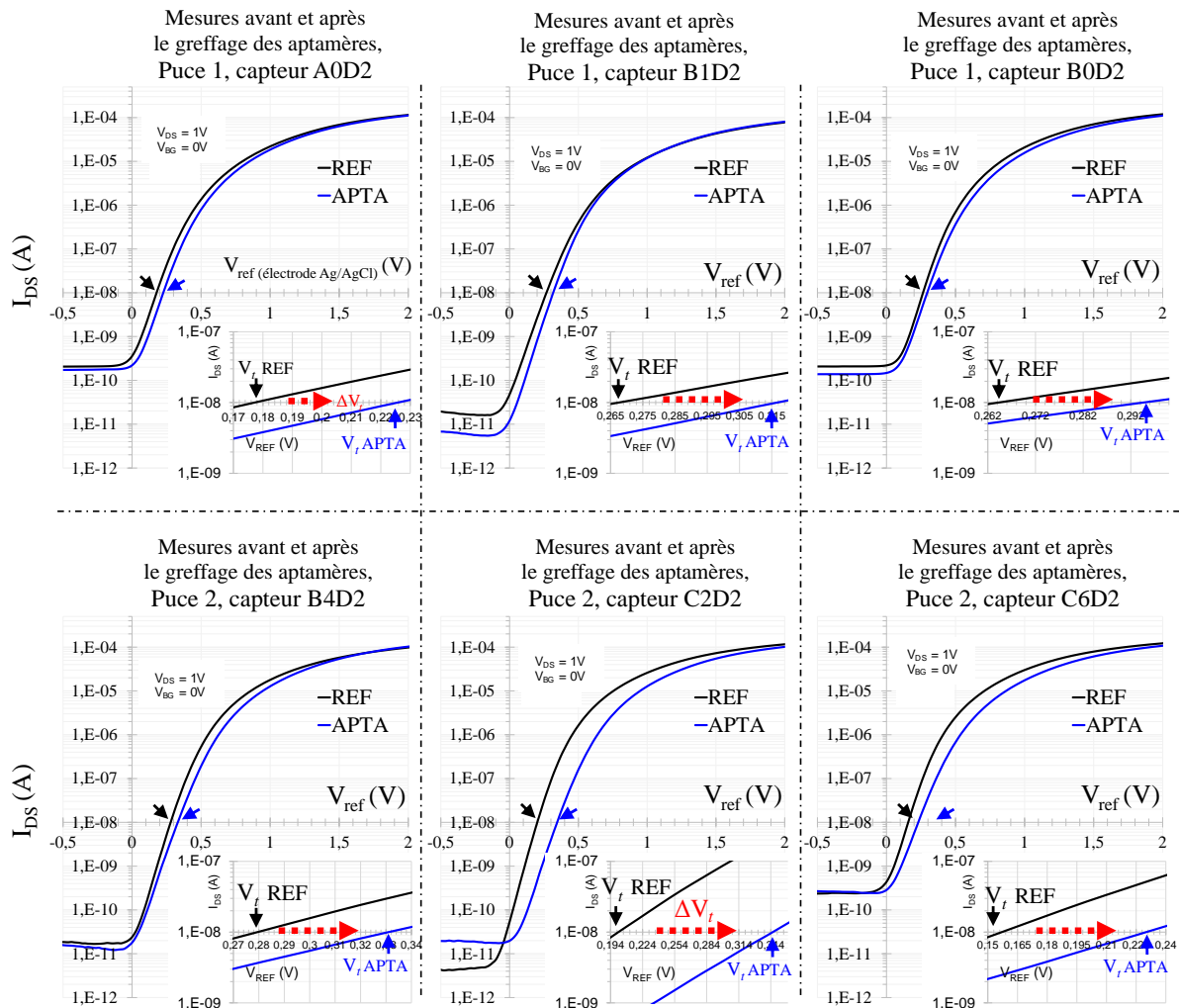


Figure 85. Exemples représentatifs de caractéristiques de transfert des aptacapteurs. Le décalage ΔV_t positif est très certainement lié au greffage des molécules sondes aptamériques sur l'oxyde de grille HfO_2 des BioFETs.

Pour un même courant I_{DS} sélectionné dans la région sous le seuil (10^{-8} A dans notre cas), les charges surnuméraires portées par les sondes aptamériques augmentent la valeur de tension de grille V_{REF} nécessaire à l'établissement du canal de conduction.

Le sens positif du décalage est expliqué par le fait que les BioFETs utilisés soient de type « n ». En somme, pour cette première phase, sur la première puce, 27 aptacapteurs sur 30 (90%) ont répondu favorablement au greffage des aptamères. Sur la seconde puce, 22 aptacapteurs sur 30 (73,3%) ont répondu favorablement au greffage.

La différence de V_t moyen post greffage entre la première puce et la seconde puce (+28,8 mV vs +87,7 mV respectivement) peut être expliquée par des biais de manipulations lors du dépôt manuel des solutions de sondes aptamériques à la surface des puces. Cette solution aurait pu ne pas être totalement homogène, induisant un dépôt plus concentré en molécules sondes aptamériques à la surface de la seconde puce.

Notons que seuls les aptacapteurs ayant eu une réponse positive au greffage seront considérés pour la suite de l'étude qui se focalise sur la détection de thrombine.

2. Détection électronique des molécules de thrombine

Chapitre 4 : Caractérisations électriques des BioFETs

La seconde phase de mesures de détection de la thrombine est réalisée en deux étapes. La première étape consiste à sonder électriquement les aptacpteurs en présence d'un tampon de dilution « à blanc » (concentration en thrombine de $0 \mu\text{M}$). Il s'agit d'une caractérisation de référence effectuée avant que les caractérisations électriques ne soient faites en présence de cette même solution tampon, chargée en thrombine (concentration en thrombine de $2,7 \mu\text{M}$).

La seconde étape consiste à mener les caractérisations électriques quelques heures après l'immersion des aptacpteurs dans la solution tampon contenant les molécules de thrombine. La thrombine ayant un pH isoélectrique (pH_i : pH de neutralité électrique) compris entre 7 et 7,6²¹⁰, le tampon de dilution utilisé est ajusté à un pH de 5,4 dans l'objectif de déplacer son équilibre de charge vers une charge globale positive.

Relativement aux mesures de référence effectuées sans thrombine, l'ajout de thrombine dans la solution tampon a induit un décalage ΔV_t moyen négatif de $-26,6 \text{ mV}$ sur la première puce (23 aptacpteurs sur 27 ayant répondu de façon propice à l'introduction de thrombine (85%).

Sur la seconde puce, le décalage ΔV_t moyen est également négatif et vaut $-23,8 \text{ mV}$ (20 aptacpteurs sur 22, soit 91%). La **Figure 86** présente des exemples de caractéristiques électriques d'essais de détection de thrombine.

Les résultats obtenus sont cohérents avec le fait que dans son tampon de dilution, la thrombine soit positivement chargée. Ce surplus de charges positives augmente localement le potentiel électrostatique qui s'applique sur l'oxyde de grille HfO_2 des aptacpteurs et favorise davantage la formation du canal de conduction sous-jacent. Il en résulte que la tension de seuil V_t de l'aptacpteur se décale vers des tensions plus faibles. Toutes les valeurs de V_t et de ΔV_t sont répertoriées dans le **Tableau 8**.

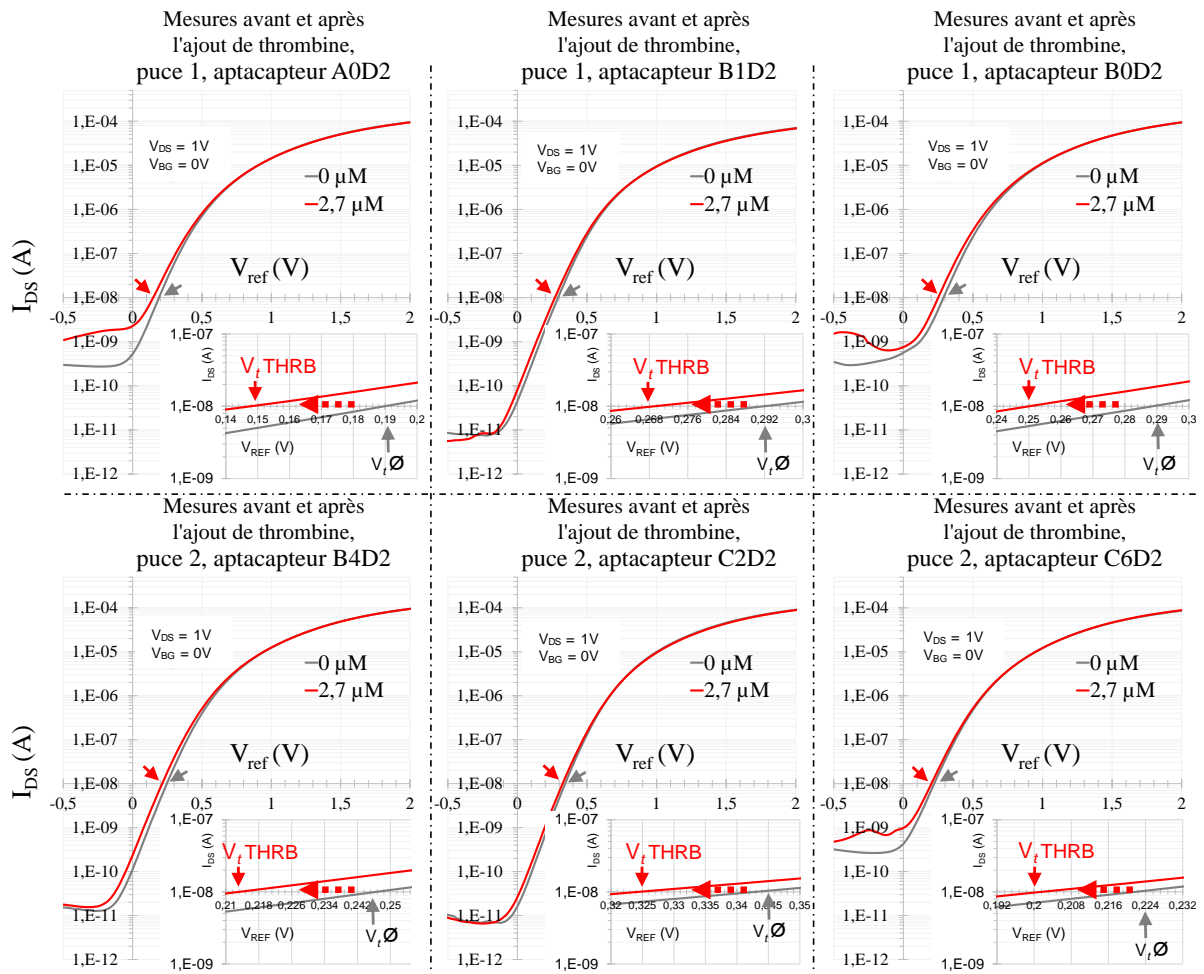


Figure 86. Exemples de caractéristiques de transfert typiques des aptacapteurs détectant électriquement des charges de thrombine. Le décalage ΔV_t négatif est expliqué par la présence de thrombine à proximité de l'oxyde de grille HfO_2 des aptacapteurs, très certainement complexée aux sondes aptamériques.

Puce 1	Phase 1		Phase 2		ΔV_t , greffage (mV)	ΔV_t , détection thrombine (mV)	Puce 2	Phase 1		Phase 2		ΔV_t , greffage (mV)	ΔV_t , détection thrombine (mV)
	V_t pH7, avant greffage aptamère (V)	V_t pH7, après greffage aptamère (V)	V_t tampon "blanc" 0,01x pH 5,4 (V)	V_t tampon + thrombine (2,7 μ M) (V)				V_t pH7, avant greffage aptamère (V)	V_t pH7, après greffage aptamère (V)	V_t tampon "blanc" 0,01x pH 5,4 (V)	V_t tampon + thrombine (2,7 μ M) (V)		
A1D2	0,354	0,388	0,384	0,390	34	6	A2D2	0,215	0,232	0,210	0,176	17	-34
A2D2	0,358	0,410	0,414	0,456	52	42	A4D2	0,252	0,272	0,220	0,170	20	-50
A3D2	0,215	0,230	0,228	0,200	15	-28	A5D2	0,169	0,228	0,294	0,278	59	-16
A4D2	0,240	0,276	0,275	0,260	36	-15,2	A8D2	0,164	0,276	0,278	0,263	112	-15
A8D2	0,225	0,246	0,235	0,211	21	-24	A9D2	0,144	0,215	0,201	0,192	71	-9
A9D2	0,255	0,275	0,266	0,238	20	-28	A0D2	0,154	0,330	0,322	0,340	176	18
A0D2	0,178	0,226	0,192	0,148	48	-44	B3D2	0,188	0,304	0,339	0,310	116	-28,9
B1D2	0,266	0,316	0,292	0,270	50	-22	B4D2	0,280	0,331	0,246	0,214	51	-32,4
B2D2	0,212	0,240	0,205	0,188	28	-17	B6D2	0,156	0,238	0,255	0,227	82	-28
B3D2	0,241	0,260	0,243	0,232	19	-11	B8D2	0,193	0,206	0,216	0,190	13	-26
B4D2	0,181	0,201	0,175	0,165	20	-10	B9D2	0,154	0,186	0,192	0,171	32	-20,5
B5D2	0,165	0,198	0,175	0,162	33	-13	B0D2	0,189	0,298	0,322	0,302	109	-20
B6D2	0,207	0,235	0,228	0,208	28	-20	C1D2	0,274	0,770	0,794	0,769	496	-25
B7D2	0,220	0,250	0,241	0,215	30	-26	C2D2	0,202	0,348	0,343	0,325	146	-18
B9D2	0,241	0,252	0,344	0,307	11,5	-37	C3D2	0,225	0,362	0,373	0,349	137	-24
B0D2	0,265	0,295	0,288	0,249	30	-39	C4D2	0,223	0,248	0,249	0,218	25	-31,9
C1D2	0,297	0,327	0,272	0,246	30	-26	C5D2	0,154	0,169	0,143	0,112	14,5	-30,5
C2D2	0,321	0,355	0,335	0,329	34	-6	C6D2	0,158	0,230	0,222	0,202	72	-20
C3D2	0,210	0,247	0,209	0,330	36,5	121	C7D2	0,222	0,268	0,270	0,254	46	-16
C4D2	0,292	0,340	0,323	0,318	48	-5	C8D2	0,224	0,237	0,231	0,209	12,6	-22
C5D2	0,196	0,230	0,205	0,193	34	-12	C9D2	0,184	0,203	0,161	0,153	19	-8
C6D2	0,161	0,178	0,178	0,136	17,4	-42	C0D2	0,180	0,283	0,140	0,195	102,5	55
C7D2	0,203	0,218	0,230	0,196	15	-34					\bar{X} (mV)	87,7	-23,8
C8D2	0,215	0,230	0,680	0,600	15	-80					Médiane (mV)	65	-23
C9D2	0,225	0,240	0,240	0,208	15	-32,5							
C0D2	0,318	0,347	0,355	0,316	29	-39							
					\bar{X} (mV)	28,8							
					Médiane (mV)	29,5							

Tableau 8. Tableau répertoriant l'ensemble des valeurs de V_t ainsi que les décalages de V_t (ΔV_t) extraits des quatre étapes clés de caractérisation électrique des aptacapteurs (voir **Figures 85** et **86**).

Enfin, la **Figure 87** présente des diagrammes en boîte réalisés sur la base des ΔV_t extraits des caractéristiques électriques de chacun des biocapteurs caractérisés. Cette représentation permet de constater visuellement les dispersions intra-puces à chacune des étapes de caractérisation électrique.

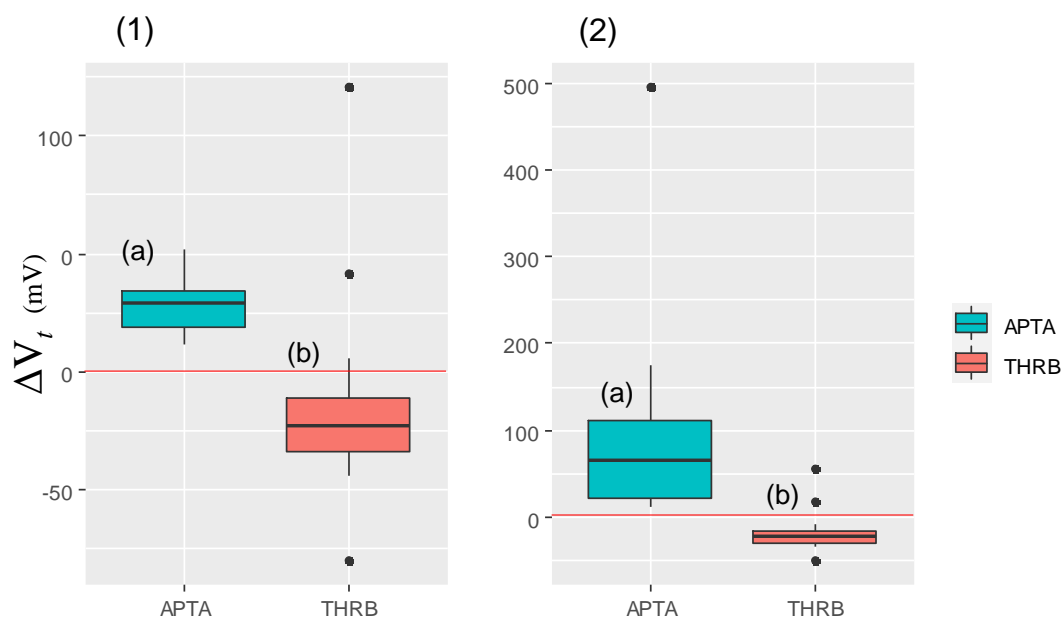


Figure 87. Diagrammes en boîtes représentant les décalages de tension de seuil ΔV_t extraits des caractéristiques de transfert de l'ensemble des aptacapteurs utilisés sur (1) la puce n°1 et (2) la puce n°2 lors des quatre étapes clés de caractérisation électrique des aptacapteurs. (a) ΔV_t liés au greffage des sondes aptamériques, (b) ΔV_t liés au décalage de V_t entre le tampon à « blanc » ($0 \mu\text{M}$ de thrombine) et le tampon contenant de la thrombine ($2,7 \mu\text{M}$). La ligne rouge indique la tension de seuil ΔV_t de référence des capteurs avant le greffage des molécules sondes ou avant l'introduction de thrombine.

4.3.4. Conclusion

La présente étude sert de preuve de concept de faisabilité de détection de protéines sur les BioFETs que nous avons fabriqués. Le cas de la thrombine est intéressant car il s'agit d'un biomarqueur ayant des enjeux d'ampleur dans le domaine clinique et donc souvent utilisé comme biomarqueur modèle dans les travaux de détection de protéines.

Deux puces indépendantes issues d'une même plaque SOI ont été fonctionnalisées avec une solution d'aptamère spécifique à la thrombine. Le greffage covalent des sondes aptamériques à la surface des biocapteurs a induit un décalage moyen de la tension de seuil (ΔV_t) des transistors greffés de $+28,8 \text{ mV}$ sur la première puce, et de $+87,7 \text{ mV}$ sur la seconde, confirmant le greffage effectif des molécules sondes à la surface de l'oxyde de grille HfO_2 des BioFETs. Les taux de succès au greffage sont de 90% des BioFETs sur la première puce et de 73% sur la seconde, indiquant un bon niveau de fiabilité des procédés de fonctionnalisation de surface utilisés.

L'ajout de solutions tampons contenant de la thrombine ($2,7 \mu\text{M}$) à la surface de ces mêmes BioFETs a induit un décalage ΔV_t moyen de $-26,6 \text{ mV}$ sur la première puce, et de $-23,8 \text{ mV}$ sur la seconde, décalages relatifs aux V_t de référence sans thrombine (solution tampon contenant $0 \mu\text{M}$ de thrombine).

Les perspectives de ce travail consisteront à :

1. Procéder à des caractérisations morphologiques et physicochimiques de surface pour vérifier la présence de thrombine à l'intérieur des cavités des bioFETs nous ayant permis l'obtention des précédents résultats électriques.
2. Mesurer la détection de la thrombine en temps réel, et ce, pour différentes concentrations de thrombine, dans le but de définir les temps de détection et la limite de détection de la thrombine.

5. Conclusion générale

La problématique principale de ce travail a été le développement de BioFETs à nanofils de Si fabriqués sur des substrats SOI 200mm pour une mesure reproductible d'espèces chimiques et biologiques.

Le chapitre 1 de la thèse a été consacré à l'état de l'art des dispositifs BioFET en général, et des BioFETs à nanofils de Si en particulier ainsi que sur leur principe de fonctionnement en milieu liquide. Ce travail bibliographique nous a permis de mettre en évidence leurs points forts (structure unidimensionnelle, intégration dense, forte sensibilité de détection, temps de réponse instantané, multiplexage de la mesure, simplicité d'utilisation) et les différents verrous s'opposant à leur démocratisation et à leur commercialisation.

L'un des principaux verrous identifiés par la communauté scientifique est leur capacité à être fabriqué à grande échelle de façon reproductible avec des couches de fonctionnalisation parfaitement maîtrisées d'un dispositif à l'autre. Ces verrous sont des défis majeurs auxquels les ingénieurs devront apporter des réponses afin que les BioFETs soient intégrés sur le marché des dispositifs de diagnostic clinique.

Dans le deuxième chapitre, nous avons décrit les principales étapes technologiques qui nous ont permis de fabriquer les dispositifs BioFET. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des procédés standards de fabrication, utilisés dans le domaine de la microélectronique (photolithographies / gravures / dépôts / planarisation). Les procédés de fabrication dont nous nous sommes servis sont bien maîtrisés par nos équipes en salle blanche. Ils sont compatibles avec les procédés de fabrication des dispositifs CMOS, ce qui leur confère une certaine robustesse. Les cavités microfluidiques débouchant sur l'oxyde de grille HfO_2 des BioFETs ont été gravées afin d'y introduire les échantillons électrolytiques testés. Pour ce nouveau module, tout comme pour les autres étapes de fabrication, plusieurs étapes de métrologie (mesures d'épaisseurs, MEB, TEM, AFM) ont été effectuées pour le suivi des caractéristiques morphologiques de nos dispositifs.

Un autre avantage de notre approche est la possible cointégration des BioFETs à une électronique CMOS pour améliorer le traitement du signal de sortie (filtrage, augmentation du rapport signal sur bruit, amplification, communication).

Chaque plaque SOI intègre plusieurs dizaines de puces, et chaque puce contient plusieurs centaines de BioFETs avec des motifs variés (réseaux de nanofils de Si, nanofil unitaire, microrubans, motifs en ruche d'abeilles...) et de dimensions variées (de 30 nm jusqu'à 1 μm de large, et de 250 nm à 10 μm de long). Cette multiplicité de motifs et de dimensions a été définie dans l'objectif de mener des études comparatives de sensibilité suivant le motif ou la dimension.

Après les étapes de fabrication, les dispositifs ont été électriquement caractérisés (à sec) afin de vérifier leur bon fonctionnement. Conformément à nos attentes, les caractéristiques de transfert obtenues étaient similaires à des caractéristiques de transfert de transistors MOSFETs conventionnels. Nous avons pu étudier l'effet de la largeur des dispositifs sur la tension de seuil. Nous avons ainsi vérifié que la tension de seuil des dispositifs est d'autant plus grande que la largeur diminue, conformément aux mesures faites sur la technologie CMOS. L'absence d'effets de canaux courts s'explique aisément par le fait que la longueur des fils de Si reste toujours supérieure à 500 nm. Enfin, des rapports de courant $I_{\text{ON}}/I_{\text{OFF}}$ de 10^6 ont été mesurés sur les derniers lots.

Tout au long de cette thèse, un effort particulier a été mené afin d'améliorer les différents procédés de fabrication dans l'objectif de rendre les dispositifs BioFET toujours plus robustes à la mesure. Nous avons ainsi quantifié l'influence de la gravure des cavités microfluidiques sur les performances électriques de nos dispositifs. Pour réduire les écarts de tension de seuil entre les dispositifs ouverts (cavité formée) et non ouverts (cavité non gravée), nous avons utilisé un recuit *forming gas* qui nous a

Conclusion générale

permis de « guérir » une partie importante des défauts générés lors de la gravure. Avec ce procédé, la suppression des charges fixes parasites a conduit à fortement réduire la dispersion des tensions de seuil.

Toujours dans l'objectif de réaliser des études de variabilité intra-puces, nous avons également dessiné une matrice composée de 100 dispositifs identiques dans la région centrale de la puce. Cette configuration nous a été très utile pour valider la détection électrique d'une hybridation de brins d'ADN complémentaires ainsi que la détection de la thrombine.

Dans le chapitre 3 de la thèse, nous avons mené un travail conséquent sur la fonctionnalisation de brins d'ADN par silanisation aminosilane 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) en phase vapeur ou epoxysilane 5,6-epoxyhexyltriéthoxysilane (EHTES) en phase liquide pour assurer une bonne homogénéité de la couche de fonctionnalisation. Il s'agissait de mettre en place un protocole rigoureux qui nous permettrait, dans un second temps, de réaliser une première preuve de concept de détection électrique de deux brins d'ADN complémentaires.

Les résultats des caractérisations optiques obtenues en microscopie de fluorescence ont montré que les molécules d'ADN sondes ont été greffées avec succès sur la surface des puces et également à l'intérieur des cavités microfluidiques quel que soit le protocole utilisé. Néanmoins, la fonctionnalisation par silanisation employant l'aminosilane APTES conjugué à l'intermédiaire glutaraldéhyde (GA) a induit des inhomogénéités d'aspect remarquées sur les couches de fonctionnalisation produites, ainsi que des niveaux de bruit de fond élevés, indiquant la présence de molécules d'ADN cibles fluorescentes sur des régions n'ayant pas été greffées avec des molécules d'ADN sondes complémentaires. À la suite de ces observations, différentes expérimentations nous ont permis de démontrer que les sources de bruit étaient liées aux interactions non spécifiques entre les molécules d'ADN et les différents intermédiaires de fonctionnalisation, à savoir les surfaces d'oxydes hydroxylées, les couches d'APTES, et les couches de GA.

La silanisation en phase liquide réalisée en utilisant l'epoxysilane EHTES nous a permis de nous affranchir des limitations précédemment décrites. L'utilisation d'un robot de micro-déposition dans le cadre de ce dernier protocole a permis de réaliser des dépôts localisés de plots de sondes nucléotidiques précisément sur les cavités microfluidiques des dispositifs, et également de faire un pas vers l'automatisation du protocole de fonctionnalisation.

Après avoir établi un protocole de fonctionnalisation robuste, nous avons voulu vérifier que nos dispositifs pouvaient fonctionner comme des capteurs de charges en milieu liquide. Ce travail a fait l'objet du chapitre 4 de la thèse. Dans un premier temps, notre objectif était d'évaluer la sensibilité de nos dispositifs aux charges ioniques contenues dans des tampons électrolytiques. Pour cela, nous avons réalisé des mesures de pH sur des dispositifs (ISFETs) de motifs et de dimensions variables. Une électrode de référence commerciale Ag/AgCl nous a permis de polariser l'électrolyte déposé sur la surface de la puce. Deux modes différents de mesure ont été évalués. Dans le mode de mesure à simple grille, qui est le mode de mesure standard, la variation de la tension appliquée sur l'électrode de référence permet l'obtention d'une courbe de transfert pour un pH d'électrolyte donné. Ces mesures ont montré que nos dispositifs ISFET étaient caractérisés par des sensibilités reproductibles proches de la limite de Nernst (60 mV/pH). Pour améliorer nettement cette sensibilité, nous avons aussi utilisé un second mode de caractérisation électrique basé sur une approche dite « double-grille ». Avec cette approche, l'idée était de profiter d'un couplage capacitif entre les deux grilles asymétriques (face avant et face arrière). Ce couplage capacitif nous a permis d'obtenir un gain notable de la sensibilité mesurée. La sensibilité maximale obtenue grâce à ce mode de mesure est d'environ 1,6 V/pH, soit ~27 fois la limite de Nernst.

Dans l'objectif de démontrer la capacité de nos dispositifs à détecter les charges portées par des molécules biologiques, nous avons ensuite greffé des sondes oligonucléotidiques sur les oxydes de grille des BioFETs afin de les rendre sensibles aux molécules d'ADN cibles de séquences complémentaires. Des sondes nucléotidiques aptamériques ont également été greffées dans un second temps pour détecter la présence de protéines (thrombine).

Conclusion générale

À la suite des étapes de fonctionnalisation et indépendamment des protocoles de fonctionnalisation utilisés, nous avons réalisé avec succès des preuves de concept de détection électrique de molécules d'ADN cibles concentrées à 2 μM sur différentes puces. Pour cela, deux groupes de BioFETs ont été utilisés. Le premier a été fonctionnalisé et greffé avec des molécules d'ADN sondes complémentaires tandis que le second « dispositifs de contrôle » a été fonctionnalisé et greffé avec des molécules sondes non complémentaires. Après les hybridations réalisées avec des molécules d'ADN cibles uniques (complémentaires aux molécules sondes greffées dans l'un des deux groupes), les caractérisations électriques des BioFETs appartenant aux deux groupes ont permis d'observer des écarts de tension de seuil d'environ 200 mV suivant la nature complémentaire ou non complémentaire des molécules d'ADN sondes greffées. Ce décalage de tension de seuil s'est avéré être cohérent avec l'apport de charges négatives portées par les molécules d'ADN greffées à la surface de nos BioFETs.

Dans une dernière étude, nous avons cherché à démontrer la capacité de nos dispositifs à détecter des protéines à l'aide de sondes de nature aptamériques. Nous avons greffé des aptamères à la surface de l'oxyde de grille HfO_2 de nos dispositifs suivant le protocole utilisant l'époxy-silane EHTES. L'aptamère utilisé est spécifique à la thrombine, une protéine « biomarqueur » ayant des enjeux d'ampleur dans le domaine clinique. Deux puces ont été utilisées. Le greffage covalent des sondes aptamériques à la surface des dispositifs a induit un décalage moyen de la tension de seuil des dispositifs greffés de +28,8 mV sur la première puce, et de +87,7 mV sur la seconde, confirmant le greffage effectif des molécules sondes à la surface de l'oxyde de grille HfO_2 .

Ultérieurement, l'ajout de solutions tampons concentrées à 2,7 μM en thrombine a induit un décalage moyen de -26,6 mV sur la première puce, et de -23,8 mV sur la seconde, décalages relatifs aux tensions de seuil de référence mesurées au cours des caractérisations de solutions tampons sans thrombine (solution tampon de dilution de la thrombine contenant 0 μM de thrombine).

Enfin, dans l'objectif de réaliser des mesures en temps réel et des mesures multiplexées, nous avons dessiné puis fabriqué un système microfluidique simplifié à trois canaux indépendants. La fabrication a été réalisée par micro-usinage à l'aide d'une fraiseuse assistée par un ordinateur et l'intégration du système microfluidique sur la puce a été fait par collage mécanique à l'aide d'un film adhésif à double face. La fabrication de ce système microfluidique permettra ultérieurement les premiers tests de mesure en temps réel.

6. Perspectives

Les dispositifs que nous avons fabriqués ont démontré avec succès leur bon fonctionnement électrique à différents niveaux :

- au cours des caractérisations électriques à sec,
- capacité à détecter de façon sensible et reproductible les charges ioniques à partir de mesures de pH,
- capacité à détecter de façon sensible et reproductible les charges constitutives des molécules biologiques au travers des détections électriques des molécules d'ADN et de thrombine.

Des mesures de détection de biomolécules en mode de mesure à double grille pourront être réalisées dans l'objectif de connaître la sensibilité de nos dispositifs tout en diminuant nos limites de détection actuelles.

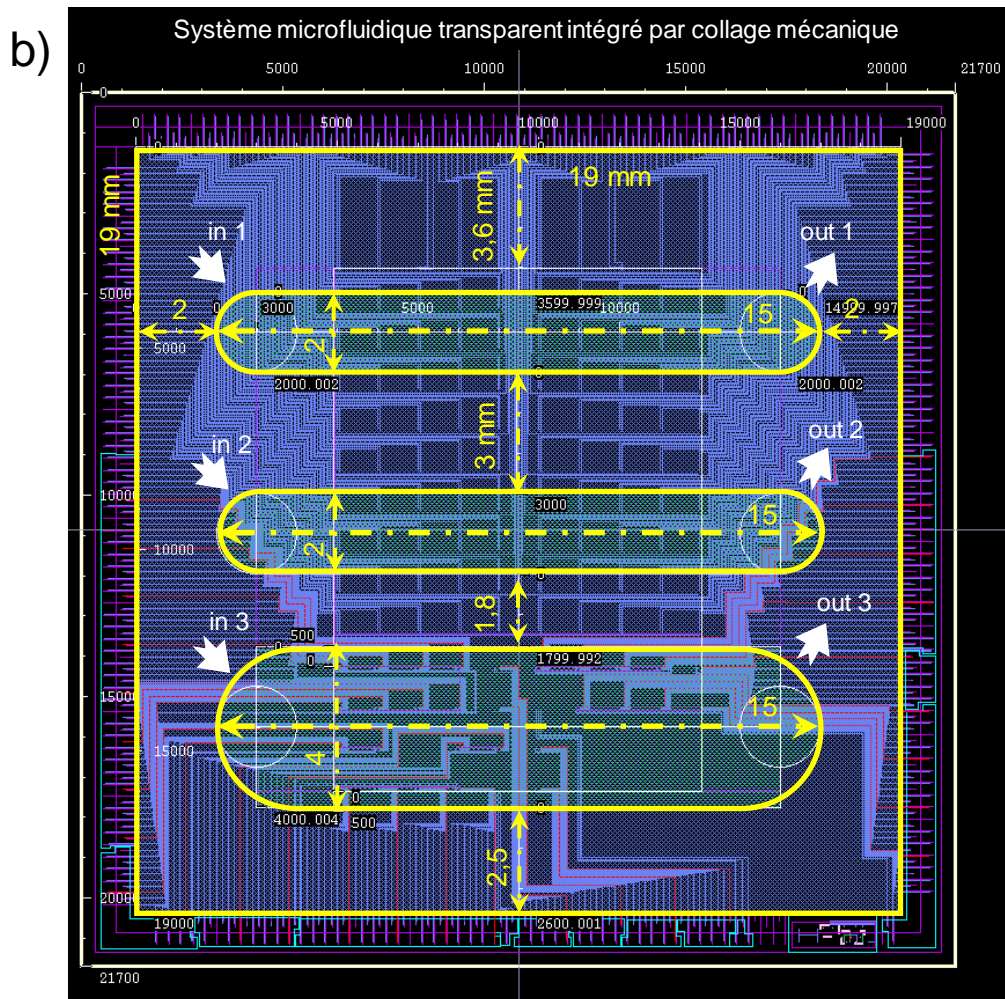
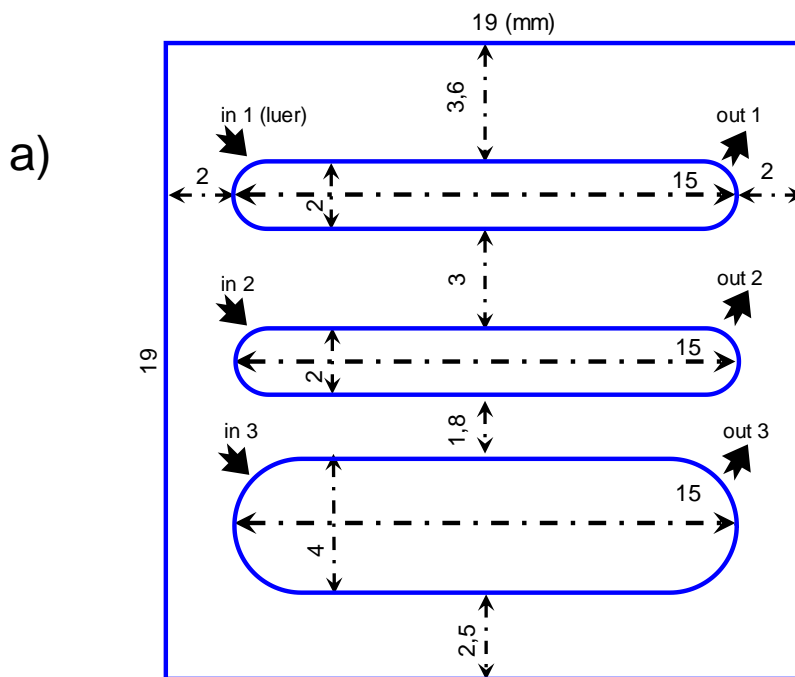
Le développement d'un système microfluidique multicanaux avancé capable de gérer la préparation et l'acheminement de faibles volumes d'échantillons vers les dispositifs pourra permettre de réaliser des mesures en temps réels et des mesures multiplexées consistant à détecter des molécules cibles variées en parallèle grâce à une fonctionnalisation différenciée des différentes lignes des dispositifs appartenant à la région « matrice ».

L'intégration d'un module microfluidique, sur lequel nous avons commencé à travailler, permettra :

1. L'introduction précise et localisée de très faibles volumes d'échantillon à l'intérieur des cavités microfluidiques, directement sur l'oxyde de grille HfO_2 des dispositifs, ou sur les sondes biochimiques si l'oxyde de grille a été préalablement fonctionnalisé et greffé.
2. La mesure en temps réel des événements de variation de pH ou d'hybridation ou plus généralement, les phénomènes de complexation entre les sondes et les cibles introduites.
3. Les mesures réalisées en parallèle (multiplexage)

Les plans du système microfluidique que nous avons fabriqué pour nos puces sont présentés sur la **Figure 88**. Trois canaux indépendants ont été dessinés. Les deux premiers canaux approvisionnent des dispositifs à réseau de nanofils de Si de la région « matrice ». Le troisième canal approvisionne l'ensemble des dispositifs possédant des motifs et des dimensions variables.

Design du système microfluidique à 3 canaux, vue du dessus



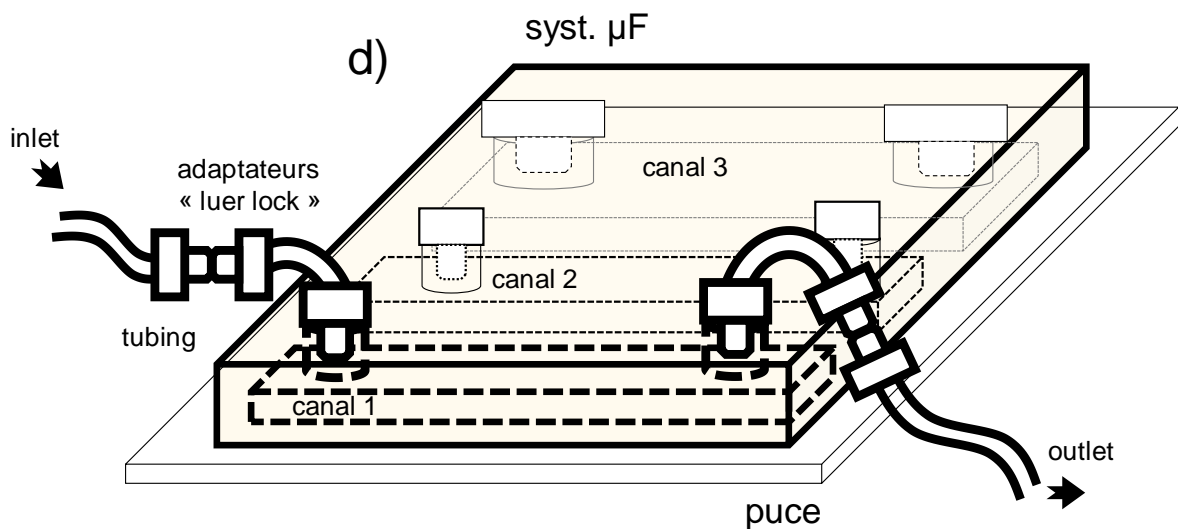
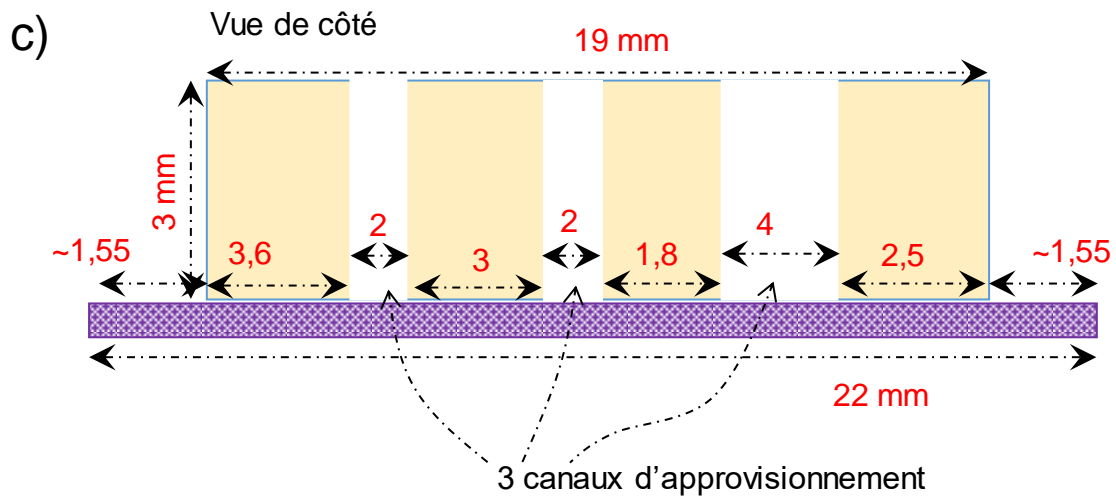


Figure 88. Plans du système microfluidique fabriqué. a) système microfluidique vu du dessus. 3 canaux indépendants sont dessinés. b) Les deux premiers canaux (en partant d'en haut) recouvrent chacun deux lignes de dispositifs dans la région « matrice ». Le troisième canal recouvre tous les dispositifs à motifs et dimensions variables. c) Le canal microfluidique a une faible épaisseur de 3 mm et provoque donc un très faible encombrement. d) schéma « 3D » du système microfluidique collé sur une puce. Le premier canal (canal 1) est connecté à des tubes qui permettent d'approvisionner les dispositifs concernés en échantillon.

Le design de notre système microfluidique a été réalisé sur Solidworks (Dassault Systèmes). L'usinage du bloc de polymère transparent (copolymère d'oléfine cyclique (COC), de référence COC 6013-S04, fabricant TOPAS) est fait par une fraiseuse de micro-usinage dont les déplacements dans la masse de COC sont commandés par un ordinateur (Micro-usinage CNC, (commande numérique par ordinateur), robot Datron M7HP). Les déplacements de la « fraise » effacent la matière et crée les canaux microfluidiques.

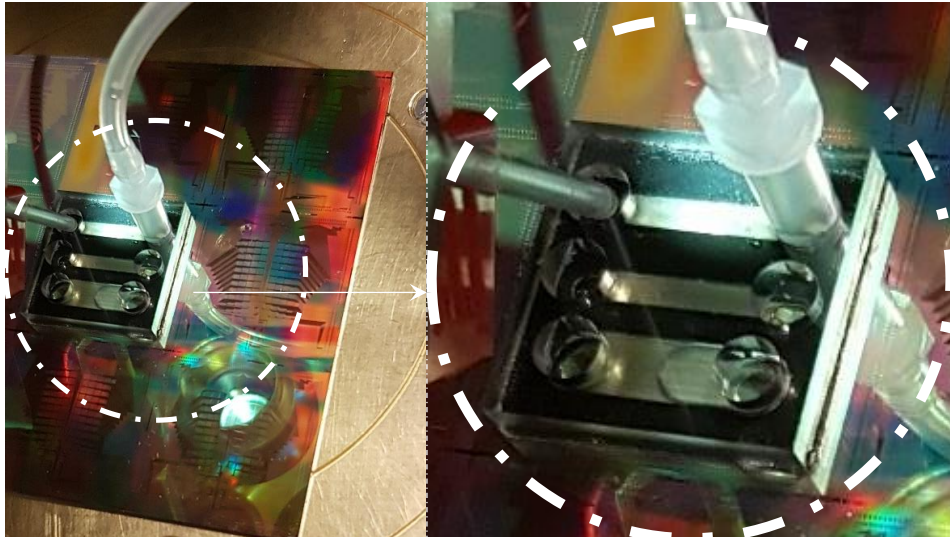


Figure 89. Photographie d'un système microfluidique collé sur une puce.

Le film adhésif double-face de couleur noire qui permet de coller mécaniquement le système microfluidique sur la surface de la puce est découpé par un traceur de découpe MIMAKI CFL-605RT. Les prototypes sont fabriqués au CEA-LETI/ DTBS.

Des adaptateurs « **luer lock** » permettent de connecter le prototype à des tubes en téflon qui acheminent des solutions électrolytiques dans les canaux microfluidiques.

La **Figure 89** montre une photographie d'un prototype de système microfluidique collé sur une puce.

Des mesures de caractéristiques électriques en voie liquide nous ont permis d'identifier les améliorations à apporter à la prochaine version du prototype. Le collage mécanique ne tient pas dans la durée, sous les pressions répétées des flux d'entrée et de sortie de l'électrolyte. En effet, l'électrolyte finit par s'infiltrer entre la surface de la puce et le film de colle lors des injections réalisées par poussée avec une seringue manuelle.

Un emplacement dédié à l'électrode de référence devra être intégré au plus près du « luer lock » d'entrée fluide (*inlet*) **Figure 88 (d)**.

L'utilisation d'une pompe d'approvisionnement continu de fluides sous un flux pourra nous permettre de réaliser des mesures de pH ou de molécules biologiques en temps réel.

L'intégration de nos puces auprès de systèmes de mesure et de traitement du signal (filtrage, amplification, communication) est aussi une perspective centrale qui permettrait un gain d'autonomie et de fiabilité pour nos dispositifs.

Le protocole de silanisation par l'epoxysilane pourra être intégré en routine de fonctionnalisation et automatisé pour être utilisé à l'échelle de la plaque de silicium.

D'autres structures à nanofils de Si développées dans nos laboratoires, tels que les nanofils suspendus et superposés, pourraient aussi permettre d'aller au-delà de nos limites de détection actuelles.

Enfin, l'intégration de lignes métalliques servant d'électrodes de référence, directement gravées sur les puces, au voisinage des dispositifs, est également une piste en cours de réflexion pour la miniaturisation et l'instrumentalisation des puces.

7. Références

1. Moore, G. E. Cramming more components onto integrated circuits. *Proc. IEEE* (1998) doi:10.1109/JPROC.1998.658762.
2. Rothberg, J. M. *et al.* An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* **475**, 348–352 (2011).
3. Toumazou, C. *et al.* Simultaneous DNA amplification and detection using a pH-sensing semiconductor system. *Nat. Methods* **10**, 641–646 (2013).
4. Andryukov, B. G., Besednova, N. N., Romashko, R. V., Zaporozhets, T. S. & Efimov, T. A. Label-Free Biosensors for Laboratory-Based Diagnostics of Infections: Current Achievements and New Trends. *Biosensors* **10**, 1–22 (2020).
5. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* (2016) doi:10.1042/EBC20150001.
6. Bahadir, E. B. & Sezgentürk, M. K. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. *Anal. Biochem.* **478**, 107–120 (2015).
7. Alves, R. C., Barroso, M. F., González-García, M. B., Oliveira, M. B. P. P. & Delerue-Matos, C. New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2016) doi:10.1080/10408398.2013.831026.
8. James, T., Mannoor, M. S. & Ivanov, D. V. BioMEMS - Advancing the frontiers of medicine. *Sensors* **8**, 6077–6107 (2008).
9. Gubala, V., Harris, L. F., Ricco, A. J., Tan, M. X. & Williams, D. E. Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Anal. Chem.* **84**, 487–515 (2012).
10. Tran, D. P., Pham, T. T. T., Wolfrum, B., Offenhäusser, A. & Thierry, B. CMOS-compatible silicon nanowire field-effect transistor biosensor: Technology development toward commercialization. *Materials (Basel)*. **11**, (2018).
11. Kuan, D. H. *et al.* A microfluidic device integrating dual CMOS polysilicon nanowire sensors for on-chip whole blood processing and simultaneous detection of multiple analytes. *Lab Chip* **16**, 3105–3113 (2016).
12. Castro-Wallace, S. L. *et al.* Nanopore DNA Sequencing and Genome Assembly on the International Space Station. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
13. Lu, H., Giordano, F. & Ning, Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **14**, 265–279 (2016).
14. Haleem, A., Javaid, M., Singh, R. P., Suman, R. & Rab, S. Biosensors applications in medical field: A brief review. *Sensors Int.* (2021) doi:10.1016/j.sintl.2021.100100.
15. Zucolotto, V. Specialty Grand Challenges in Biosensors. *Front. Sensors* (2020) doi:10.3389/fsens.2020.00003.
16. Schober, P., Bossers, S. M., Krage, R., De Leeuw, M. A. & Schwarte, L. A. Portable Blood (Gas) Analyzer in a Helicopter Emergency Medical Service. *Air Med. J.* **38**, 302–304 (2019).
17. Freckmann, G. *et al.* User Performance Evaluation of Four Blood Glucose Monitoring Systems Applying ISO 15197:2013 Accuracy Criteria and Calculation of Insulin Dosing Errors. *Diabetes Ther.* (2018) doi:10.1007/s13300-018-0392-6.
18. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* (2001) doi:10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
19. Nagel, B., Dellweg, H. & Gierasch, L. M. Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure Appl. Chem.* (2007) doi:10.1351/pac199264010143.
20. Cremer, M. Über die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von polyphasischen Elektrolytketten. *Z. Biol.* (1906).
21. Hughes, W. S. The potential difference between glass and electrolytes in contact with the glass. *J. Am. Chem. Soc.* (1922) doi:10.1021/ja01433a021.
22. Sörensen, S. P. L. Über die Messung und Bedeutung der Wasserstoffionen-konzentration bei biologischen Prozessen. *Ergebnisse der Physiol.* (1912) doi:10.1007/BF02325444.

Références

23. Severinghaus, J. W. & Astrup, P. B. History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode. *Journal of Clinical Monitoring* (1986) doi:10.1007/BF01637680.
24. Clark, L. C. & Lyons, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1962) doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
25. Hammond, J. L., Formisano, N., Estrela, P., Carrara, S. & Tkac, J. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays Biochem.* (2016) doi:10.1042/EBC20150008.
26. Updike, S. J. & Hicks, G. P. The enzyme electrode. *Nature* (1967) doi:10.1038/214986a0.
27. Guilbault, G. G. & Montalvo, J. G. A Urea-Specific Enzyme Electrode. *Journal of the American Chemical Society* (1969) doi:10.1021/ja01036a083.
28. Bergveld, P. Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **BME-17**, 70–71 (1970).
29. Yoo, E. H. & Lee, S. Y. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sensors* (2010) doi:10.3390/s100504558.
30. Naresh, V. & Lee, N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors (Switzerland)* (2021) doi:10.3390/s21041109.
31. Teles, F. R. R. & Fonseca, L. P. Trends in DNA biosensors. *Talanta* (2008) doi:10.1016/j.talanta.2008.07.024.
32. Monteiro, T. & Almeida, M. G. Electrochemical Enzyme Biosensors Revisited: Old Solutions for New Problems. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* (2019) doi:10.1080/10408347.2018.1461552.
33. Schachinger, F., Chang, H., Scheiblbrandner, S. & Ludwig, R. Amperometric biosensors based on direct electron transfer enzymes. *Molecules* (2021) doi:10.3390/molecules26154525.
34. Mollarasouli, F., Kurbanoglu, S. & Ozkan, S. A. The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. *Biosensors* (2019) doi:10.3390/bios9030086.
35. Damborský, P., Švitel, J. & Katrlík, J. Optical biosensors. *Essays Biochem.* (2016) doi:10.1042/EBC20150010.
36. Chen, C. & Wang, J. Optical biosensors: An exhaustive and comprehensive review. *Analyst* (2020) doi:10.1039/c9an01998g.
37. Cho, I. H., Kim, D. H. & Park, S. Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomaterials Research* (2020) doi:10.1186/s40824-019-0181-y.
38. Singh, A. *et al.* Recent advances in electrochemical biosensors: Applications, challenges, and future scope. *Biosensors* (2021) doi:10.3390/bios11090336.
39. Pohanka, M. Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications. *Materials* (2018) doi:10.3390/ma11030448.
40. Cali, K., Tuccori, E. & Persaud, K. C. Gravimetric biosensors. in *Methods in Enzymology* (2020). doi:10.1016/bs.mie.2020.05.010.
41. Wang, L., Sipe, D. M., Xu, Y. & Lin, Q. A MEMS thermal biosensor for metabolic monitoring applications. *J. Microelectromechanical Syst.* (2008) doi:10.1109/JMEMS.2008.916357.
42. Rocchitta, G. *et al.* Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. *Sensors (Switzerland)* (2016) doi:10.3390/s16060780.
43. Farzin, L., Shamsipur, M., Samandari, L. & Sheibani, S. Advances in the design of nanomaterial-based electrochemical affinity and enzymatic biosensors for metabolic biomarkers: A review. *Microchimica Acta* (2018) doi:10.1007/s00604-018-2820-8.
44. Leech, D. Affinity biosensors. *Chemical Society Reviews* (1994) doi:10.1039/CS9942300205.
45. Rogers, K. R. Principles of affinity-based biosensors. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology* (2000) doi:10.1385/mb:14:2:109.
46. Leonardi, A. A. *et al.* Fluorescent biosensors based on silicon nanowires. *Nanomaterials* (2021) doi:10.3390/nano11112970.
47. Bharadwaj, R. *et al.* Evanescent wave absorbance based fiber optic biosensor for label-free detection of E. coli at 280nm wavelength. *Biosens. Bioelectron.* (2011) doi:10.1016/j.bios.2010.12.014.
48. Singh, P. SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges. *Sensors and*

Références

- Actuators, B: Chemical* (2016) doi:10.1016/j.snb.2016.01.118.
49. Kim, D. M., Park, J. S., Jung, S. W., Yeom, J. & Yoo, S. M. =biosensing applications using nanostructure-based localized surface plasmon resonance sensors. *Sensors* (2021) doi:10.3390/s21093191.
 50. Taitt, C. R., Anderson, G. P. & Ligler, F. S. Evanescent wave fluorescence biosensors: Advances of the last decade. *Biosens. Bioelectron.* (2016) doi:10.1016/j.bios.2015.07.040.
 51. Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. & Reimhult, E. Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors* (2008) doi:10.3390/s8031400.
 52. Lyu, Y. *et al.* Solid-contact ion-selective electrodes: Response mechanisms, transducer materials and wearable sensors. *Membranes* (2020) doi:10.3390/membranes10060128.
 53. Kaisti, M. Detection principles of biological and chemical FET sensors. *Biosens. Bioelectron.* **98**, 437–448 (2017).
 54. Bergveld, P. ISFET, Theory and Practice. *IEEE Trans. Electron Devices* (2003).
 55. Kaisti, M. Detection principles of biological and chemical FET sensors. *Biosens. Bioelectron.* **98**, 437–448 (2017).
 56. Denuault, G. Electrochimie Physique et Analytique. *J. Electroanal. Chem.* (2002) doi:10.1016/s0022-0728(02)00708-8.
 57. Sung, D. & Koo, J. A review of BioFET's basic principles and materials for biomedical applications. *Biomed. Eng. Lett.* (2021) doi:10.1007/s13534-021-00187-8.
 58. Bergveld, P. Short Communications: Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* (1970) doi:10.1109/TBME.1970.4502688.
 59. Laschi, S. & Mascini, M. Planar electrochemical sensors for biomedical applications. *Med. Eng. Phys.* (2006) doi:10.1016/j.medengphy.2006.05.006.
 60. Shen, M., Li, B. & Li, Y. Biosensors and Bioelectronics Silicon nanowire field-effect-transistor based biosensors : From sensitive to ultra-sensitive. *Biosens. Bioelectron.* **60**, 101–111 (2014).
 61. Buitrago, E., Fernández-Bolaños, M. & Ionescu, A. M. Vertically stacked Si nanostructures for biosensing applications. *Microelectron. Eng.* (2012) doi:10.1016/j.mee.2012.03.017.
 62. Pachauri, V. & Ingebrandt, S. Biologically sensitive field-effect transistors: From ISFETs to NanoFETs. *Essays Biochem.* (2016) doi:10.1042/EBC20150009.
 63. Taha, M. H. F., Ashraf, H. & Caesarendra, W. A brief description of cyclic voltammetry transducer-based non-enzymatic glucose biosensor using synthesized graphene electrodes. *Applied System Innovation* (2020) doi:10.3390/asi3030032.
 64. Magar, H. S., Hassan, R. Y. A. & Mulchandani, A. Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications. *Sensors* (2021) doi:10.3390/s21196578.
 65. Fogel, R., Limson, J. & Seshia, A. A. Acoustic biosensors. *Essays Biochem.* (2016) doi:10.1042/EBC20150011.
 66. Lee, J. W., Jang, D., Kim, G. T., Mouis, M. & Ghibaudo, G. Analysis of charge sensitivity and low frequency noise limitation in silicon nanowire sensors. *J. Appl. Phys.* (2010) doi:10.1063/1.3294961.
 67. Elfström, N. *et al.* Surface charge sensitivity of silicon nanowires: Size dependence. *Nano Lett.* **7**, 2608–2612 (2007).
 68. Loke, A. L. S. *et al.* Constant-Current Threshold Voltage Extraction in HSPICE for Nanoscale CMOS Analog Design. *Synopsys Users Gr.* (2010).
 69. Hierlemann, A. CMOS-based Chemical Sensors. in *CMOS-MEMS: Advanced Micro and Nanosystems* (2008). doi:10.1002/9783527616718.ch7.
 70. Go, J., Nair, P. R. & Alam, M. A. Theory of signal and noise in double-gated nanoscale electronic pH sensors. *J. Appl. Phys.* **112**, (2012).
 71. Spijkman, M. J. *et al.* Dual-gate thin-film transistors, integrated circuits and sensors. *Adv. Mater.* (2011) doi:10.1002/adma.201101493.
 72. Bae, T. E., Jang, H. J., Lee, S. W. & Cho, W. J. Enhanced sensing properties by dual-gate ion-sensitive field-effect transistor using the solution-processed Al₂O₃ sensing membranes. in *Japanese Journal of Applied Physics* (2013). doi:10.7567/JJAP.52.06GK03.
 73. Ahn, J., Choi, S., Han, J., Park, T. J. & Lee, S. Y. Double-Gate Nanowire Field Effect Transistor

Références

- for a Biosensor. 2934–2938 (2010) doi:10.1021/nl1010965.
74. Jang, H. J. & Cho, W. J. Performance enhancement of capacitive-coupling dual-gate ion-sensitive field-effect transistor in ultra-thin-body. *Sci. Rep.* (2014) doi:10.1038/srep05284.
 75. Huang, Y. J. *et al.* High performance dual-gate ISFET with non-ideal effect reduction schemes in a SOI-CMOS bioelectrical SoC. *Tech. Dig. - Int. Electron Devices Meet. IEDM 2016-Febru*, 29.2.1-29.2.4 (2015).
 76. Bergveld, P. The operation of an ISFET as an electronic device. *Sensors and Actuators* (1981) doi:10.1016/0250-6874(81)80004-2.
 77. Mu, L. *et al.* Silicon nanowire field-effect transistors - A versatile class of potentiometric nanobiosensors. *IEEE Access* **3**, 287–302 (2015).
 78. Kaisti, M., Zhang, Q. & Levon, K. Compact model and design considerations of an ion-sensitive floating gate FET. *Sensors Actuators, B Chem.* **241**, 321–326 (2017).
 79. Yates, D. E., Levine, S. & Healy, T. W. Site-binding model of the electrical double layer at the oxide/water interface. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* **70**, 1807–1818 (1974).
 80. Hazarika, C. & Sharma, S. Survey on Ion Sensitive Field Effect Transistor from the View Point of pH Sensitivity and Drift. *Indian J. Sci. Technol.* (2017) doi:10.17485/ijst/2017/v10i37/118444.
 81. Bergveld, P. Thirty years of ISFETOLOGY: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors Actuators, B Chem.* **88**, 1–20 (2003).
 82. Lowe, B. M., Sun, K., Zeimpekis, I., Skylaris, C. K. & Green, N. G. Field-effect sensors-from pH sensing to biosensing: Sensitivity enhancement using streptavidin-biotin as a model system. *Analyst* **142**, 4173–4200 (2017).
 83. Liu, N., Chen, R. & Wan, Q. Recent advances in electric-double-layer transistors for biochemical sensing applications. *Sensors (Switzerland)* (2019) doi:10.3390/s19153425.
 84. Bousse, L., Bousse, L., De Rood, N. F. & Bergveld, P. Operation of Chemically Sensitive Field-Effect Sensors As a Function of the Insulator-Electrolyte Interface. *IEEE Trans. Electron Devices* (1983) doi:10.1109/T-ED.1983.21284.
 85. Healy, T. W. & White, L. R. Ionizable surface group models of aqueous interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* (1978) doi:10.1016/0001-8686(78)85002-7.
 86. Panahi, A., Sadighbayan, D., Forouhi, S. & Ghafar-Zadeh, E. Recent advances of field-effect transistor technology for infectious diseases. *Biosensors* (2021) doi:10.3390/bios11040103.
 87. Nair, P. R. & Alam, M. A. Design considerations of silicon nanowire biosensors. *IEEE Trans. Electron Devices* **54**, 3400–3408 (2007).
 88. Sakata, T. Biologically Coupled Gate Field-Effect Transistors Meet in Vitro Diagnostics. *ACS Omega* (2019) doi:10.1021/acsomega.9b01629.
 89. Mehrotra, P. Biosensors and their applications - A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* (2016) doi:10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
 90. Noor, M. O. & Krull, U. J. Silicon nanowires as field-effect transducers for biosensor development: A review. *Anal. Chim. Acta* **825**, 1–25 (2014).
 91. Zheng, G., Patolsky, F., Cui, Y., Wang, W. U. & Lieber, C. M. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1294–1301 (2005).
 92. Baraban, L., Ibarlucea, B., Baek, E. & Cuniberti, G. Hybrid Silicon Nanowire Devices and Their Functional Diversity. *Advanced Science* (2019) doi:10.1002/advs.201900522.
 93. Akbari-Saatlu, M. *et al.* Silicon nanowires for gas sensing: A review. *Nanomaterials* (2020) doi:10.3390/nano10112215.
 94. Rani, D., Pachauri, V. & Ingebrandt, S. Silicon Nanowire Field-Effect Biosensors. in (2018). doi:10.1007/5346_2017_19.
 95. Tran, D. P., Pham, T. T. T., Wolfrum, B., Offenhäusser, A. & Thierry, B. CMOS-compatible silicon nanowire field-effect transistor biosensor: Technology development toward commercialization. *Materials* (2018) doi:10.3390/ma11050785.
 96. Ahoulou, S., Perret, E. & Nedelec, J. M. Functionalization and characterization of silicon nanowires for sensing applications: A review. *Nanomaterials* (2021) doi:10.3390/nano11040999.
 97. Feng, W. *et al.* Advantages of silicon nanowire metal-oxide-semiconductor field-effect

Références

- transistors over planar ones in noise properties. *Jpn. J. Appl. Phys.* **51**, 4–8 (2012).
98. Ambhorkar, P. *et al.* Nanowire-based biosensors: From growth to applications. *Micromachines* (2018) doi:10.3390/mi9120679.
 99. Hahm, J. I. & Lieber, C. M. Direct Ultrasensitive Electrical Detection of DNA and DNA Sequence Variations Using Nanowire Nanosensors. *Nano Lett.* (2004) doi:10.1021/nl034853b.
 100. Li, Z. *et al.* Sequence-Specific Label-Free DNA Sensors Based on Silicon Nanowires. *Nano Lett.* (2004) doi:10.1021/nl034958e.
 101. Bunimovich, Y. L. *et al.* Quantitative Real-Time Measurements of DNA Hybridization with Alkylated Nonoxidized Silicon Nanowires in Electrolyte Solution. 16323–16331 (2006).
 102. Huang, C. W. *et al.* A CMOS wireless biomolecular sensing system-on-chip based on polysilicon nanowire technology. *Lab Chip* (2013) doi:10.1039/c3lc50798j.
 103. Voitsekhivska, T., Suthau, E. & Wolter, K. J. CMOS multiplexer for portable biosensing system with integrated microfluidic interface. in *Proceedings - Electronic Components and Technology Conference* (2014). doi:10.1109/ECTC.2014.6897285.
 104. Livi, P. *et al.* Sensor system including silicon nanowire ion sensitive FET arrays and CMOS readout. *Sensors Actuators, B Chem.* **204**, 568–577 (2014).
 105. Livi, P. *et al.* Monolithic Integration of a Silicon Nanowire Field-Effect Transistors Array on a Complementary Metal-Oxide Semiconductor Chip for Biochemical Sensor Applications. *Anal. Chem.* (2015) doi:10.1021/acs.analchem.5b02604.
 106. Tran, D. P. *et al.* Toward Intraoperative Detection of Disseminated Tumor Cells in Lymph Nodes with Silicon Nanowire Field Effect Transistors. *ACS Nano* (2016) doi:10.1021/acsnano.5b07136.
 107. Sadighbayan, D., Hasanzadeh, M. & Ghafar-Zadeh, E. Biosensing based on field-effect transistors (FET): Recent progress and challenges. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (2020) doi:10.1016/j.trac.2020.116067.
 108. Tintelott, M., Pachauri, V., Ingebrandt, S. & Vu, X. T. Process variability in top-down fabrication of silicon nanowire-based biosensor arrays. *Sensors* (2021) doi:10.3390/s21155153.
 109. Zafar, S. *et al.* Silicon Nanowire Field Effect Transistor Sensors with Minimal Sensor-to-Sensor Variations and Enhanced Sensing Characteristics. *ACS Nano* (2018) doi:10.1021/acsnano.8b01339.
 110. Noor, M. O. & Krull, U. J. Silicon nanowires as field-effect transducers for biosensor development: A review. *Anal. Chim. Acta* **825**, 1–25 (2014).
 111. Gooding, J. J. & Ciampi, S. The molecular level modification of surfaces: From self-assembled monolayers to complex molecular assemblies. *Chemical Society Reviews* (2011) doi:10.1039/c0cs00139b.
 112. Nakanishi, K., Sakiyama, T. & Imamura, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2001) doi:10.1016/S1389-1723(01)80127-4.
 113. Roach, P., Farrar, D. & Perry, C. C. Surface tailoring for controlled protein adsorption: Effect of topography at the nanometer scale and chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* (2006) doi:10.1021/ja056278e.
 114. Jang, L. S. & Liu, H. J. Fabrication of protein chips based on 3-aminopropyltriethoxysilane as a monolayer. *Biomed. Microdevices* (2009) doi:10.1007/s10544-008-9239-7.
 115. Libertino, S. *et al.* XPS and AFM characterization of the enzyme glucose oxidase immobilized on SiO₂ surfaces. *Langmuir* (2008) doi:10.1021/la7029664.
 116. Metwalli, E., Haines, D., Becker, O., Conzone, S. & Pantano, C. G. Surface characterizations of mono-, di-, and tri-aminosilane treated glass substrates. *J. Colloid Interface Sci.* (2006) doi:10.1016/j.jcis.2006.03.045.
 117. Rosaz, G. *et al.* High-performance silicon nanowire field-effect transistor with silicided contacts. *Semicond. Sci. Technol.* (2011) doi:10.1088/0268-1242/26/8/085020.
 118. Plueddemann, E. P. *Silane Coupling Agents. Silane Coupling Agents* (1982). doi:10.1007/978-1-4899-0342-6.
 119. Yadav, A. R., Sriram, R., Carter, J. A. & Miller, B. L. Comparative study of solution-phase and vapor-phase deposition of aminosilanes on silicon dioxide surfaces. *Mater. Sci. Eng. C* (2014) doi:10.1016/j.msec.2013.11.017.

Références

120. Zhu, M., Lerum, M. Z. & Chen, W. How to prepare reproducible, homogeneous, and hydrolytically stable aminosilane-derived layers on silica. *Langmuir* **28**, 416–423 (2012).
121. Acres, R. G. *et al.* Molecular structure of 3-aminopropyltriethoxysilane layers formed on silanol-terminated silicon surfaces. *J. Phys. Chem. C* **116**, 6289–6297 (2012).
122. Howarter, J. A. & Youngblood, J. P. Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir* (2006) doi:10.1021/la061240g.
123. Plueddemann, E. P. *Silane Coupling Agents. Silane Coupling Agents* (1991). doi:10.1007/978-1-4899-2070-6.
124. Gauthier, S., Aimé, J. P., Bouhacina, T., Attias, A. J. & Desbat, B. Study of grafted silane molecules on silica surface with an atomic force microscope. *Langmuir* (1996) doi:10.1021/la951098b.
125. Russo, L. *et al.* Carbonate hydroxyapatite functionalization: A comparative study towards (bio)molecules fixation. *Interface Focus* (2014) doi:10.1098/rsfs.2013.0040.
126. Le Grange, J. D., Markham, J. L. & Kurkjian, C. R. Effects of Surface Hydration on the Deposition of Silane Monolayers on Silica. *Langmuir* (1993) doi:10.1021/la00031a023.
127. Han, Y., Mayer, D., Offenhäusser, A. & Ingebrandt, S. Surface activation of thin silicon oxides by wet cleaning and silanization. *Thin Solid Films* (2006) doi:10.1016/j.tsf.2005.11.048.
128. Rye, R. R. Transition Temperatures for n -Alkyltrichlorosilane Monolayers . *Langmuir* (1997) doi:10.1021/la960934u.
129. Bras, M. *et al.* Optimisation of a silicon/silicon dioxide substrate for a fluorescence DNA microarray. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 797–806 (2004).
130. Carlson, J. J., Garrison, L. P., Ramsey, S. D. & Veenstra, D. L. Epidermal growth factor receptor genomic variation in NSCLC patients receiving tyrosine kinase inhibitor therapy: A systematic review and meta-analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (2009) doi:10.1007/s00432-009-0595-3.
131. Malicka, J., Gryczynski, I., Fang, J. & Lakowicz, J. R. Fluorescence spectral properties of cyanine dye-labeled DNA oligomers on surfaces coated with silver particles. *Anal. Biochem.* (2003) doi:10.1016/S0003-2697(03)00005-8.
132. Fiorilli, S. *et al.* Vapor-phase self-assembled monolayers of aminosilane on plasma-activated silicon substrates. *J. Colloid Interface Sci.* (2008) doi:10.1016/j.jcis.2007.12.041.
133. Schrader, A. M. *et al.* Surface chemical heterogeneity modulates silica surface hydration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2018) doi:10.1073/pnas.1722263115.
134. Gao, A. *et al.* Enhanced sensing of nucleic acids with silicon nanowire field effect transistor biosensors. *Nano Lett.* (2012) doi:10.1021/nl302476h.
135. Munguía-Cortés, L. *et al.* APTES-functionalization of SBA-15 using ethanol or toluene: Textural characterization and sorption performance of carbon dioxide. *J. Mex. Chem. Soc.* (2017) doi:10.29356/jmcs.v61i4.457.
136. Volle, J. N. *et al.* Enhanced sensitivity detection of protein immobilization by fluorescent interference on oxidized silicon. *Biosens. Bioelectron.* **19**, 457–464 (2003).
137. Stambouli, V. *et al.* Development and functionalisation of Sb doped SnO₂ thin films for DNA biochip applications. *Sensors Actuators, B Chem.* **113**, 1025–1033 (2006).
138. Zammattéo, N. *et al.* Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal. Biochem.* (2000) doi:10.1006/abio.2000.4515.
139. Peterson, A. W., Heaton, R. J. & Georgiadis, R. M. The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acids Res.* (2001) doi:10.1093/nar/29.24.5163.
140. Manjakkal, L., Szwagierczak, D. & Dahiya, R. Metal oxides based electrochemical pH sensors: Current progress and future perspectives. *Progress in Materials Science* (2020) doi:10.1016/j.pmatsci.2019.100635.
141. Huang, X. *et al.* A Dual-Mode Large-Arrayed CMOS ISFET Sensor for Accurate and High-Throughput pH Sensing in Biomedical Diagnosis. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **62**, 2224–2233 (2015).
142. Stoop, R. L. *et al.* Competing surface reactions limiting the performance of ion-sensitive field-effect transistors. *Sensors Actuators, B Chem.* **220**, 500–507 (2015).
143. Knopfmacher, O. *et al.* Nernst limit in dual-gated Si-nanowire FET sensors. *Nano Lett.* **10**, 2268–2274 (2010).
144. Zafar, S. *et al.* Optimization of pH sensing using silicon nanowire field effect transistors with

Références

- HfO₂ as the sensing surface. *Nanotechnology* (2011) doi:10.1088/0957-4484/22/40/405501.
145. Go, J., Nair, P. R. & Alam, M. A. Theory of signal and noise in double-gated nanoscale electronic pH sensors. *J. Appl. Phys.* (2012) doi:10.1063/1.4737604.
146. Gupta, M. *et al.* Size Independent pH Sensitivity for Ion Sensitive FinFETs Down to 10 nm Width. *IEEE Sens. J.* (2019) doi:10.1109/JSEN.2019.2912503.
147. Bedner, K. *et al.* PH Response of Silicon Nano wire Sensors: Impact of Nano wire Width and Gate Oxide. *Sensors Mater.* **25**, 567–576 (2013).
148. Zhou, K., Zhao, Z., Pan, L. & Wang, Z. Silicon nanowire pH sensors fabricated with CMOS compatible sidewall mask technology. *Sensors Actuators, B Chem.* (2019) doi:10.1016/j.snb.2018.09.114.
149. Gasparyan, F., Zadorozhnyi, I., Khondkaryan, H., Arakelyan, A. & Vitusevich, S. Photoconductivity, pH Sensitivity, Noise, and Channel Length Effects in Si Nanowire FET Sensors. *Nanoscale Res. Lett.* (2018) doi:10.1186/s11671-018-2494-5.
150. Sohbaty, M. & Toumazou, C. Dimension and shape effects on the ISFET performance. *IEEE Sens. J.* **15**, 1670–1679 (2015).
151. Lee, I. K., Jeun, M., Jang, H. J., Cho, W. J. & Lee, K. H. A self-amplified transistor immunosensor under dual gate operation: Highly sensitive detection of hepatitis B surface antigen. *Nanoscale* (2015) doi:10.1039/c5nr03146j.
152. Duarte-Guevara, C. *et al.* Enhanced biosensing resolution with foundry fabricated individually addressable dual-gated ISFETs. *Anal. Chem.* **86**, 8359–8367 (2014).
153. Park, J. K., Jang, H. J., Park, J. T. & Cho, W. J. SOI dual-gate ISFET with variable oxide capacitance and channel thickness. *Solid. State. Electron.* **97**, 2–7 (2014).
154. Lim, C. M. *et al.* Improved sensing characteristics of dual-gate transistor sensor using silicon nanowire arrays defined by nanoimprint lithography. *Sci. Technol. Adv. Mater.* (2017) doi:10.1080/14686996.2016.1253409.
155. Wei, F., Lillehoj, P. B. & Ho, C. M. DNA diagnostics: Nanotechnology-enhanced electrochemical detection of nucleic acids. *Pediatric Research* (2010) doi:10.1203/PDR.0b013e3181d361c3.
156. Suzanne Clancy. Genetic Mutation | Learn Science at Scitable. (2008).
157. Lockhart, D. J. & Winzeler, E. A. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* (2000) doi:10.1038/35015701.
158. Mahdih, N. & Rabbani, B. An overview of mutation detection methods in genetic disorders. *Iranian Journal of Pediatrics* (2013).
159. Costain, G., Cohn, R. D., Scherer, S. W. & Marshall, C. R. Genome sequencing as a diagnostic test. *Can. Med. Assoc. J.* (2021) doi:10.1503/cmaj.210549.
160. Nazir, I., Zaid Mahmood, H. & E Mustafa, S. Polymerase chain reaction: a creative review. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.* (2020) doi:10.15406/jabb.2020.07.00228.
161. Deisingh, A. K., Guiseppi-Wilson, A. & Guiseppi-Elie, A. Biochip Platforms for DNA Diagnostics. in *Microarrays* (2009). doi:10.1007/978-0-387-72719-6_14.
162. Junhui, Z., Hong, C. & Ruifu, Y. DNA based biosensors. *Biotechnology Advances* (1997) doi:10.1016/S0734-9750(97)00003-7.
163. V, K. DNA Biosensors-A Review. *J. Bioeng. Biomed. Sci.* (2017) doi:10.4172/2155-9538.1000222.
164. Cheah, B. C. & Cumming, D. R. S. Metabolomics on CMOS for personalised medicine. in *CMOS Circuits for Biological Sensing and Processing* (2017). doi:10.1007/978-3-319-67723-1_2.
165. Jayakumar, G. *et al.* Wafer-scale HfO₂ encapsulated silicon nanowire field effect transistor for efficient label-free DNA hybridization detection in dry environment. *Nanotechnology* (2019) doi:10.1088/1361-6528/aaffa5.
166. Chang, C. F. & Lu, M. S. C. CMOS Ion Sensitive Field Effect Transistors for Highly Sensitive Detection of DNA Hybridization. *IEEE Sens. J.* (2020) doi:10.1109/JSEN.2020.2986461.
167. Huang, Y. J. *et al.* A CMOS cantilever-based label-free DNA SoC with improved sensitivity for hepatitis B virus detection. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* (2013) doi:10.1109/TBCAS.2013.2247761.
168. Haring, A. P., Cesewski, E. & Johnson, B. N. Piezoelectric cantilever biosensors for label-free, real-time detection of DNA and RNA. in *Methods in Molecular Biology* (2017).

Références

- doi:10.1007/978-1-4939-6911-1_17.
169. Drummond, T. G., Hill, M. G. & Barton, J. K. Electrochemical DNA sensors. *Nature Biotechnology* (2003) doi:10.1038/nbt873.
 170. Blair, E. O. & Corrigan, D. K. A review of microfabricated electrochemical biosensors for DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics* (2019) doi:10.1016/j.bios.2019.03.055.
 171. Jang, B., Cao, P., Chevalier, A., Ellington, A. & Hassibi, A. A CMOS fluorescent-based biosensor microarray. in *Digest of Technical Papers - IEEE International Solid-State Circuits Conference* (2009). doi:10.1109/ISSCC.2009.4977495.
 172. Loyez, M., DeRosa, M. C., Caucheteur, C. & Wattiez, R. Overview and emerging trends in optical fiber aptasensing. *Biosensors and Bioelectronics* (2022) doi:10.1016/j.bios.2021.113694.
 173. Wang, Y.-M., Pang, X.-F. & Zhang, Y.-Y. Recent advances in fiber-optic DNA biosensors. *J. Biomed. Sci. Eng.* (2009) doi:10.4236/jbise.2009.25046.
 174. Sang, S. *et al.* Progress of new label-free techniques for biosensors: A review. *Critical Reviews in Biotechnology* (2016) doi:10.3109/07388551.2014.991270.
 175. Syu, Y.-C., Hsu, W.-E. & Lin, C.-T. Review—Field-Effect Transistor Biosensing: Devices and Clinical Applications. *ECS J. Solid State Sci. Technol.* (2018) doi:10.1149/2.0291807jss.
 176. Adzhri, R. *et al.* High-performance integrated field-effect transistor-based sensors. *Anal. Chim. Acta* **917**, 1–18 (2016).
 177. Ahmad, R., Mahmoudi, T., Ahn, M. S. & Hahn, Y. B. Recent advances in nanowires-based field-effect transistors for biological sensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **100**, 312–325 (2018).
 178. Mitra, S. & Cumming, D. R. S. *CMOS circuits for biological sensing and processing. CMOS Circuits for Biological Sensing and Processing* (2017). doi:10.1007/978-3-319-67723-1.
 179. Cui, Y. *et al.* Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science* **293**, 1289–92 (2001).
 180. Patolsky, F., Zheng, G. & Lieber, C. M. Fabrication of silicon nanowire devices for ultrasensitive, label-free, real-time detection of biological and chemical species. *Nat. Protoc.* (2006) doi:10.1038/nprot.2006.227.
 181. Xuan, C. T., Thuy, N. T., Luyen, T. T., Huyen, T. T. T. & Tuan, M. A. Carbon Nanotube Field-Effect Transistor for DNA Sensing. *J. Electron. Mater.* (2017) doi:10.1007/s11664-016-5238-2.
 182. Sarkar, D. *et al.* MoS₂ field-effect transistor for next-generation label-free biosensors. *ACS Nano* (2014) doi:10.1021/nn5009148.
 183. Chan, C. Y., Yan, F. & Yang, M. Chemical vapor deposition grown graphene DNA field-effect transistor biosensor with gold nanoparticles signal amplification. in *Proceedings of the IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)* (2016). doi:10.1109/MEMSYS.2016.7421617.
 184. Campos, R. *et al.* Attomolar label-free detection of dna hybridization with electrolyte-gated graphene field-effect transistors. *ACS Sensors* (2019) doi:10.1021/acssensors.8b00344.
 185. Seo, G. *et al.* Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. *ACS Nano* (2020) doi:10.1021/acsnano.0c02823.
 186. Ryu, S. W. *et al.* Gold nanoparticle embedded silicon nanowire biosensor for applications of label-free DNA detection. *Biosens. Bioelectron.* (2010) doi:10.1016/j.bios.2010.02.010.
 187. Veeralingam, S. & Badhulika, S. Surface functionalized β -Bi₂O₃ nanofibers based flexible, field-effect transistor-biosensor (BioFET) for rapid, label-free detection of serotonin in biological fluids. *Sensors Actuators, B Chem.* (2020) doi:10.1016/j.snb.2020.128540.
 188. Shen, M. Y., Li, B. R. & Li, Y. K. Silicon nanowire field-effect-transistor based biosensors: From sensitive to ultra-sensitive. *Biosens. Bioelectron.* **60**, 101–111 (2014).
 189. Rollo, S., Rani, D., Olthuis, W. & Pascual García, C. High performance Fin-FET electrochemical sensor with high-k dielectric materials. *Sensors Actuators, B Chem.* (2020) doi:10.1016/j.snb.2019.127215.
 190. Zhang, G. J. *et al.* Multiplexed detection of cardiac biomarkers in serum with nanowire arrays using readout ASIC. *Biosens. Bioelectron.* **35**, 218–223 (2012).
 191. Lu, N. *et al.* Ultrasensitive Detection of Dual Cancer Biomarkers with Integrated CMOS-Compatible Nanowire Arrays. *Anal. Chem.* **87**, 11203–11208 (2015).
 192. Gao, A. *et al.* Multiplexed detection of lung cancer biomarkers in patients serum with CMOS-

Références

- compatible silicon nanowire arrays. *Biosens. Bioelectron.* (2017) doi:10.1016/j.bios.2016.12.072.
193. Wang, J., Ren, Y. & Zhang, B. Application of Microfluidics in Biosensors. in *Advances in Microfluidic Technologies for Energy and Environmental Applications* (2020). doi:10.5772/intechopen.91929.
194. Turner, A. P. F. Biosensors: Sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.* (2013) doi:10.1039/c3cs35528d.
195. Cho, E. J., Lee, J. W. & Ellington, A. D. Applications of aptamers as sensors. *Annu. Rev. Anal. Chem.* (2009) doi:10.1146/annurev.anchem.1.031207.112851.
196. Iliuk, A. B., Hu, L. & Tao, W. A. Aptamer in bioanalytical applications. *Analytical Chemistry* (2011) doi:10.1021/ac201057w.
197. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering* (2007) doi:10.1016/j.bioeng.2007.06.001.
198. Deng, B. *et al.* Aptamer binding assays for proteins: The thrombin example-A review. *Analytica Chimica Acta* (2014) doi:10.1016/j.aca.2014.04.055.
199. Lin, P. H. *et al.* Studies of the binding mechanism between aptamers and thrombin by circular dichroism, surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2011) doi:10.1016/j.colsurfb.2011.07.032.
200. Tasset, D. M., Kubik, M. F. & Steiner, W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J. Mol. Biol.* (1997) doi:10.1006/jmbi.1997.1275.
201. Lee, J. O. *et al.* Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* (2008) doi:10.1007/s00216-007-1643-y.
202. Pasternak, A., Hernandez, F. J., Rasmussen, L. M., Vester, B. & Wengel, J. Improved thrombin binding aptamer by incorporation of a single unlocked nucleic acid monomer. *Nucleic Acids Res.* (2011) doi:10.1093/nar/gkq823.
203. O. Tucker, W., T. Shum, K. & A. Tanner, J. G-quadruplex DNA Aptamers and their Ligands: Structure, Function and Application. *Curr. Pharm. Des.* (2012) doi:10.2174/138161212799958477.
204. Rangnekar, A., Nash, J. A., Goodfred, B., Yingling, Y. G. & LaBean, T. H. Design of potent and controllable anticoagulants using DNA aptamers and nanostructures. *Molecules* (2016) doi:10.3390/molecules21020202.
205. Crawley, J. T. B., Zanardelli, S., Chion, C. K. N. K. & Lane, D. A. The central role of thrombin in hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (2007) doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02500.x.
206. Hasegawa, H., Taira, K. I., Sode, K. & Ikebukuro, K. Improvement of aptamer affinity by dimerization. *Sensors* (2008) doi:10.3390/s8021090.
207. Oger, E. Incidence of venous thromboembolism: A community-based study in western France. *Thromb. Haemost.* (2000) doi:10.1055/s-0037-1613887.
208. Adams, M. Assessment of thrombin generation: Useful or hype? *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* (2009) doi:10.1055/s-0029-1214153.
209. Kim, K. S., Lee, H. S., Yang, J. A., Jo, M. H. & Hahn, S. K. The fabrication, characterization and application of aptamer-functionalized Si-nanowire FET biosensors. *Nanotechnology* (2009) doi:10.1088/0957-4484/20/23/235501.
210. Hammock, M. L., Knopfmacher, O., Naab, B. D., Tok, J. B. H. & Bao, Z. Investigation of protein detection parameters using nanofunctionalized organic field-effect transistors. *ACS Nano* (2013) doi:10.1021/nn305903q.
211. Ibarlucea, B. *et al.* Gating hysteresis as an indicator for silicon nanowire FET biosensors. *Appl. Sci.* (2018) doi:10.3390/app8060950.
212. Khan, N. I., Mousazadehkasim, M., Ghosh, S., Tsavalas, J. G. & Song, E. An integrated microfluidic platform for selective and real-time detection of thrombin biomarkers using a graphene FET. *Analyst* (2020) doi:10.1039/d0an00251h.
213. Macaya, R. F., Schultze, P., Smith, F. W., Roe, J. A. & Feigon, J. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1993) doi:10.1073/pnas.90.8.3745.

Références

214. Stern, E. *et al.* Importance of the debye screening length on nanowire field effect transistor sensors. *Nano Lett.* **7**, 3405–3409 (2007).
215. Gosai, A., Hau Yeah, B. S., Nilsen-Hamilton, M. & Shrotriya, P. Label free thrombin detection in presence of high concentration of albumin using an aptamer-functionalized nanoporous membrane. *Biosens. Bioelectron.* (2019) doi:10.1016/j.bios.2018.10.010.
216. Sobic, A., Meneghello, A., Cretaio, E. & Gatto, B. Human thrombin detection through a sandwich aptamer microarray: Interaction analysis in solution and in solid phase. *Sensors* (2011) doi:10.3390/s1111009426.
217. Meneghello, A., Sobic, A., Antognoli, A., Cretaio, E. & Gatto, B. Development and Optimization of a Thrombin Sandwich Aptamer Microarray. *Microarrays* (2012) doi:10.3390/microarrays1020095.

Publications

Optimum functionalization of Si nanowire FET for electrical detection of DNA hybridization.

R. Midahuen, B. Previtali, C. Fontelaye, G. Nonglaton, V. Stambouli, and S. Barraud.

IEEE JEDS, 2022 (10.1109/JEDS.2022.3166683)

Double-Gate Si Nanowire FET Sensor Arrays for Label-Free C-Reactive Protein detection enabled by antibodies fragments and pseudo-super-Nernstian back-gate operation.

L. Capua, Y. Sprunger, H. Elettro, A. Grammoustianou, **R. Midahuen**, T. Ernst, S. Barraud, R. Gill, A.M. Ionescu.

IEDM, 2021 (10.1109/IEDM19574.2021.9720670)

8. Conférences

51st IEEE Semiconductor Interface Specialists Conference, December 16–18, 2020

Fabrication of Biologically Sensitive Si Nanowire Field-Effect-Transistors applied to

Electrical Label-Free DNA Hybridization Detection. **R. Midahuen**, T. Magis, V. Mathieu, F.

Laulagnet, J.A. Dallery, B. Previtali, V. Stambouli and S. Barraud.

IEEE 51st European Solid-State Device Research Conference, September 14–16–17, 2021

Wafer-Scale Fabrication of Biologically Sensitive Si Nanowire FET: From pH Sensing to

Electrical Detection of DNA Hybridization. **R. Midahuen**, B. Previtali, C. Fontelaye, G.

Nonglaton, V. Stambouli-Sene, S. Barraud.