HAL
open science

Couches moléculaires sur silicium pour la détection sélective de protéines

Emmanuel Perez

To cite this version:

Emmanuel Perez. Couches moléculaires sur silicium pour la détection sélective de protéines. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Ecole Polytechnique X, 2011. Français. NNT : . pastel-00675150

HAL Id: pastel-00675150

https://pastel.hal.science/pastel-00675150

Submitted on 29 Feb 2012

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 présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE POLYTECHNIQUE

Spécialité : Sciences des matériaux

Par

Emmanuel PEREZ

Sujet

Couches moléculaires sur silicium pour la détection sélective de protéines

Soutenue le 25/11/2011 devant le jury composé de :

Thierry LIVACHE	Président
Rabah BOUKHERROUB	Rapporteur
Benoit LIMOGES	Rapporteur
Yannick MOREL	Examinateur
François OZANAM	Directeur de thèse
Anne Chantal GOUGET-LAEMMEL	Co-directrice de thèse

Table des matières

1 Monocouche Organique pour limiter l'adsorption non spécifique : H(EG)$_n$OMe **13**

1.1 Introduction 13

1.2 Surfaces Hydrogénées 13

1.2.1 Choix du substrat 13

1.2.2 Hydrogénation de surface 15

1.2.3 Protocole Expérimental 17

1.2.4 Caractérisation des surfaces hydrogénées 17

1.3 Surfaces décylées et H(EG)$_n$OMe 19

1.3.1 Greffage Chimique 19

1.3.2 Protocole Expérimental 21

1.3.3 Caractérisation des surfaces 21

1.3.4 Détermination de la concentration en espèces greffées 25

1.3.5 Test d'adsorption non spécifique 30

1.3.6 Stabilité de la monocouche 35

1.4 Conclusion 36

2 Synthèse des précurseurs **39**

2.1 Introduction 39

2.2 Couplage alcène-poly(éthylène glycol) : C$_p$(EG)$_6$OH 39

2.2.1 Protocole Expérimental 40

2.2.2 Caractérisation RMN 40

2.3 Méthylation de l'alcool : C$_p$(EG)$_6$OMe 41

2.3.1 Protocole Expérimental 41

2.3.2 Caractérisation 42

2.4 Augmentation de la longueur de la chaîne éthylène glycol : C$_p$(EG)$_{12}$OMe 45

2.4.1 Protocole Expérimental 45

2.4.2 Caractérisation 47

2.5 Synthèse à partir des précurseurs commerciaux 47

2.5.1 Protocole Expérimental 48

2.5.2 Caractérisation 48

2.6 Conclusion 50

3 Greffage de chaînes alkyles/PEG sur silicium **51**

3.1 Introduction 51

3.2 Protocole initial 52

3.3 Détermination du solvant 53
3.4 Optimisation du rinçage 55
3.5 Protocole retenu 59
3.6 Caractérisation infrarouge 60
3.7 Stabilité au vieillissement 65
3.8 Conclusion 65

4 Etude de la capacité des surfaces $C_p(EG)_nOMe$ à limiter l'adsorption non spécifique de protéines 67
4.1 Introduction 67
4.2 Comparaison de l'efficacité des différentes surfaces 68
4.2.1 Protocole expérimental 68
4.2.2 Caractérisation par angle de contact 68
4.2.3 Caractérisation par spectroscopie infrarouge 69
4.2.4 Caractérisation par microscopie à force atomique 72
4.3 Influence du rinçage 74
4.3.1 Effet du rinçage de la surface après greffage 74
4.3.2 Rinçage des protéines adsorbées 76
4.4 Ouverture à d'autres protéines 80
4.4.1 Choix des protéines 80
4.4.2 Détection de fluorescence 80
4.4.3 Mode Opératoire 82
4.4.4 Caractérisation des lames 85
4.5 Conclusion 92

5 Immobilisation des sondes 93
5.1 Introduction 93
5.2 Surfaces Mixtes : acide-PEG 94
5.2.1 Greffage Acide 94
5.2.2 Greffage mixte $C_{10}H_{19}COOH$ - PEG 550 96
5.3 Synthèse de $C_p(EG)_nCOOH$: Oxydation de Jones 104
5.3.1 Protocole expérimental 104
5.3.2 Caractérisation RMN 105
5.4 Surfaces $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$ 105
5.4.1 Protocole expérimental 106
5.4.2 Optimisation du rinçage 106
5.4.3 Caractérisation infrarouge 107
5.5 Activation 109
5.6 Amidation 110
5.7 Test d'adsorption non spécifique 112
5.8 Conclusion 113

6 Optimisation des sondes 115
6.1 Optimisation du protocole d'immobilisation et de reconnaissance sur des lames commerciales 116
6.1.1 Optimisation de la réaction d'amidation 117

6.1.2 Effet de la proximité de l'aptamère à la surface. 120
6.2 Protocole d'obtention d'une puce à protéine 121
6.2.1 Dépôt du réflecteur 122
6.2.2 Dépôt du silicium amorphe 122
6.2.3 Greffage et rinçage de la couche moléculaire et activation des acides 123
6.2.4 Dépôt par spotting des sondes 123
6.2.5 Blocage des sites activés 123
6.2.6 Reconnaissance de thrombine 124
6.2.7 Evaluation du tampon de spotting 126
6.2.8 Effet du rinçage de la lame 127
6.2.9 Augmentation de la densité de poly(éthylène glycol) en surface 129
6.2.10 Nouvelle stratégie 130
6.3 Conclusion 134

A Techniques utilisées pour la synthèse des précurseurs et leur caractérisation 139
A.1 Chromatographie sur couche mince : CCM 139
A.2 Traitement post réactionnel 140
A.2.1 Extraction liquide-liquide 140
A.2.2 Séchage sur sulfate de magnésium 141
A.2.3 Evaporation du solvant 141
A.3 Chromatographie sur colonne 142
A.4 Purification de solvants 142
A.5 Spectroscopie RMN 143

B Microscopie à Force Atomique 145

C Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) en mode ATR (Attenuated Total Reflection) 149

D Mesure d'angles de contact 151

E Mesure de fluorescence 153

Introduction

Depuis plus de 20 ans, la détection rapide et sensible de molécules biologiques s'est développée de façon considérable grâce à l'apparition des biopuces. Ces outils d'analyse, utilisés essentiellement pour la recherche médicale et pharmaceutique, ont pour objet d'identifier un grand nombre de gènes ou de protéines et d'étudier leurs fonctions [1–3]. Parmi les biopuces les plus importantes, on peut citer les puces à ADN [3–7] et les puces à protéines [3; 8; 9]. Malgré le succès des puces à ADN dans la détection de l'expression des gènes et de leurs possibles mutations, l'activité des protéines encodées, qui est la manifestation directe du fonction cellulaire, demeure l'application la plus intéressante [10].

L'utilisation de puces à protéines présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes traditionnelles de détection et d'études d'interactions des protéines. Elles ne requièrent qu'une faible quantité de produit et ont un fort potentiel de miniaturisation. Ainsi les puces à protéines peuvent être un outil puissant pour analyser le fonctionnement cellulaire ainsi que pour de nombreuses autres applications dans les domaines médicaux (diagnostique) et de biosécurité [11; 12]. De la même manière que les puces à ADN, les puces à protéines ont le potentiel de permettre la détection simple, rapide et multiplexe de milliers de biomolécules en une seule expérience. Le passage de l'ADN aux protéines nécessite cependant le développement de méthodes d'immobilisation propres aux protéines pour garantir le maintien de leur structure et de leur activité biologique après immobilisation.

Traditionnellement, l'immobilisation des protéines sur les substrats solides est basée sur leur rétention non spécifique par des forces électrostatiques [13–18] ou la formation de liaisons covalentes entre la surface et les groupements chimiques présents au sein des protéines [14; 19; 20]. Ces méthodes nécessitent la modification de la surface du substrat. Comme pour les puces à ADN, la lame de verre est le substrat le plus répandu [15–18; 21; 22], car inerte et mécaniquement stable, et différents travaux ont été consacrésà la modification de surface du verre, notamment en vue de la formation de monocouches réactives sur verre [21–23]. En général, les couches sont obtenues à partir de précurseurs contenant une groupe fonctionnel réagissant avec les groupements hydroxyles de la surface du verre et un groupement, qui peut soit réagir directement avec les amines primaires présentes dans le protéines (groupement aldéhyde ou époxy) ou peut être modifié afin d'augmenter la spécificité de l'immobilisation [24; 25]. Les surfaces d'or sont aussi très largement utilisées [26; 27] et sont fonctionnalisées par l'intermédiaire de thiols.

Cependant, cette immobilisation directe entraîne en général une orientation aléa-

toire des protéines immobilisées et occasionne dans certains cas une modification de leur structure tridimensionnelle pouvant fortement diminuer leur activité biologique (dénaturation) [28]. Afin de palier ces problèmes, plusieurs méthodes d'immobilisation de protéines par l'intermédiaire d'un site spécifique ont été développées. Ces méthodes se basent sur le marquage de ce site avec une molécule ayant une affinité particulière avec des groupements greffées sur le substrat. Les couples de marqueurs les plus couramment utilisées incluent la biotine/avidine [29–31], le Histidine/Ni^{2+}-acide nitriloacétique [22; 32; 33] et la glutathione-S-transferase (GST)/glutathione (GSH) [34; 35]. L'immobilisation d'anticorps par interaction de leur fragment invariant (Fc) avec des surfaces recouvertes de protéines A ou G a aussi été utilisé pour la fabrication des puces à anticorps [36; 37]. Plus récemment, des conjugués protéines-ADN ont aussi permis l'immobilisation de protéines par hybridation sur des substrats présentant les brins d'ADN complémentaires [38; 39]. L'utilisation de ces méthodes d'immobilisation orientée et contrôlée des protéines amène une plus grande probabilité du maintien de leur structure et de leur activité biologique. Une autre méthode développée afin d'éviter la dénaturation est l'utilisation de substrats à trois dimensions (surfaces recouvertes d'hydrogel ou de nitrocellulose) [40; 41]. Ces matrices poreuses piègent les protéines de façon non covalente dans un milieu hydraté, assurant le maintien de leur structure tridimensionnelle et favorisant leur accessibilité. Ces surfaces poreuses permettent aussi de retenir un grand nombre de sondes, mais ne peuvent assurer leur bonne orientation entraînant une activité réduite avec les cibles. De plus, elles présentent en général un bruit de fond important dû à l'adsorption non spécifique d'autres protéines présentes dans le milieu à analyser.

L'une des stratégies les plus utilisées pour l'identification de protéines est l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques aux cibles que l'on cherche à détecter. Les anticorps sont bien adaptés pour cette tâche car une grande variété d'anticorps spécifiques sont disponibles commercialement et de nombreuses études ont décrit leur immobilisation sur différents substrats [42–46].

Afin de pouvoir identifier et quantifier les protéines capturées par la puce, il est nécessaire d'utiliser des méthodes de détection qui possèdent une bonne résolution, un rapport signal sur bruit important, et qui soient capables de donner des résultats reproductibles sur une large gamme de concentration. La détection par fluorescence est probablement la plus utilisée pour les puces à protéines. Ceci est dû à sa simplicité et à sa grande sensibilité. Afin d'utiliser cette méthode de détection, d'une façon similaire aux tests ELISA sandwich, les puces à anticorps utilisent souvent un second anticorps, fluorescent, dirigé vers un autre site spécifique de la protéines à détecter. Si une protéine cible a été capturée par interaction avec une sonde à la surface, sa présence est révélée par le second anticorps qui vient à son tour se fixer sur la protéine. Cette approche a été, par exemple, utilisée pour l'étude de protéines du sérum afin d'identifier des nouveaux marqueurs biologiques du cancer de la prostate [47]. Cependant cette méthode nécessite l'utilisation simultanée d'un grand nombre d'anticorps fluorescents, ce qui peut augmenter le bruit de fond, mais aussi augmente le risque de réactivité croisée. Une méthode utilisée pour palier ce problème est de marquer directement les protéines de l'échantillon biologique à analyser [48]. Cette stratégie a

permis la découverte de biomarqueurs moléculaires pour différents types de cancers [49–51]. Cependant, il est important de noter que le marquage des protéines entraîne des modifications de leur surface et peut donc altérer leur reconnaissance par les anticorps et engendrer des faux signaux. De plus, pour être efficace, cette approche nécessite le marquage homogène des protéines sur différents échantillons, ce qui est difficile d'obtenir avec certitude.

Ces contraintes ont entraîné le développement de techniques de détection alternatives n'utilisant pas de marqueurs, mais se basant sur la spectrométrie de masse (MS) et la résonance de plasmons de surface (SPR) [52; 53]. Cette dernière, basée sur la mesure du changement de l'angle de réflexion de la lumière sur une surface d'or ou d'argent, est particulièrement utilisée car elle peut permettre d'obtenir en temps réel des informations sur la cinétique de la capture des protéines. Alors que les systèmes conventionnels de SPR ne pouvaient initialement être utilisé pour mesurer qu'une unique interaction, le développement récent de la microscopie SPR a permis l'analyse de centaines d'interactions simultanées [54].

Beaucoup d'efforts ont donc été entrepris pour obtenir des puces à protéines performantes. Cependant, de nombreuses limitations demeurent :

- dans la chimie d'immobilisation des sondes. La plupart des études ont été réalisées sur des surfaces de verre [15; 16; 21; 22] ou d'or [26; 27]. Les techniques de fonctionnalisation de ces substrats souffrent de limitations sérieuses pour optimiser les propriétés physico-chimiques des couches fonctionnalisées vis-à-vis de l'immobilisation des sondes, pouvant entraîner une mauvaise orientation et même une dénaturation des sondes.
- à cause de l'adsorption non spécifique d'autres protéines sur la biopuce [55]. En effet, les protéines sont des molécules à la chimie complexe de plusieurs dizaines voire centaines de kDa et ont tendance à s'adsorber sur la plupart des surfaces. Dans le cas de puces à protéines, ces adsorptions non spécifiques sont à l'origine d'importants bruits limitant la sensibilité de la puce.

La fonctionnalisation de surfaces de silicium par greffage d'espèces organiques a fait l'objet des revues récentes [56; 57]. La possibilité d'étendre ces greffages au silicium amorphe est démontrée depuis plusieurs années [58; 59], et son intérêt pour la biofonctionnalisation de surfaces est reconnu [60]. Une technique d'accrochage covalent de brins d'ADN sondes sur silicium a été récemment développée au laboratoire [61; 62]. Dans notre cas, la chimie de surface est basée sur le greffage covalent d'acides carboxyliques par hydrosilylation sur une surface hydrogénée de silicium amorphe [63], entraînant la formation en surface de liaisons Si-C très robustes. Ces acides carboxyliques sont ensuite activés pour réagir avec des oligonucléotides terminés par des amines. Le silicium amorphe est déposé sur un réflecteur et la combinaison du gain optique du réflecteur et de la chimie contrôlée sur silicium a permis un gain de fluorescence d'un facteur 100 pour la détection d'ADN [64] (détection atteignant la gamme du femtomolaire). L'extension de ces protocoles à la mise au point de puces à protéines sur silicium de grande sensibilité serait donc particulièrement intéressante.

L'adsorption non spécifique de protéines est un problème intimement associé à la composition de la surface de la puce à protéine. De nombreuses études ont cher-

ché à identifier les couches moléculaires minimisant l'adhésion des protéines [65]. Ainsi, l'adsorption de protéines a pu être réduite par l'utilisation de polyglycérols dendritiques [66], de surfaces zwitterioniques à base de phosphorycholine [67–69], de couches alkyles possédant des groupements mannitol [70], et même de surfaces fonctionnalisées par des peptides [71]. Cependant, l'une des méthodes les plus intéressantes pour obtenir des surfaces biorésistantes est la préparation de couches de poly(éthylène glycol) (PEG) [72; 73]. Depuis leur première fabrication par Prime et Whitesides [74], les couches moléculaires de PEG ont été largement étudiées sur différentes surfaces (or [74–79], argent [80; 81], surface SiO_2 [82–84] et silicium [85–88]). Afin d'expliquer le caractère biorésistant des surfaces greffées avec des poly(éthylène glycol), Andrade et De Gennes ont modélisé ces couches en utilisant des concepts de stabilisation de colloïdes [89; 90]. Ils ont considéré la gêne stérique, les attractions de Van de Waals et les énergies libres d'interactions hydrophobes, mais leur modèle n'est valable que pour les longues chaînes éthylène glycol et ne rend pas compte de la biorésistance constatée avec des chaînes plus courtes. Ce modèle a été amélioré par Szleifer et al. qui, en utilisant une théorie de champ moyen auto-cohérent (SCMF), a permis de comprendre la relative inertie de couches denses de poly(éthylène glycol) plus courts (à partir de n=6) [91]. Bien que les deux modèles offrent quelques éléments de réponses sur le mécanisme de résistance à l'adsorption de protéines, ils n'apportent pas une explication de la biorésistance au niveau moléculaire [72].

La biorésistance des chaînes courtes d'éthylène glycol était expliquée à partir des différences observées entre les surfaces obtenues sur or et argent [80; 92]. Des couches moléculaires tri- et hexa(éthylène glycol) sur or sont totalement biorésistantes, tandis que les mêmes couches sur argent ne limitent que partiellement l'adsorption des protéines. Ces constatations furent reliées à la différence de densité de molécules greffées sur ces deux substrats : à cause de la plus grande densité d'atomes d'argent en surface, les molécules de PEG seraient plus densément greffées sur argent que sur or. Les chaînes greffées sur argent adopteraient alors une configuration all-trans plus compacte, tandis que sur or, la couche est plus désordonnée et la configuration hélicoïdale des PEG est présente. Cette dernière possède un fort champ dipolaire [93] ce qui permettrait à des molécules d'eau de pénétrer la couche, chose qui n'est pas possible dans des couches denses d'éthylène glycol, comme il a été montré par des simulations Monte Carlo [92; 94; 95]. Des études plus récentes, par Zheng et al. [96; 97] ont montré que cette couche d'eau était responsable de la force de répulsion ("hydration force") et qu'elle n'était présente que si la densité de PEG n'était ni trop faible ni trop importante. Ils ont ainsi montré qu'une plus grande densité de greffage, obtenue par l'ajout d'eau dans leur solvant (éthanol), engendrait des couches permettant l'adsorption de protéines et en ont déduit que la flexibilité de la chaîne PEG jouait un rôle important pour assurer la caractère biorésistant de la surface. Grunze et al. [81], qui ont aussi montré la présence de la configuration hélicoïdale (dans une organisation très orientée et cristalline ne permettant pas d'empêcher l'adsorption non spécifique des protéines) des PEG dans des couches greffées sur argent, ont aussi établi une relation entre la densité de la couche greffée et sa biorésistance. La limite maximale qu'ils ont déduite est d'environ 3.85 molécules.nm^{-2}, qui est supérieure à

la densité constatée sur or mais inférieure à celle obtenue sur argent. Il semblerait donc que la biorésistance d'une couche de poly(éthylène glycol) à chaîne courte soit liée à la stabilité d'une couche d'eau interfaciale, qui est elle même dépendante de la densité de la couche greffée.

L'objectif de l'étude présentée ici est de combiner la chimie robuste et contrôlée réalisable sur silicium aux propriétés de biorésistance des poly(éthylène glycol) afin d'obtenir des puces à protéines de grande sensibilité. Toutefois, pour atteindre ce but, il ne suffit pas d'immobiliser des protéines sondes par des liaisons covalentes au sommet d'une couche moléculaire présentant une bonne résistance à l'adsorption non spécifique des protéines. Il faut aussi que ces sondes soient actives et accessibles, c'est à dire non dénaturées et orientées de manière à présenter vers la solution le site permettant la reconnaissance spécifique des cibles. Afin de nous assurer l'orientation des sondes et que leur immobilisation n'engendre pas leur dénaturation, nous avons choisi de lier les sondes à la surface par l'intermédiaire d'aptamères. Un aptamère est une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) à simple brin qui peut se replier en une structure tridimensionnelle complexe ayant une affinité particulière avec une cible moléculaire, comme une protéine ou une partie de protéine dans le cas qui nous intéresse [98–101], tout en maintenant la structure tridimensionnelle de cette cible. Ainsi, l'aptamère de la partie invariante des anticorps IgG de lapin [102] peut permettre d'immobiliser dans la bonne orientation une large gamme d'anticorps pouvant identifier des centaines de toxines. Dans le cas de notre étude, un objectif supplémentaire est donc d'utiliser des aptamères comme agent de couplage des sondes à la surface.

Les quatre premiers chapitres de ce mémoire sont consacrés à la synthèse et à la fonctionnalisation de surfaces hydrogénées de silicium monocristallin d'orientation (111) par des molécules de poly(éthylène glycol) de longueur variable et à la caractérisation de ces couches, en particulier leur densité, stabilité et aptitude à résister à l'adsorption non spécifique de protéines. Ces caractérisations seront obtenues quantitativement par spectroscopie infrarouge en géométrie ATR (Attenuated Total Reflection) et mesure de fluorescence tandis que l'état de surface sera contrôlé à chaque étape par microscopie à force atomique (AFM).

Le chapitre 5 s'intéresse à l'extension aux puces à protéines du protocole d'immobilisation des sondes développé pour les puces à ADN, en détaillant la synthèse, le greffage et la modification de molécules de poly(éthylène glycol) terminées par un groupement acide carboxylique.

Le chapitre 6 est, quant à lui, une étude de l'optimisation de la nature et du dépôt des sondes, afin d'obtenir les conditions les plus favorables à la reconnaissance de protéines et présente les premiers résultats obenus pour un système modèle.

Chapitre 1

Monocouche Organique pour limiter l'adsorption non spécifique : H(EG)$_n$OMe

1.1 Introduction

L'adsorption non spécifique et non contrôlée de protéines est l'un des plus importants problèmes limitant l'efficacité des puces à protéines actuelles, diminuant fortement leur sensibilité et leur sélectivité.

L'objectif de ce chapitre est de tester l'effet de chaînes de poly(éthylène glycol) greffées sur silicium hydrogéné vis-à-vis de l'adsorption non spécifique de protéines. Le greffage direct de poly(éthylène glycol) a aussi été réalisé sur silicium à partir d'une surface de silicium chlorée [103] et hydrogénée [104]. Le chapitre débutera par un rappel sur la préparation de surfaces de silicium hydrogénées, substrat utilisé pour le greffage covalent de molécules organiques [105–111]. Afin d'évaluer dans quelle mesure nos surfaces fonctionnalisées par des PEG sont efficaces pour limiter l'adsorption non spécifique de protéines, des surfaces de référence ont aussi été réalisées. Comme c'est le cas dans de nombreuses études comparatives [72; 73], notre surface de référence sera fonctionnalisée par une chaîne alkyle obtenue par greffage du 1-décène, une chaîne alkyle à 10 atomes de carbone connue pour être hydrophobe et pour favoriser l'adsorption de protéines. On rappellera ensuite le protocole utilisé pour réaliser le greffage de décène et de PEG disponibles commercialement de type H(EG)$_n$OMe. Toutes ces surfaces seront caractérisées par spectroscopie infra-rouge et microscopie à force atomique afin de quantifier les modifications constatées.

1.2 Surfaces Hydrogénées

1.2.1 Choix du substrat

Le silicium cristallin présente une structure de type diamant. Les atomes de silicium occupent les positions de deux sous-réseaux cubiques à faces centrées décalés de 1/4 le long de la grande diagonale du cube. Les plans (111) d'un cristal de silicium sont donc des plans denses (figure 1.1).

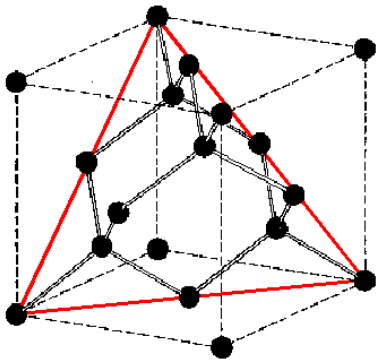

FIGURE 1.1 – Maille cubique du réseau de silicium cristallin : une face dense (111) est représentée en rouge.

L'utilisation de la face cristallographique (111) présente l'avantage de pouvoir réaliser des surfaces planes à l'échelle atomique par dissolution anisotrope de silicium dans certains milieux. Ces surfaces ordonnées constituent un substrat idéal pour des études bien contrôlées de chimie de surface car le suivi topographique par microscopie à force atomique (annexe 1) permet le contrôle de la qualité des surfaces aux différentes étapes de leur préparation et de leur modification.

Le substrat utilisé dans notre étude est un cristal de silicium monocristallin (111) coupé selon un plan faiblement désorienté par rapport au plan dense (111). La figure 1.2 représente un schéma d'un tel substrat à l'échelle atomique. Les atomes s'organisent en un réseau de marches régulièrement espacées, de hauteur égale à la distance entre deux plans (111) soit 3,14 Å. Ces marches séparent les terrasses atomiquement planes dont la largeur dépend de l'angle de désorientation α entre la normale au plan optique et la direction [111]. L'angle d'azimut θ, formé par la projection des vecteurs [111] et $[11\overline{2}]$ sur le plan optique, définit la direction de la désorientation et détermine l'orientation moyenne des marches.

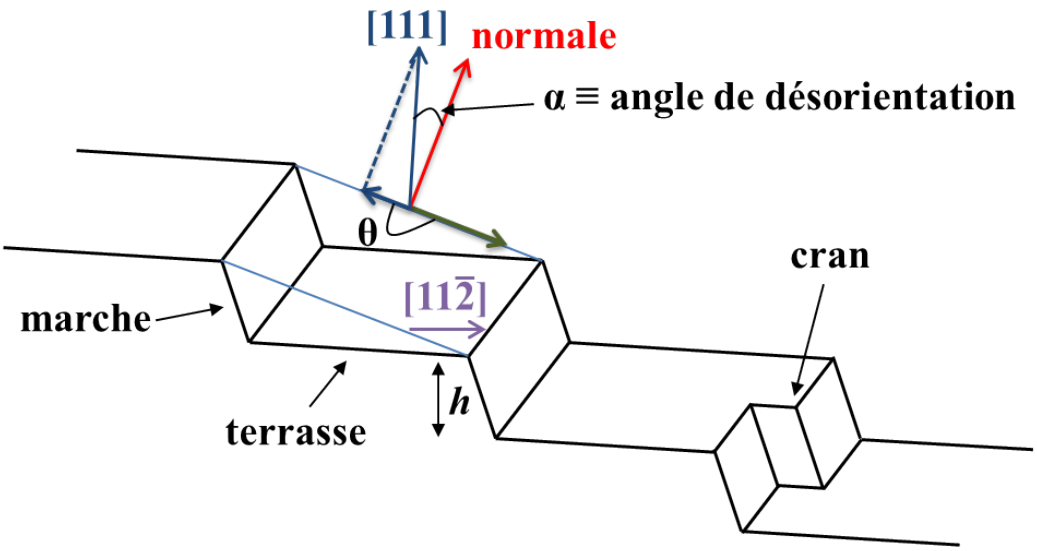

FIGURE 1.2 – Schéma d'une surface vicinale montrant la désorientation de la face vicinale par rapport au plan dense (111).

Le silicium utilisé dans notre étude a été coupé avec un angle de désorientation α de $0,2^{\circ}$, ce qui permet de produire des terrasses d'une largeur d'environ 90 nm, et un angle d'azimut θ de 180° crucial pour obtenir des marches idéalement rectilignes et parallèles entre elles.

1.2.2 Hydrogénation de surface

Depuis la fin des années 1960, l'acide fluorhydrique HF est connu pour sa capacité à passiver le silicium, en ôtant l'oxyde en surface et y formant des liaisons Si-H. De nombreux travaux ont été réalisés pour déterminer le mécanisme de dissolution du silicium [105; 112–115]. Ubara et al. [112] ont montré que la forte polarité de la liaison Si-F, formée en surface après dissolution de la couche de silice, polarise la liaison sous-jacente Si-Si. Chabal et al. [115] ont proposé qu'une molécule de HF s'insère dans cette liaison $Si^{+\delta}$-$Si^{-\delta}$. Celle-ci se brise et le fluor se lie au $Si^{+\delta}$ plus proche de la surface, tandis que l'hydrogène se lie au $Si^{-\delta}$ sous-jacent. Ce processus se poursuit jusqu'à l'élimination d'une molécule SiF_4, laissant la surface hydrogénée.

Des analyses par spectroscopie infrarouge (annexe 2) ont permis d'observer la présence de différents types d'hydrures (mono-, di- et trihydrures), signe que la surface est rugueuse à l'échelle atomique. L'augmentation du pH, par ajout de fluorure d'ammonium NH_4F, provoque la disparition des dihydrures et des trihydrures au profit des monohydrures ce qui suggère que la surface est alors atomiquement plane. L'analyse infrarouge révèle aussi que le pic Si-H à 2083 cm^{-1} est uniquement observable en polarisation p. Cette absence de signal en polarisation s montre que les liaisons Si-H sont perpendiculaires à la surface.

Des études ont été entreprises pour comprendre les mécanismes de dissolution expliquant ces différentes morphologies de surface. Allongue et al. [116] ont montré la coexistence de deux réactions de dissolution dans NH_4F (figure 1.3) :

– Une réaction chimique qui consiste à oxyder le silicium par des molécules d'eau.

– Une réaction électrochimique qui consiste en la rupture de la liaison Si-H. Le courant total étant nul, cette réaction électrochimique qui est anodique est accompagné d'une réaction cathodique de formation d'hydrogène H_2.

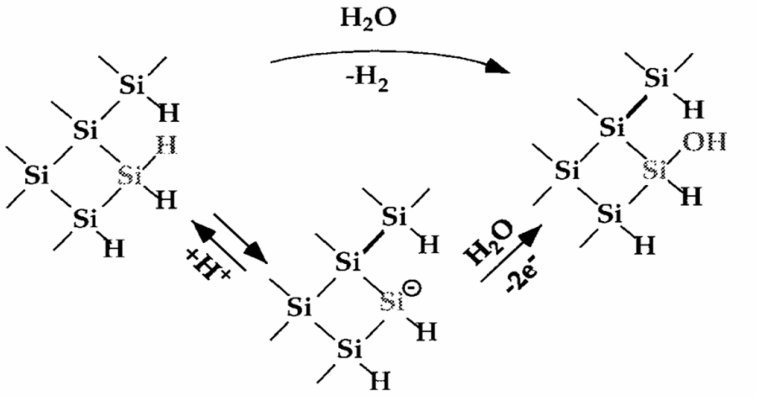

FIGURE 1.3 – Etape initiale de la dissolution du silicium par voie chimique (en haut) et électrochimique (en bas).

Ces deux voies aboutissent à la formation de liaisons Si-OH qui polarisent les liaisons arrières et permettent leur rupture par insertion d'une molécule d'eau suivant un mécanisme analogue à celui décrit pour la dissolution sous acide fluorhydrique HF. Les liaisons Si-OH formées réagissent ensuite avec les espèces fluorées et aboutissent à la création de liaisons Si-F. Cependant, alors que la réaction électrochimique est isotrope, la réaction chimique a lieu plus facilement sur les sites de cran et de marche à cause des contraintes stériques découlant de la nécessité de la présence d'une molécule d'eau. Pour des pH compris entre 8 et 9, la réaction chimique est favorisée, ce qui conduit à l'obtention de surfaces atomiquement planes [105; 113; 114].

Il a aussi été montré que la présence d'oxygène en solution initie la formation de piqûres sur la surface. L'ajout d'ions sulfite SO_3^{2-} en solution qui réagit efficacement avec l'oxygène dissous pallie ce problème [117].

Dans le cadre de notre étude, nous allons utiliser des échantillons de silicium hydrogénés par HF (appelés surfaces SiHx) et par NH_4F (appelés surfaces SiH). Les analyses AFM doivent être réalisées sur des échantillons hydrogénés par NH_4F afin de contrôler la morphologie de la surface au cours des différentes étapes. Nous utiliserons alors des échantillons ne présentant qu'une face polie, afin de favoriser l'attaque électrochimique sur la face dépolie qui joue alors le rôle d'une anode sacrificielle, protégeant la face polie. Pour les analyses par spectroscopie infrarouge, les deux types de préparation seront utilisés. Comme cette analyse nécessite l'utilisation de silicium à deux faces polies, seule une partie d'une face de l'échantillon sera dépolie. Les surfaces SiHx seront aussi utilisées car elles offrent une configuration atomique plus proche de celle du silicium amorphe qui formera la base de nos biopuces. Dans les deux cas, pour les mesures de spectroscopie infrarouge, nous utiliserons des cristaux de silicium purifiés par procédé de zone fondue "Float Zone" afin de minimiser la quantité d'oxygène dans l'échantillon. En effet les liaisons Si-O-Si associées aux

impuretés d'oxygène dans le cristal présentent une absorption du signal infrarouge gênant nos analyses.

1.2.3 Protocole Expérimental

L'obtention de surfaces hydrogénées nécessite l'utilisation de substrats et de produits de grande qualité.

Le procédé d'hydrogénation se déroule en deux étapes :

- Une étape de nettoyage servant à éliminer toute trace de contaminants organiques. L'échantillon est plongé dans un pilulier en polytétrafluoroéthylène (PTFE) contenant une solution 1 : 3 de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 30% et d'acide sulfurique (H_2SO_4) 96%, appelée mélange piranha. Ce traitement énergique forme une couche d'oxyde en surface. Le tout est ensuite soigneusement rincé à l'eau ultra pure (MilliQ, 18,2 MΩ.cm à 25°C) afin de supprimer toute trace de produits organiques. La surface oxydée obtenue est très hydrophile.
- Une étape de décapage consistant à retirer la couche d'oxyde et à former une surface hydrogénée. Une surface atomiquement plane SiH est obtenue en plongeant l'échantillon dans un pilulier en PTFE contenant une solution de fluorure d'ammonium NH_4F 40% dans laquelle 0,05 M de sulfite d'ammonium a été préalablement dissous. La solution est alors homogénéisée par ultrasons pendant 10 minutes. L'échantillon est laissé 15 minutes dans le pilulier à l'abri de la lumière, avant d'être retiré et rincé à l'eau ultra pure. Une surface rugueuse SiHx est obtenue par immersion de l'échantillon dans une solution d'acide fluorhydrique HF 50% pendant 10 secondes. Les surfaces hydrogénées obtenues sont toutes deux très hydrophobes.

1.2.4 Caractérisation des surfaces hydrogénées

Microscopie à Force Atomique

La morphologie des surfaces hydrogénées par NH_4F est observable par microscopie à force atomique (AFM). La figure 1.4 montre des images AFM à différentes échelles. On retrouve la structure en marches d'escalier, où l'on peut distinguer des terrasses atomiquement planes séparées par des marches monoatomiques d'une hauteur d'environ 3,14 Å correspondant à la distance entre deux plans cristallographiques.

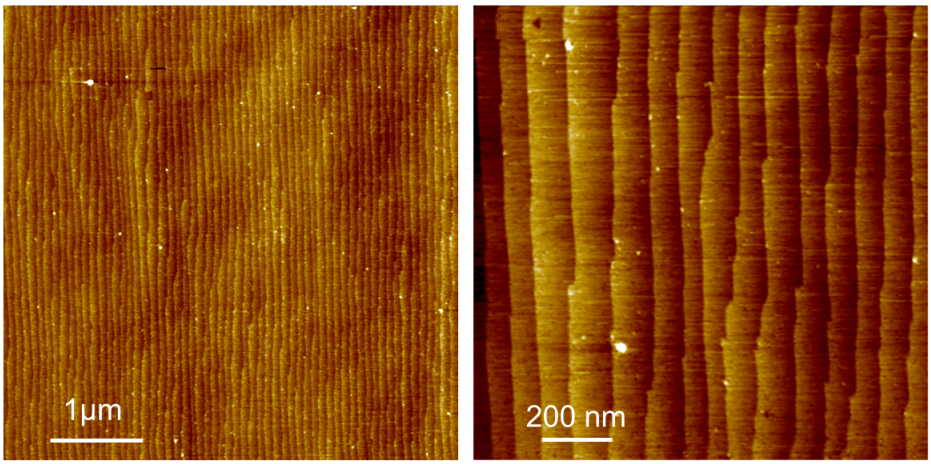

FIGURE 1.4 – Images AFM à différentes échelles d'une surface H-Si (111) préparée par NH_4F.

Spectroscopie Infrarouge en mode ATR

Les surfaces hydrogénées ont aussi été analysées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en mode ATR. La spectroscopie nous permet d'identifier les groupements chimiques présents à la surface du matériau via la détection de leurs modes de vibrations caractéristiques. La géométrie de réflexion totale atténuée (ATR) est rendue possible par l'utilisation d'échantillons aux 2 faces polies et dont les bords ont été manuellement polis pour former des biseaux (figure 1.5) à l'aide de papiers abrasifs de 5 tailles de grains décroissantes et de pâtes diamantées microniques (taille des grains 3 puis 1 μm). En utilisant un polariseur, le faisceau infrarouge passe à l'intérieur de l'échantillon et se réfléchit de nombreuses fois sur la surface améliorant grandement la sensibilité. Le faisceau peut être polarisé p ou s selon que la direction du champ électrique sélectionnée par le polariseur est parallèle ou perpendiculaire au plan d'incidence.

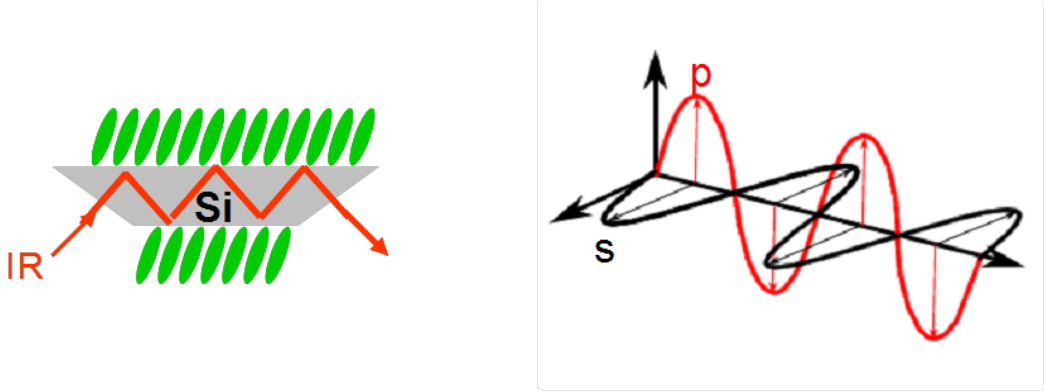

FIGURE 1.5 – Représentation schématique d'un prisme de silicium caractérisé par infrarouge en géométrie ATR (Attenuated Total Reflection).

Le spectre d'une surface SiH (figure 1.6, la référence étant la surface oxydée par le mélange piranha) est caractérisé par la présence d'un unique pic très fin à 2083

cm^{-1} dû à la vibration d'élongation de la liaison du monohydrure de silicium Si-H. Ce pic est uniquement visible en polarisation p confirmant que ces liaisons sont perpendiculaires à la surface.

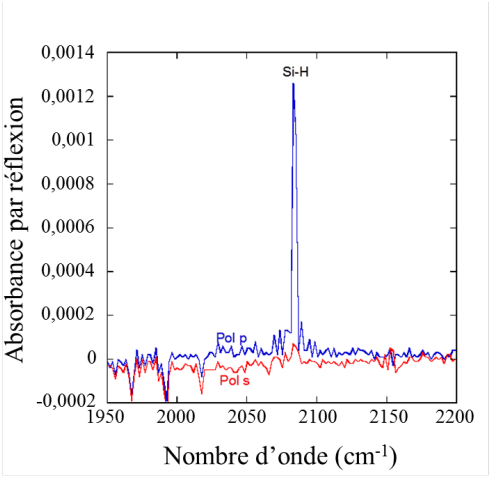

FIGURE 1.6 – Spectre infrarouge en polarisation p (bleu) et s (rouge) d'une surface de silicium hydrogénée par NH_4F

Le spectre d'une surface SiHx (figure 1.7) fait apparaitre la présence des trois types d'hydrure mentionnés précédemment (mono-, di- et trihydrures). Le signal obtenu est équivalent en polarisation p et s, confirmant la rugosité de surface.

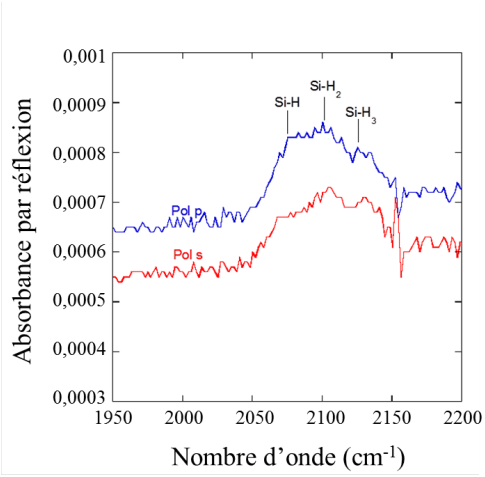

FIGURE 1.7 – Spectre infrarouge en polarisation p (bleu) et s (rouge) d'une surface de silicium hydrogénée par HF

1.3 Surfaces décylées et $H(EG)_nOMe$

1.3.1 Greffage Chimique

Les surfaces hydrogénées présentent des propriétés chimiques très intéressantes. Elles peuvent être passivées et fonctionnalisées par le greffage covalent de mono-

couches organiques par l'hydrosilylation d'alcènes ou l'attaque nucléophile d'alcools résultant en la création en surface de liaisons Si-C ou Si-O-C [106; 108–110; 118–126].

La réaction d'hydrosilylation illustrée par le greffage de décène sur la figure 1.8 consiste à insérer un groupement alcène C=C sur une liaison Si-H. Une grande variété de fonctions chimiques peuvent être obtenues en surface. Le groupe fonctionnel ne doit cependant pas être trop réactif avec la surface. Ainsi, on ne peut pas obtenir directement des surfaces fonctionnalisées par des groupements insaturés, alcools ou amines [56].

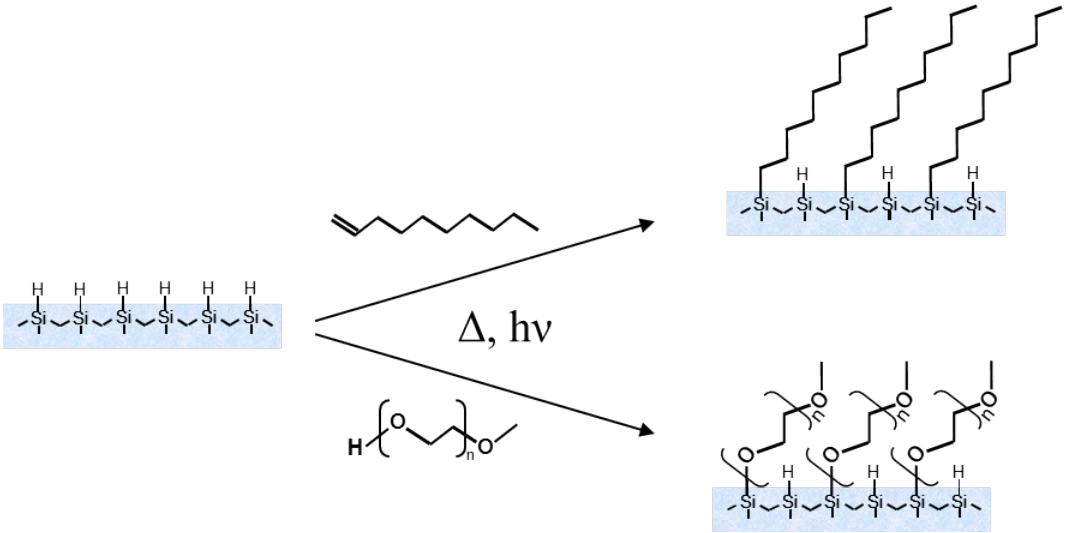

FIGURE 1.8 – Représentation schématique de la réaction d'hydrosilylation et d'attaque nucléophile.

Chidsey et al. [121] ont été les premiers à réaliser le greffage covalent d'une monocouche organique par hydrosilylation d'un alcène sur une surface de silicium hydrogénée. Ce greffage a été obtenu en présence de peroxyde de diacyle à 100°C pendant 1 heure. La qualité des couches obtenues et la faible oxydation de la surface ont mis en évidence l'utilité de cette approche pour des applications technologiques. D'autres voies ont ensuite été exploitées comme l'hydrosilylation par voie catalytique [127]. Zuilhof et al. [108; 124] ont procédé à l'hydrosilylation thermique d'alcènes de différentes longueurs entre 150 et 200°C. Chidsey et al. [118] ont mis au point une méthode photochimique permettant de remplacer les hautes températures par l'irradiation UV ($\lambda < 352$ nm), qui a été étendue par Zuilhof et al. à la lumière visible [119; 120].

Les molécules $H(EG)_nOMe$ se greffent sur le silicium par l'attaque nucléophile de leur alcool terminal sur la liaison Si-H, aboutissant à la formation de liaisons Si-O-C et à la libération de dihydrogène. De nombreuses études ont aussi été réalisées dans l'optique de greffer des molécules sur des surfaces de silicium à partir d'alcools, en particulier par des méthodes thermiques [104; 122; 125; 126] et photochimiques [128].

Pour limiter l'adsorption non spécifique des protéines, nous allons tenter d'obtenir une monocouche de poly(éthylène glycol) (PEG) par attaque nucléophile à partir de précurseurs PEG terminés par une fonction alcool.

Afin de tester leur importance sur la résistance à l'adhésion de biomolécules, plusieurs longueurs de chaînes éthylène glycol sont greffées, en utilisant une molécule pure $H(EG)_3OMe$ et des dispersions $H(EG)_nOMe$ (PEG350 ($<n> \approx 7$), PEG550 ($<n> \approx 12$), PEG750 ($<n> \approx 16$)), et les surfaces résultantes sont comparées à des surfaces décylées.

1.3.2 Protocole Expérimental

Les greffages effectués lors de notre étude ont été réalisés par voie thermique ou photochimique.

Comme pour la préparation des surfaces hydrogénées, la qualité des produits utilisés ainsi que la propreté de la verrerie sont primordiales. Afin d'éliminer toute contamination organique, la verrerie est lavée à l'éthanol, à l'eau avec un dégraissant, à l'eau osmosée (15 MΩ.cm) contenant le détergent TFD4 et rincée à l'eau ultra pure (18,2 MΩ.cm) avant d'être séchée à l'étuve pendant une nuit à 75°C. Les différentes molécules de PEG, ainsi que le 1-décène de pureté 97% sont fournis par Sigma-Aldrich et utilisés tels quels. Les solvants de rinçage sont l'éthanol absolu anhydre (EtOH) de qualité RSE alors que le dichlorométhane (CH_2Cl_2) et le tetrahydrofurane (THF) sont de qualité HPLC.

Le décène ou les PEG sont introduits dans un Schlenk puis dégazés à 100°C pendant 30 minutes. Le Schlenk est ensuite refroidi à température ambiante (légèrement au-dessus pour les PEG 550 et 750 qui peuvent être solides à température ambiante) et une surface fraîchement hydrogénée y est introduite. Le tout est laissé à dégazer pendant 15 minutes avant de fermer le Schlenk.

Pour un greffage thermique, le Schlenk est ensuite chauffé à 150°C pour les PEGs et 180°C pour le décène pendant 20 heures. Lors d'un greffage photochimique, le Schlenk est placé sous irradiation UV (λ=312 nm, 6 mW.cm^{-2}) pendant 3 heures.

Le Schlenk est ensuite refroidi à température ambiante et l'échantillon retiré et rincé. Dans le cas du greffage de décène, le rinçage est effectué dans le tétrahydrofurane (15 minutes) et le dichlorométhane (15 minutes). La surface est alors parfaitement hydrophobe et réfléchissante. Dans le cas de greffage des PEG, le rinçage est effectué dans l'éthanol (2 rinçages de 15 minutes à 65°C) et le dichlorométhane (5 minutes) avant de sécher l'échantillon sous un flux d'azote.

1.3.3 Caractérisation des surfaces

Mesure d'angles de contact

Une méthode rapide pour déterminer si la surface a été fonctionnalisée est de mesurer les angles de contact d'une goutte d'eau sur les différentes surfaces (voir annexe D). En effet cette méthode permet de discriminer les surfaces obtenues lors des différentes étapes du protocole car les couches considérées ont des hydrophilicités variées. Ainsi, alors que les surfaces oxydées sont trop hydrophiles pour obtenir une mesure satisfaisante, l'angle de contact de l'eau sur les surfaces hydrogénées par HF et NH_4F sont d'environ 57° et 78° respectivement. Les surfaces décylées sont très

hydrophobes (angle de contact : 110°) tandis que les surfaces PEG sont hydrophiles et ont toutes un angle de contact d'environ 37° indépendamment de leur longueur.

Microscopie à Force Atomique

Afin de déterminer la densité de couches organiques formées, il est nécessaire de vérifier la propreté des surfaces obtenues. Les figures 1.9 et 1.10 présentent les images obtenues par AFM de surfaces décylées et PEG respectivement. On peut observer que la structure est identique à celle de la surface hydrogénée de départ, ce qui confirme la formation d'une monocouche homogène sur la surface. On note aussi qu'il n'y a pas de résidus physisorbés sur la surface, qu'ils soient dus à une contamination ou un mauvais rinçage.

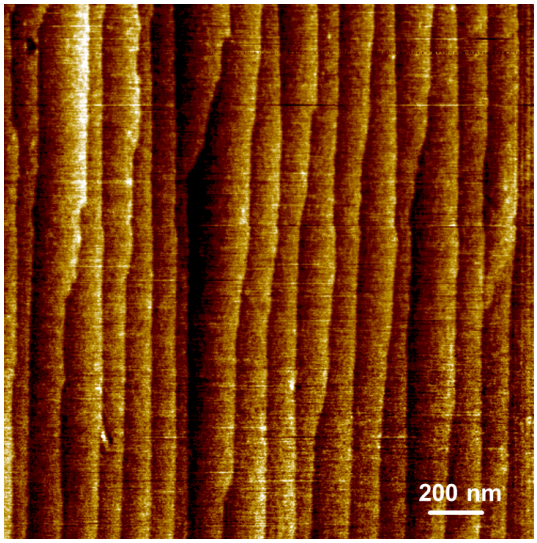

FIGURE 1.9 – Image AFM d'une surface décylée.

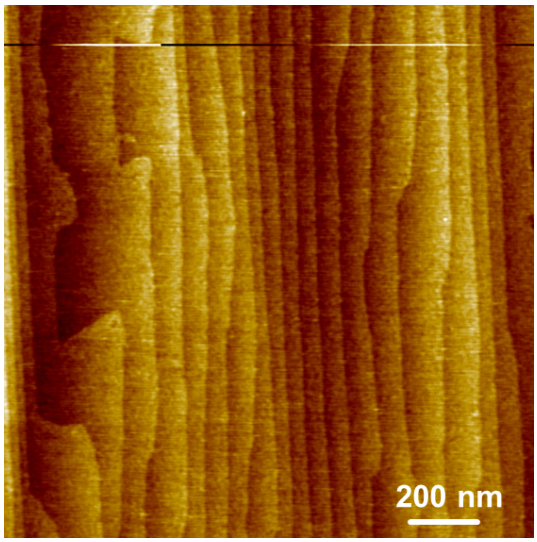

FIGURE 1.10 – Image AFM d'une surface PEG550.

Spectroscopie Infrarouge en mode ATR

Les surfaces décylées et $(EG)_n$OMe ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge en mode ATR. La figures 1.11 montre les spectres infrarouge (dans la gamme 980-3050 cm^{-1}) de surfaces SiHx fonctionnalisées thermiquement (a) et photochimiquement (b) par le décène. Les figures 1.12 montre les spectres de surfaces SiHx fonctionnalisées thermiquement (a) et photochimiquement (b) par le PEG 550. L'allure générale des spectres est la même pour les différents poly(éthylène glycol) greffés. Seules les intensités varient en fonction de la longueur des chaînes. La surface hydrogénée étant prise comme référence, la présence de pics négatifs vers 2080 cm^{-1} montrent la disparition des liaisons Si-H au profit d'autres liaisons. La nature de la couche greffée est caractérisée par les pics suivants :

Pour la surface décylée, le pic à 1460 cm^{-1} est associé aux déformations antisymétriques dans le plan (déformations "scissor", δCH_2) de l'angle H-C-H. Les pics à 2852 cm^{-1} et 2922 cm^{-1} correspondent respectivement aux modes d'élongation symétrique ($\nu_s CH_2$) et antisymétrique ($\nu_{as} CH_2$) des liaisons C-H du groupement méthylène CH_2, tandis que les pics à 2875 cm^{-1} et 2960 cm^{-1} sont associés aux modes d'élongation symétrique ($\nu_s CH_3$) et antisymétrique ($\nu_{as} CH_3$) des liaisons C-H du groupement méthyle CH_3. Il y a aussi dans cette zone un cinquième pic situé à 2900 cm^{-1}. Celui-ci peut être attribué à la deuxième harmonique de vibration de δCH_2, renforcé par une résonance de Fermi avec le pic $\nu_s CH_2$. Les pics autour de 2350 cm^{-1} sont des artéfacts expérimentaux dus à la présence de CO_2 atmosphérique dans l'enceinte où se déroule la mesure. La zone autour de 1040 cm^{-1} correspond aux élongations des liaisons Si-O-Si dues à l'oxydation partielle de la surface, qui semble ici plus importante après greffage photochimique.

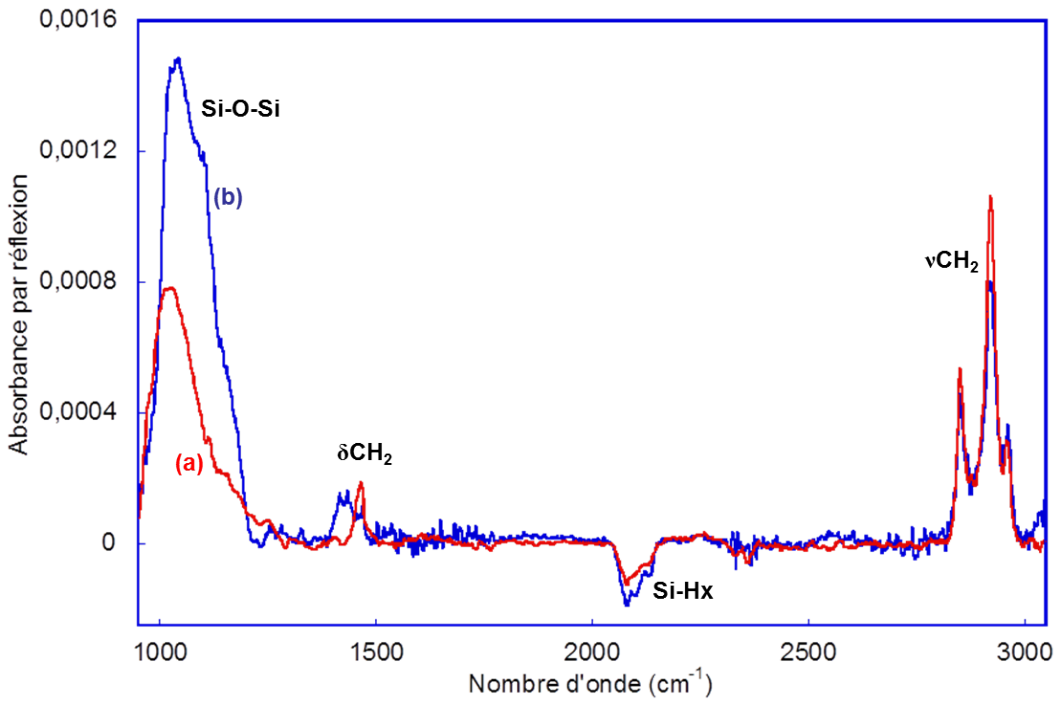

FIGURE 1.11 – Spectre infrarouge en polarisation p de surfaces obtenues par greffage thermique (a) et photochimique (b) du décène. Le spectre de référence est une surface SiHx.

Pour les surfaces PEG, de nombreux pics sont attendus [80]. La position précise de ces pics permet d'identifier les différentes conformations des chaînes PEG. Les conformations des maillons PEG diffèrent par les conformations des liaisons C-O et C-C. La conformation hélicoïdale (caractéristique de la phase cristalline du PEG) est obtenue par une conformation "trans" (T) autour des liaisons C-O et "gauche" (G) autour des liaisons C-C donnant un maillon éthylène glycol O-CH_2-CH_2-O de type TGT [80; 129]. La phase amorphe est aussi caractérisée par une conformation "gauche" autour des liaisons C-C mais les liaisons C-O peuvent être "trans" ou "gauche", résultant en des conformations TGT, TGG ou GGT pour les maillons éthylène glycol [130]. Les deux phases ont des fréquences de vibrations proches mais distinctes [80] ce qui permet en principe de les identifier sur les spectres infrarouge :

- L'élongation des liaisons C-O et C-C est caractérisée par une pic intense vers 1104-1110 cm^{-1} qui connait des épaulements en 1040 cm^{-1} et 1140 cm^{-1}. Cependant, l'épaulement en 1040 cm^{-1} est souvent caché derrière les pics de l'oxydation de la surface.
- La déformation symétrique dans le plan ("rocking") du groupement méthyle terminal (ρCH_3) à 1200 cm^{-1}.
- La déformation antisymétrique hors du plan ("twist") des CH_2 (τCH_2) vers 1247 cm^{-1} et 1296 cm^{-1}, correspondant à la polarisation parallèle et perpendiculaire à l'axe de la molécule PEG.
- La déformation symétrique hors du plan ("wag") des CH_2 (γCH_2) est aussi caractérisé par plusieurs pics. Celui à 1325 cm^{-1} est d'intensité faible et correspond à la configuration "trans" tandis que celui à 1350 cm^{-1} correspond à la configuration "gauche".

– La déformation antisymétrique dans le plan ("scissor") des CH_2 (δCH_2) à 1460 cm^{-1}.
– Les élongations des CH_2 (νCH_2) se situent dans la zone 2800-3000 cm^{-1}. Cette zone sera détaillée dans la section 1.3.4.

Les positions des pics observées sont indiscernables de celles du spectres de PEG liquide, ce qui suggère une configuration amorphe des molécules sur la surface.

Pour les surfaces PEG, l'oxydation (pics autour de 1040 cm^{-1}) est significativement plus importante sur les échantillons obtenus par greffage thermique et le signal de l'oxydation recouvre celui des élongations des liaisons C-O et C-C. Ainsi, dans notre étude, afin de limiter la formation de l'oxyde et d'avoir les surfaces les plus efficaces et reproductibles, nous utiliserons de préférence la voie photochimique.

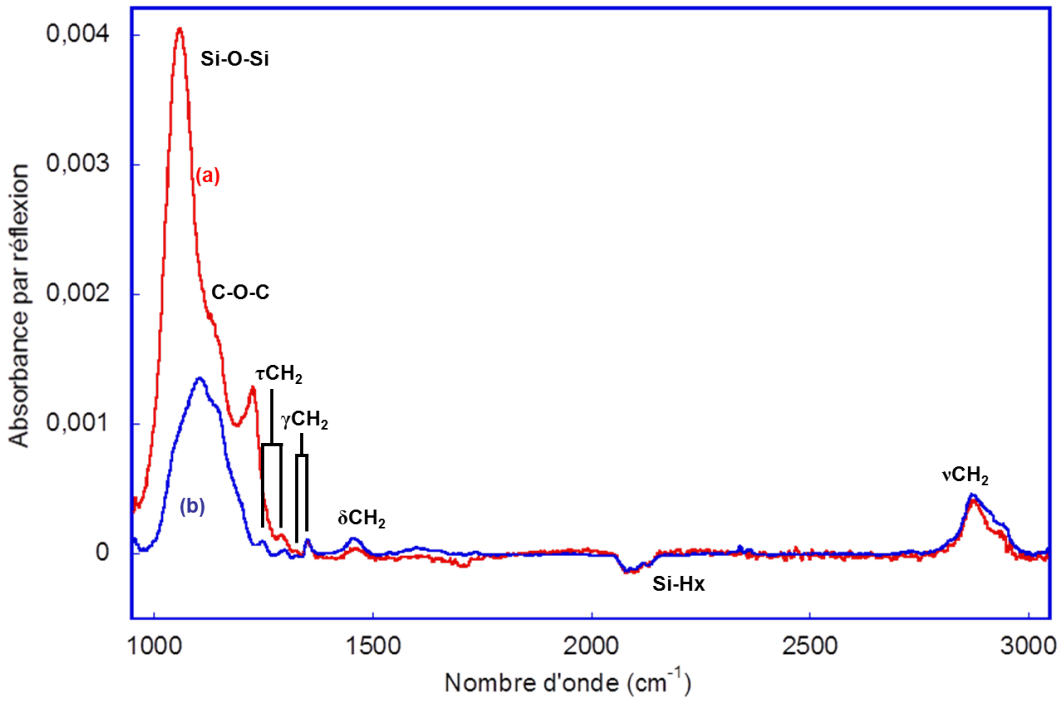

FIGURE 1.12 – Spectre infrarouge en polarisation p de surfaces obtenues par greffage thermique (a) et photochimique (b) du PEG550. Le spectre de référence est une surface SiHx.

1.3.4 Détermination de la concentration en espèces greffées

L'analyse des spectres infrarouge permet par ailleurs la quantification de la composition de la couche organique greffée et d'en déduire un taux de greffage. L'encombrement stérique des molécules ne permet pas la substitution totale des liaisons Si-H. En effet, le diamètre d'une chaîne alkyle est de 4,3 Å (celle d'une chaîne PEG varie entre 4.6Å et 5.2 Å selon la conformation de la chaîne [80]) alors que la distance Si-Si sur une surface plane est de 3.84 Å [131]. On ne peut donc pas substituer plus de 50% des groupements Si-H [132] sur une surface plane SiH et encore moins sur une surface rugueuse SiHx.

Principe

Afin d'extraire la densité des chaînes PEG à partir de l'absorbance des pics observés, il est nécessaire de faire une calibration en mesurant l'amplitude de ces mêmes pics dans des liquides où la concentration en molécules PEG est connue. Ainsi des calibrations ont été effectuées avec des solutions à 0,1 M de PEG 350, PEG 550 et PEG 750 dans du chloroforme deutéré. Ce solvant a été choisi car il solubilise bien les différentes molécules et il n'absorbe pas aux longueurs d'onde d'intérêt.

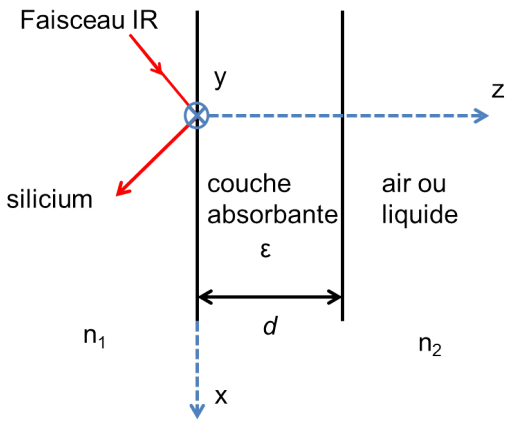

FIGURE 1.13 – Schéma d'une expérience en géométrie ATR

D'une manière générale, la géométrie de nos expériences de caractérisation des couches greffées est schématisée par la figure 1.13. La mesure permet d'obtenir l'absorption de la couche définie par la variation d'intensité réfléchie entre la surface étudiée et une surface référence (en général une surface SiH ou SiHx). Dans l'hypothèse où l'épaisseur de la couche absorbante est bien inférieure aux autres longueurs, on peut linéariser les expressions de la réflectivité. Alors, l'absorption de la couche en polarisation s et p est donnée par [133] :

$$abs_s = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{1}{n_1\cos\varphi}I_y\epsilon''_y d \tag{1.1}$$

$$abs_p = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{1}{n_1\cos\varphi}\left[I_x\epsilon''_y d + I_z\frac{n_2^4}{\epsilon_z'^2+\epsilon_z''^2}\epsilon''_z d\right] \tag{1.2}$$

où ϵ' et ϵ'' désignent les parties réelle et imaginaire de la fonction diélectrique ϵ. I_x, I_y et I_z sont des coefficients sans dimension qui caractérisent l'intensité du champ électrique à la surface dans les trois directions x, y et z (Ils seront notés I_x, I_y et I_z dans le cas des interfaces silicium-air de nos expériences et I_x^0, I_y^0 et I_z^0 dans les cas des interfaces silicium-chloroforme deutéré des calibrations). Ils sont donnés par [133] :

$$I_x = \frac{4n_1^2\cos^2\varphi(n_1^2\sin^2\varphi - n_2^2)}{n_2^4\cos^2\varphi + n_1^4\sin^2\varphi - n_1^2n_2^2} \tag{1.3}$$

$$I_y = \frac{4n_1^2\cos^2\varphi}{n_1^2 - n_2^2} \tag{1.4}$$

$$I_z = \frac{4n_1^2 \cos^2\varphi \sin^2\varphi}{n_2^4 \cos^2\varphi + n_1^4 \sin^2\varphi - n_1^2 n_2^2} \tag{1.5}$$

où φ est l'angle d'incidence du faisceau infrarouge sur la surface qu'il est important de mesurer pour chaque prisme (φ variant de 46° à 48° selon les échantillons), n_1 l'indice du silicium ($n_1 = 3.42$) et n_2 l'indice du milieu adjacent (air pour les acquisitions des spectres infrarouge des différentes surfaces (n_2=1) et chloroforme deutéré pour les calibrations (n_2^0=1,44)). Les valeurs de I_x, I_y, I_z, I_x^0, I_y^0 et I_z^0 sont données dans le tableau 1.1 pour une valeur de φ de 46.5°.

I_x	I_y	I_z	I_x^0	I_y^0	I_z^0
1.881	2.073	2.245	1.818	2.304	2.741

TABLE 1.1 – Valeurs calculées de I_x, I_y, I_z, I_x^0, I_y^0 et I_z^0.

Dans nos mesures, on cherche à calculer le nombre N de molécules PEG par unité de surface. Le nombre total de ces molécules peut être considéré comme issu de la superposition de deux populations $N_\parallel$ et $N_\perp$. $N_\parallel$ (resp. $N_\perp$) est le nombre équivalent de molécules correspondant à la projection des oscillateurs dans le plan de la surface (resp. sur la normale à la surface). Le nombre total de molécules est alors donné par $N = N_\parallel + N_\perp$. Dans un milieu isotrope, on a $N_\perp = \frac{N_\parallel}{2} = \frac{N}{3}$.

Pour les calibrations, nous avons mesuré l'absorption infrarouge des diverses solutions de PEG dans une géométrie de réflexion interne similaire à celle utilisée dans les expériences. La configuration de l'interface est plus simple que celle schématisée sur la figure 1.13 puisqu'il n'y a pas de couche interfaciale. En revanche le milieu est absorbant et son indice est donc complexe ($\tilde{n_2} = n_2 - ik_2$).

La mesure de calibration permet de déterminer l'absorption du liquide, définie par la perte d'intensité réfléchie par rapport à la réflexion totale (sans absorption). En supposant que l'absorption est faible ($k_2 \leq 0,1$), on peut négliger l'atténuation due à l'absorption sur l'extension du champ électromagnétique à l'interface (onde évanescente). Dans ce cas, l'absorption dépend de la profondeur de pénétration (δ) du champ électrique, définie par [134] :

$$\delta = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2\varphi - n_2^2}} \tag{1.6}$$

où λ est la longueur d'onde de la vibration étudiée.

L'absorption du liquide en polarisation s et p est alors donnée par :

$$abs_s^0 = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{1}{n_1\cos\varphi} I_y^0 2n_2k_2\frac{\delta}{2} \tag{1.7}$$

$$abs_p^0 = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{1}{n_1\cos\varphi}(I_x^0 + I_z^0)2n_2k_2\frac{\delta}{2} \tag{1.8}$$

Pour obtenir le nombre de molécules par unité de surface, une hypothèse est nécessaire. On doit supposer que les coefficients d'absorption correspondant aux vibrations étudiées sont proportionnels à la concentration de molécules, dans la couche

greffée comme dans les solutions de calibration, ce qui est assez raisonnable. Nous supposerons aussi que ce coefficient de proportionnalité est le même dans les deux cas. On obtient donc les relations suivantes, où C est la concentration de molécules (C=0.1M soit 6,02.10^{19} molécules.cm^{-3}) :

$$\frac{\frac{N_\perp}{d}}{\frac{C}{3}} = \frac{\epsilon''_z}{\sqrt{\epsilon'_z}}\frac{1}{2k_2} \tag{1.9}$$

$$\frac{\frac{N_\parallel}{2d}}{\frac{C}{3}} = \frac{\epsilon''_{x,y}}{\sqrt{\epsilon'_{x,y}}}\frac{1}{2k_2} \tag{1.10}$$

On suppose par ailleurs que $\sqrt{\epsilon'_z} = \sqrt{\epsilon'_x} = \sqrt{\epsilon'_y} = n_2$.

Dans le cas de la polarisation s, l'absorption de la couche s'écrit donc :

$$abs_s = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{1}{n_1\cos\varphi}\frac{6n_2k_2}{C}I_y\frac{N_\parallel}{2} \tag{1.11}$$

Le rapport des équations 1.11 et 1.7 nous donne :

$$\frac{abs_s}{abs_s^0} = \frac{I_y}{I_y^0}\frac{3}{C}\frac{N_\parallel}{\delta} \tag{1.12}$$

D'où :

$$N_\parallel = \frac{abs_s}{abs_s^0}\frac{I_y^0}{I_y}\frac{C}{3}\delta \tag{1.13}$$

L'information sur $N_\perp$ est contenue dans le spectre en polarisation p. L'équation 1.2 nous permet d'obtenir l'expression suivante de l'absorption de la couche :

$$abs_p = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{1}{n_1\cos\varphi}\frac{6n_2k_2}{C}\left(I_x\frac{N_\parallel}{2} + \left(I_z\frac{1}{\epsilon'^2_z}\right)N_\perp\right) \tag{1.14}$$

où on a tenu compte du fait que ϵ'' était négligeable devant ϵ'.

Afin d'éliminer le terme en $\frac{N_\parallel}{2}$ on peut former l'expression suivante :

$$I_y abs_p - I_x abs_s = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{1}{n_1\cos\varphi}\frac{6n_2k_2}{C}I_y \times N_\perp \times I_z\frac{1}{\epsilon'^2_z} \tag{1.15}$$

On peut donc écrire :

$$\frac{I_y abs_p - I_x abs_s}{abs_s^0} = \frac{I_y \times I_z \times \frac{1}{\epsilon'^2_z} \times N_\perp}{I_y^0 \times \frac{C}{3} \times \frac{\delta}{2}} \tag{1.16}$$

D'où :

$$N_\perp = \frac{C}{3} \times \frac{\delta}{2}\frac{I_y^0}{I_y}\frac{I_y abs_p - I_x abs_s}{abs_s^0 \times I_z \times \frac{1}{\epsilon'^2_z}} \tag{1.17}$$

Pour les surfaces PEG, la densité de molécules a été calculée à partir des aires des pics associés aux modes d'élongation des groupements CH_2 et CH_3 dans la zone 2800-3000 cm^{-1}. En effet, les pics de déformations "twist", "wag", et "scissors" des CH_2 sont trop peu intenses pour garantir une précision suffisante. Les pics d'élongation des C-C et C-O-C se recouvrent quant à eux avec ceux de l'oxyde et un mauvais

découplage entrainerait une quantification erronée. Ainsi, la valeur de δ a été obtenue pour un nombre d'onde moyen fixé à 2900 cm^{-1} (δ = 0,27 μm). L'expérience de calibration sur les différentes molécules permet de déterminer abs_s^0. Les valeurs de abs_s^0, résumées dans le tableau 1.2, dépendent de la longueur de la chaîne PEG calibrée, mais les valeurs de $\frac{abs_s^0}{n}$, où n est le nombre de maillons éthylène glycol de chaque molécule est constant et vaut environ 0,026.

Molécule	abs_s^0	$\frac{abs_s^0}{n}$
PEG 350	0.220	0.031
PEG 550	0.306	0.026
PEG 750	0.423	0.026

TABLE 1.2 – Valeurs de abs_s^0 et de $\frac{abs_s^0}{n}$ pour les différentes calibrations effectuées.

On peut ainsi relier abs_s et abs_p à $N_\parallel$ et $N_\perp$ et donc d'en déduire le nombre de molécules sur les surfaces selon les équations :

$$N_\parallel = 2,33.10^{16}\frac{abs_s}{n} \tag{1.18}$$

$$N_\perp = 2,23.10^{16}(2,07\frac{abs_p}{n} - 1,88\frac{abs_s}{n}) \tag{1.19}$$

Densité de surface observée

Pour les molécules PEG utilisées, différents pics sont attendus dans la zone 2800-3000 cm^{-1} [80] :

- L'élongation symétrique des -OCH_3 ($\nu_s OCH_3$) à 2820 cm^{-1}.
- Les élongations symétriques et antisymétriques des CH_2 ($\nu_s OCH_2$ et $\nu_{as} OCH_2$) des chaînes PEG à 2875 et 2935-40 cm^{-1} respectivement.
- L'élongation antisymétrique des -OCH_3 ($\nu_{as} OCH_3$) à 2980 cm^{-1}.

Nous avons remarqué qu'alors que ces pics sont assez bien observables sur les spectres infrarouge de poly(éthylène glycol) liquides de chaîne courte comme le diéthylène glycol diméthyl éther (diglyme), les pics $\nu_s OCH_2$ et $\nu_{as} OCH_2$ ont tendance à s'élargir fortement avec l'augmentation du nombre d'unité EG. Il devient alors impossible de résoudre chaque pic car ceux-ci se superposent.

La forme du spectre dans cette zone a été ajusté sur un profil construit à partir de fonctions pseudo-Voigt (figure 1.14). La composante $\nu_{as} OCH_3$ est parfois difficilement observable, en particulier lors des mesures de calibrations. Elle a par conséquent été négligée lors des ajustements. Ceci suggère aussi que le pic utilisé dans l'ajustement à 2820 cm^{-1}, n'est pas seulement dû à $\nu_s OCH_3$, mais l'ensemble de l'ajustement n'a pu être obtenu de manière fiable qu'en utilisant 5 fonctions pseudo-Voigt. Ceci permet de tenir compte de l'élargissement des pics mais aussi des possibles résonances de Fermi. La superposition de ces pics rend délicat l'ajustement basé sur un pic unique. Ainsi, nous avons construit une procédure de calibration utilisant l'intégrale de l'ensemble de la zone plutôt qu'un seul pic comme il est plus commun de faire [63;

135; 136]. Cependant, on retrouve des ajustements similaires en termes de position, intensité relative et forme des pics pour nos différentes surfaces, indépendamment de la longueur de la chaîne PEG greffée. Cette cohérence dans nos ajustements, ainsi que la réalité physique des pics considérés nous assure la pertinence de notre démarche.

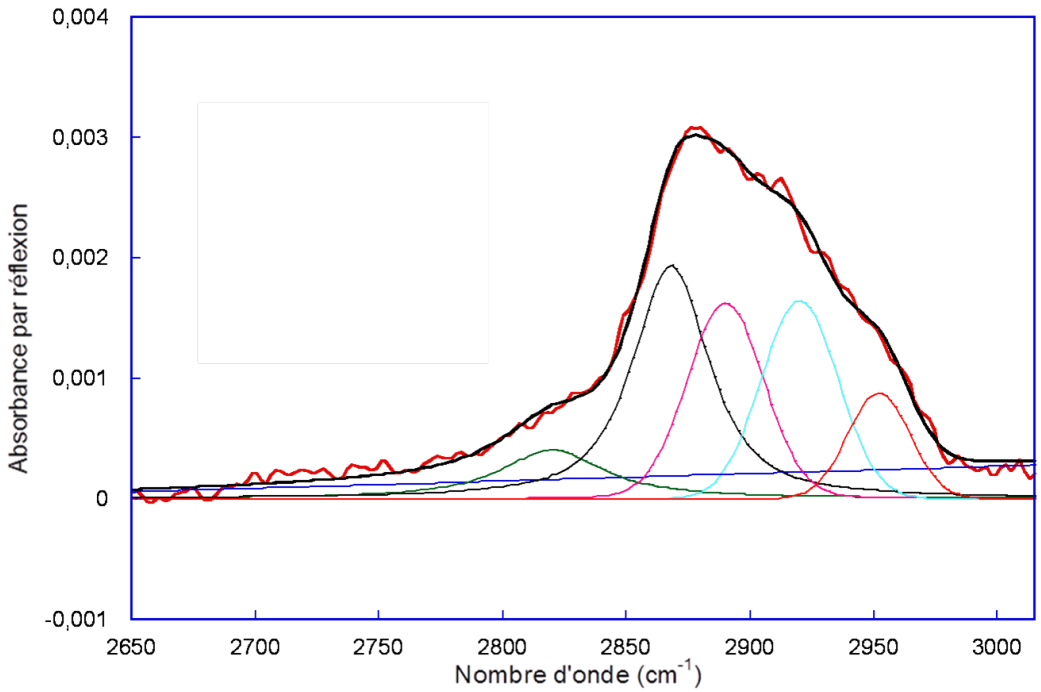

FIGURE 1.14 – Ajustement de la zone des pics d'élongation des CH_2 d'un spectre d'une surface PEG550.

Ainsi pour l'ensemble des poly(éthylène glycol) greffés, on obtient une densité de molécule d'environ 2.10^{14} cm^{-2} ce qui correspond à un taux de recouvrement de 25%. On peut penser que le taux de recouvrement serait plus important sur une surface plane, mais afin de pouvoir transporter le protocole sur des surfaces de silicium amorphe (voir chapitre 4 et 6), l'utilisation des surfaces rugueuses ayant une configuration plus proche de celle du matériau amorphe est préférable.

1.3.5 Test d'adsorption non spécifique

Choix de la protéine

Afin de pouvoir comparer facilement l'effet des différents traitements de surface sur la limitation de l'adsorption non spécifique de protéines, il nous est apparu qu'éviter les effets d'adsorption compétitive entre protéines permettrait une interprétation plus aisée des résultats. Par conséquent la solution d'essai utilisée n'en contenait qu'un seul type. Le choix de cette protéine était alors crucial afin qu'elle représente le mieux possible l'ensemble des comportements que les protéines sont susceptibles d'avoir. La BSA (Bovine Serum Albumin), est une protéine de 66,430 kDa (dimensions : 140 × 40 × 40 Å) extraite du sérum de bovin largement utilisée en laboratoire de biologie. Sa grande utilisation est due à sa stabilité, à son absence de réaction dans

de nombreuses réactions biochimiques et à son faible coût. Malgré la diversité des comportements observés lorsque l'on utilise différents types de protéines [72; 73; 87], le choix de la BSA nous a semblé pertinent car c'est une protéine qui à tendance à se déposer sur tout type de surface indépendamment de son hydrophilicité [137]. La BSA est d'ailleurs communément utilisée comme bloquant dans les tests ELISA car elle se dépose sur toutes les parois, empêchant les protéines d'intérêt de le faire. La résistance à l'adsorption non spécifique de la BSA peut donc être considérée comme un critère exigent pour la qualité d'un traitement de surface.

Mode Opératoire

Après greffage et caractérisation, l'échantillon est plongé dans une solution de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline (pH=7,4) : 137mM NaCl, 10mM phosphate, 2,7 KCl) contenant une concentration de BSA de 1 mg.mL^{-1} pendant 1 heure. L'échantillon est ensuite légèrement rincé à l'eau pour éliminer toute trace des sels. Une méthode de diminution progressive de la concentration en BSA avant rinçage par ajout progressif de PBS 1X a aussi été utilisée afin d'éviter le dépôt sur la surface d'un film de protéines qui se serait formé à la surface de la solution, mais aucun effet sur la quantité de protéines adsorbée n'a été observé.

Caractérisation par angle de contact

De la même manière qu'elle nous a permis de confirmer la fonctionnalisation de surface, la mesure de l'angle de contact de l'eau devrait nous permettre de constater s'il y a eu une modification de l'état de surface de nos échantillons due à l'adsorption de protéines. Ainsi, l'angle de contact de l'eau une surface décylée après passage dans la solution de BSA chute de 110° à 46°, l'hydrophilicité de la couche en surface étant modifié par la présence de protéines. L'angle de contact sur les surfaces PEG reste constant à 37° pour $n \geq 7$. Ceci est une première indication de leur efficacité.

Caractérisation par AFM

Les surfaces ont été imagées par AFM après leur passage dans la solution de BSA. Les figures 1.15 et 1.16 montrent respectivement une surface décylée et greffée avec du PEG550. Alors que sur la surface décylée la structure sous-jacente en marches d'escalier n'est plus du tout visible, celle-ci est tout à fait observable sur la surface PEG550. Seuls quelques résidus sont visibles sur cette surface, ce qui semble indiquer qu'alors que la surface décylée est totalement recouverte de BSA, la surface PEG550 a très largement limité l'adsorption non spécifique des protéines.

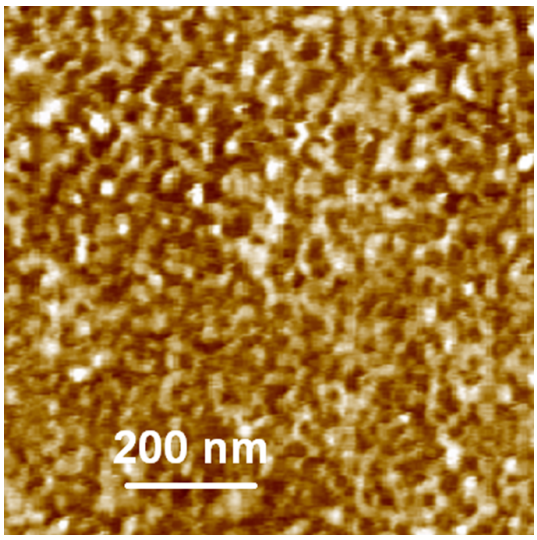

FIGURE 1.15 – Image AFM d'une surface décylée après passage dans la solution de BSA.

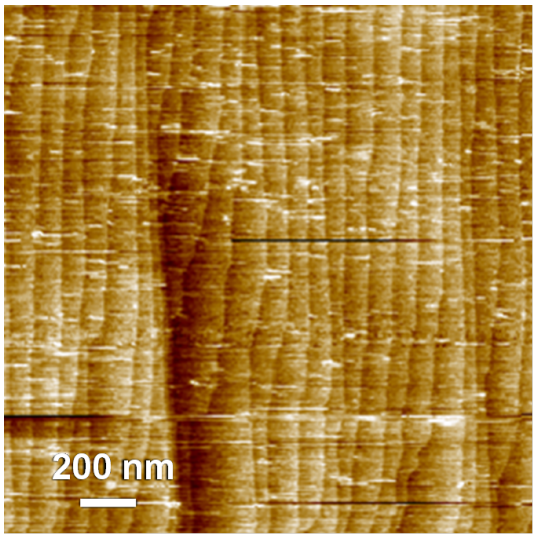

FIGURE 1.16 – Image AFM d'une surface PEG550 après passage dans la solution de BSA.

Caractérisation Infrarouge et mesure de l'efficacité des surfaces

Afin d'évaluer quantitativement l'efficacité des couches de poly(éthylène glycol) par rapport aux surfaces décylées, les différents échantillons ont aussi été caractérisés par spectroscopie infrarouge. La figure 1.17 montre les spectres infrarouge de surfaces décylée et PEG550 après passage dans la solution de BSA. On note l'apparition de pics à 1550 cm^{-1} et 1650 cm^{-1} correspondant aux pics amides II et I. Ces pics sont dus aux liaisons peptidiques des protéines présentes à la surface.

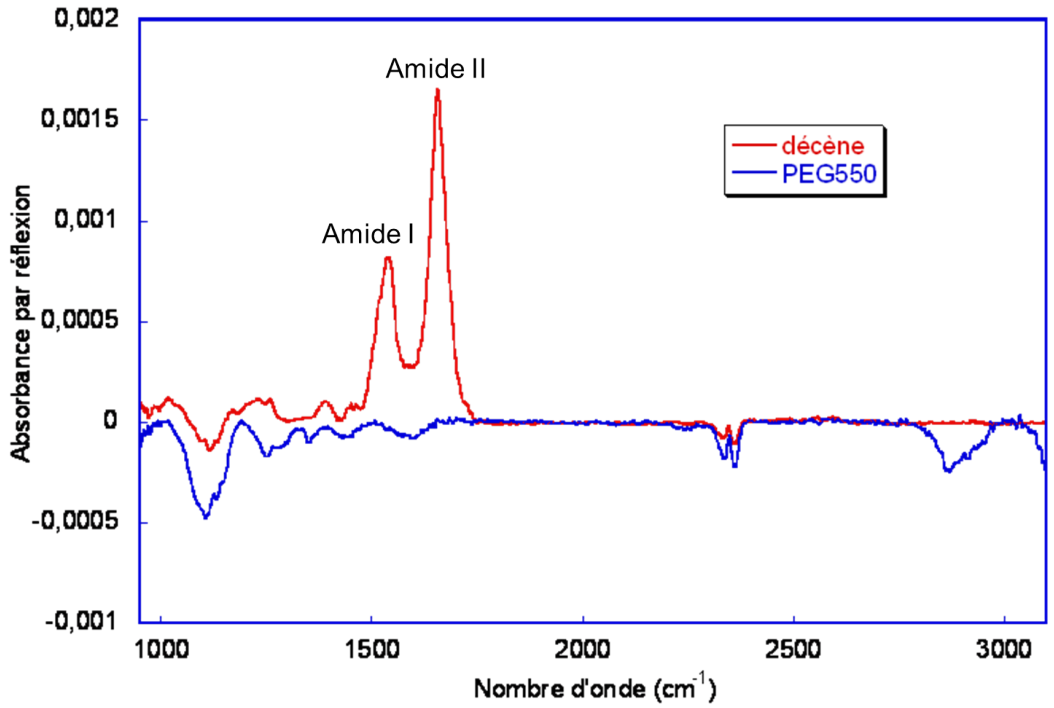

FIGURE 1.17 – Spectre infrarouge d'une surface décylée et greffée avec le PEG550 après passage dans la solution de BSA. Les surfaces greffées sont prises comme référence.

La figure 1.18 montrent les spectres infrarouge (1480-1800 cm^{-1}) des différentes surfaces obtenues (SiHx, décylée et greffées avec des PEG) et ces spectres confirment les résultats obtenus par AFM, à savoir qu'on ne détecte pratiquement aucun pic amide sur une surface greffée avec du PEG550 après exposition à la BSA, contrairement à ce que l'on observe sur une surface décylée. On note qu'une surface hydrogénée SiHx adsorbe dans les mêmes proportions que les surfaces décylées. Il est possible d'obtenir une évaluation quantitative de l'efficacité de nos surfaces PEG par rapport à la surface décylée en comparant les intégrales des pics amides. La figure 1.19 montre l'adsorption relative de BSA sur les surfaces en fonction de la longueur de la chaînes PEG (avec, par convention, la valeur pour SiHx quand $n = 0$). On observe très nettement une diminution de l'adsorption avec l'augmentation de la longueur de la chaîne PEG, jusqu'à atteindre des valeurs difficilement quantifiables pour PEG750. Les longues chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG550, PEG750) sont donc très efficaces pour limiter l'adsorption non spécifique de BSA.

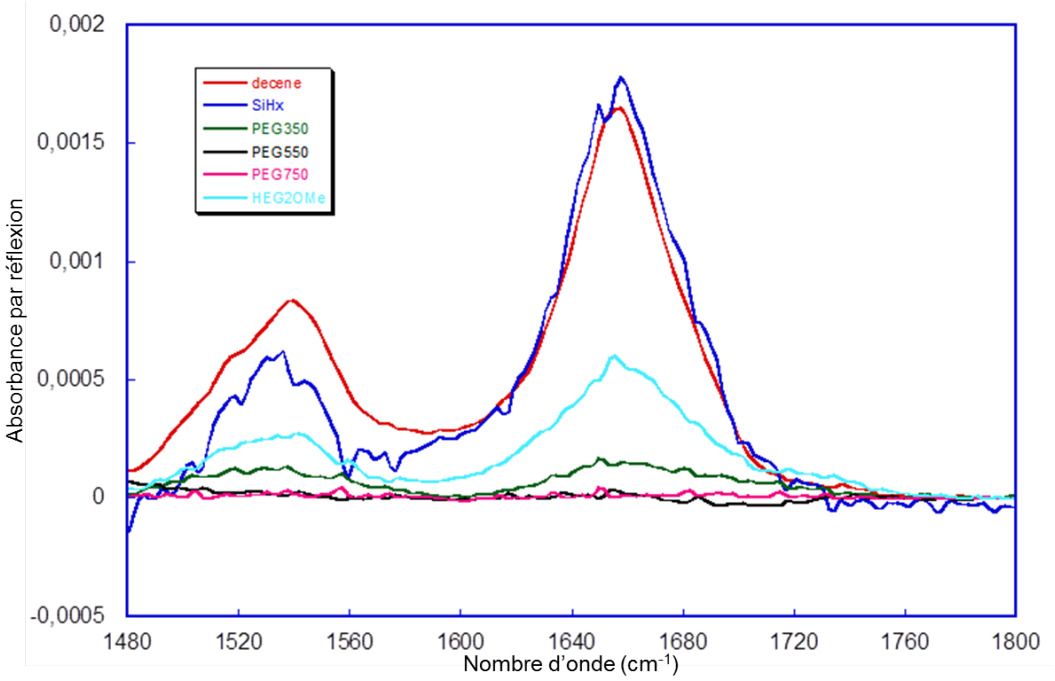

FIGURE 1.18 – Spectre infrarouge après passage dans la solution de BSA de la zone des pics amides des différentes surfaces étudiées. Les surfaces greffées sont prises comme référence.

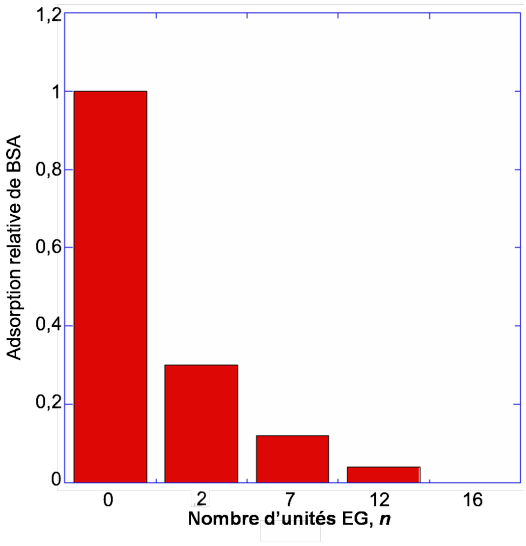

FIGURE 1.19 – Comparaison de la quantité de protéines adsorbées sur les différentes surfaces étudiées (normalisée par la quantité de protéines adsorbées sur la surface décylée, correspondant à la valeur n=0)

1.3.6 Stabilité de la monocouche

Les chaînes PEG sont greffées sur nos surfaces par des liaisons Si-O-C qui sont souvent sujettes à l'hydrolyse [23; 104; 125; 128]. Le test d'adsorption de BSA provoque déjà une perte significative du signal PEG. Comme il se déroule dans une solution saline d'eau, cette tendance peut être le signe d'une vulnérabilité de la liaison covalente entre les chaînes PEG et la surface.

Afin de tester la stabilité de nos couches, des échantillons ont été stockés dans des conditions différentes. Laissés quelques heures à l'air et à la lumière avant de réaliser le test d'adsorption non spécifique, on observe une perte d'une partie du signal PEG couplé à l'apparition d'oxyde sur les surfaces, ce qui se traduit par une perte d'efficacité à limiter l'adsorption non spécifique (figure 1.20). Un stockage sous azote et dans l'obscurité permet d'augmenter quelque peu la durée de vie de l'échantillon mais la couche demeure instable à l'échelle de quelques jours. Enfin un stockage dans du dichlorométhane, théoriquement exempt d'eau, ne permet pas non plus de conserver la couche intègre (figure 1.21).

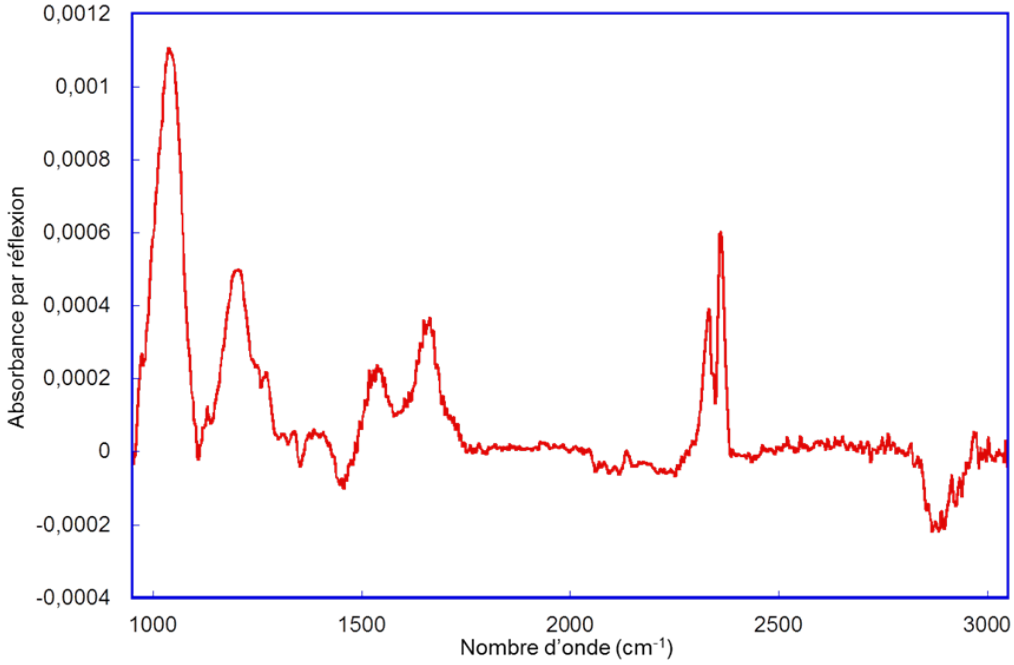

FIGURE 1.20 – Spectre infrarouge obtenu après avoir réalisé un test d'adsorption de protéines 1 jour après le greffage. On note l'apparition des pics amides et Si-O-Si ainsi qu'une perte significative des absorptions caractéristiques des molécules PEG.

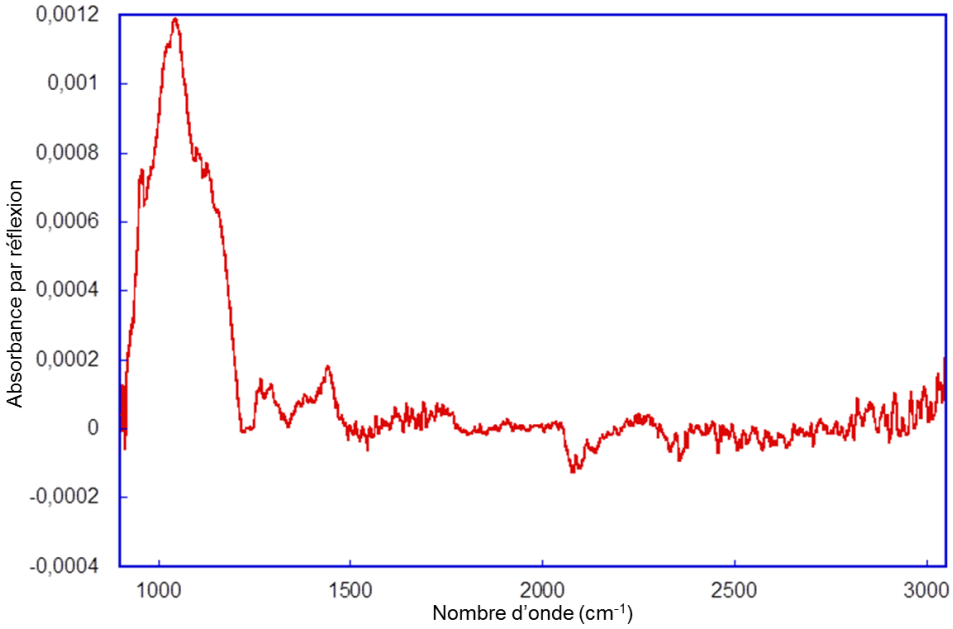

FIGURE 1.21 – Spectre infrarouge obtenu après avoir stocké la surface PEG dans du dichlorométhane pendant une nuit. La couche de PEG a totalement disparu. La surface hydrogénée est ici prise en référence

Inversement, les surfaces décylées sont stables même plusieurs mois après le greffage, ce qui démontre la robustesse de la liaison Si-C. Par conséquent, les surfaces de silicium greffées avec des molécules de type PEG par l'intermédiaire de liaisons Si-O-C présentent une excellente résistance à l'adsorption non spécifique de la BSA. En revanche, la vulnérabilité de ces liaisons Si-O-C fait décroitre significativement ces performances. Il s'avère donc nécessaire de pouvoir ancrer des chaînes PEG à la surface par l'intermédiaire de liaisons plus robustes.

1.4 Conclusion

Nous avons montré comment accrocher de façon covalente des molécules organiques sur une surface de silicium. Les couches moléculaires obtenues ont été caractérisées par mesure d'angle de contact, microscopie à force atomique et spectroscopie infrarouge en mode ATR ce qui nous a permis de vérifier la propreté et l'uniformité du greffage ainsi que de quantifier la concentration superficielle des molécules. L'efficacité des diverses surfaces à limiter l'adsorption non spécifique de protéine a ensuite été testée en les plongeant dans une solution de BSA. Il a été observé que les couches de poly(éthylène glycol) (PEG) sont très efficaces pour prévenir l'adsorption non spécifique de la BSA et que leur efficacité augmente avec la longueur de la chaîne éthylène glycol. Ainsi, pour des monocouches constituées de molécules ayant plus de 12 unités éthylène glycol, quasiment aucune protéine n'est détectée sur la surface. Malheureusement de par la nature des molécules utilisées, les PEG sont liés à la surface par une liaison Si-O-C. Cette liaison n'est pas stable dans le temps contrairement aux liaisons Si-C obtenues par hydrosilylation d'alcènes. Leur rupture provoque une perte rapide de la résistance à l'adsorption non spécifique de la BSA.

Les chapitres suivant vont s'intéresser à la fabrication des couches moléculaires à partir de PEG couplés à une chaîne alkyle terminées par un alcène. L'hydrosilylation de ces alcènes reliera les molécules à la surfaces par des liaisons Si-C et l'ajout de chaînes alkyles, qui sont connues pour passiver les surfaces de silicium [138], peuvent permettre l'obtention de couches PEG stables.

Chapitre 2

Synthèse des précurseurs

2.1 Introduction

L'instabilité des couches de poly(éthylène glycol) obtenues par le greffage des précurseurs commerciaux H-$(EG)_n$OMe sur silicium est due à l'hydrolyse des liaisons de surface Si-O-C. Inversement, les couches décylées, attachées à la surface par des liaisons Si-C sont très stables. Il paraît raisonnable de penser que si les chaînes éthylène glycol pouvaient être greffées par le biais d'une liaison Si-C, cela permettrait de conférer aux couches formées une grande stabilité dans le temps tout en conservant la capacité de limitation de l'adsorption non spécifique propre aux PEG. Dans ce chapitre seront détaillés les différents protocoles utilisés pour obtenir des molécules constituées d'une chaîne poly(éthylène glycol) accolée à une chaîne alkyle terminée par un alcène. Cette terminaison alcène doit permettre de greffer ces molécules portant un fragment PEG sur silicium par le biais de liaisons Si-C via une réaction d'hydrosilylation.

La synthèse de molécules de poly(éthylène glycol) couplés à des chaînes alkyles a été réalisée de nombreuses fois [75; 88; 139] par réaction de Williamson selon la méthode décrite par Gibson [140]. Les différents procédés employés pour nos couplages proviennent de ces études. La méthode de tosylation puis de couplage par substitution nucléophile, utilisés pour synthétiser des molécules aux chaînes PEG plus longues, est inspirée des travaux de Keegstra et al. [141].

On peut retrouver dans l'annexe A les différentes techniques classiques de chimie organique pour la synthèse et la caractérisation des précurseurs (chromatographies, spectroscopie RMN, ...)

2.2 Couplage alcène-poly(éthylène glycol) : $C_p(EG)_6OH$

Pour synthétiser une molécule constituée d'une chaîne alkyle accolée à une chaîne PEG, la stratégie consiste à coupler l'hexaéthylène glycol H-$(EG)_6$OH à un bromure d'alcène CH_2=CH-$(CH_2)_{(p-2)}$-Br par réaction de Williamson (substitution nucléophile bimoléculaire, SN2). La réaction se fait en présence de soude afin de transformer l'alcool terminal de H-$(EG)_6$OH en alcoolate plus nucléophile. L'hexaéthylène glycol est utilisé en large excès afin de limiter la disubstitution et n'obtenir que la molécule souhaitée.

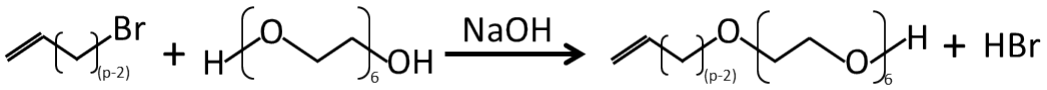

FIGURE 2.1 – Couplage alcène-poly(éthylène glycol)

2.2.1 Protocole Expérimental

Le montage expérimental est composé d'un ballon bicol relié à une rampe vide-argon par un condenseur à reflux. L'hydroxyde de sodium (NaOH) est fourni à 97% de pureté par Fluka, et l'hexaéthylène glycol (97%) et les bromures d'alcène (95%) sont fournis par Aldrich. On met le ballon sous vide 3 fois, en cassant le vide à chaque fois avec l'argon, ce qui permet d'éliminer l'oxygène du ballon. 1,3 g (32 mmol, 1.5 eq) de NaOH est dissous dans un minimum d'eau. On ajoute ensuite 25 g (86 mmol, 4 eq) d'hexaéthylène glycol H-$(EG)_6$OH. Le ballon est maintenu sous agitation et dans un bain d'huile à 100°C pendant une heure. Le mélange initialement incolore devient alors rouge-brun avec la formation de l'alcoolate. Le ballon est refroidi à 60°C avant d'ajouter goutte à goutte 5 g (21.5 mmol, 1 eq) de bromoundécène CH_2=CH-$(CH_2)_9$-Br ou 3.2 g (21.5 mmol, 1 eq) de bromopentène CH_2=CH-$(CH_2)_3$-Br, selon la molécule synthétisée.

La réaction est laissée sous agitation pendant la nuit et son avancement est vérifié par RMN jusqu'à disparition des pics caractéristiques des protons liés au carbone en β du brome dans le bromure d'alkyle à 1,8 ppm. Le mélange est ensuite dilué dans de l'eau et les phases organiques sont extraites plusieurs fois avec du dichlorométhane. Elles sont ensuite rassemblées et lavées à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium $MgSO_4$ et le solvant est évaporé. Le produit est finalement séché sous vide. Il est ensuite isolé par chromatographie flash sur colonne de silice (éluant : AcOEt/EtOH, 95/5). Le rendement de la réaction est d'environ 65%.

2.2.2 Caractérisation RMN

$C_{11}(EG)_6$OH : $C_{23}H_{46}O_7$. M=434 g.mol^{-1}.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300MHz) : δ = 1,35 (m, 12H, CH_2=CH-CH_2-$\underline{CH_2}$) ; 1,46 (m, 2H, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2-O-CH_2-) ; 1,96 (m, 2H, CH_2=CH-$\underline{CH_2}$-CH_2) ; 2,60 (s, 1H, -$\underline{OH}$) ; 3,37 (t, 2H, -CH_2-$\underline{CH_2}$-O-CH_2-CH_2-) ; 3,5-3,8 (m, 24H, -O-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-O) ; 5,00 (m, 2H, $\underline{CH_2}$=CH-CH_2-) ; 5,70 (m, 1H, CH_2=$\underline{CH}$-CH_2-) ppm.

$C_5(EG)_6$OH : $C_{17}H_{34}O_7$. M=350 g.mol^{-1}.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300MHz) : δ = 1,50 (m, 2H, CH_2=CH-CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2-O) ; 1,96 (m, 2H, CH_2=CH-$\underline{CH_2}$-CH_2) ; 2,60 (s, 1H, -$\underline{OH}$) ; 3,37 (t, 2H, -CH_2-$\underline{CH_2}$-O-CH_2-CH_2-) ; 3,5-3,8 (m, 24H, -O-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-O) ; 5,00 (m, 2H, $\underline{CH_2}$=CH-CH_2-) ; 5,70 (m, 1H, CH_2=$\underline{CH}$-CH_2-) ppm.

2.3 Méthylation de l'alcool : $C_p(EG)_6OMe$

Le protocole décrit précédemment d'obtenir des molécules de types $C_p(EG)_6OH$. Ces molécules ne permettent pas d'obtenir les couches souhaitées. En effet, elles peuvent se greffer au silicium par l'intermédiaire de l'alcool terminal. Outre sa relative fragilité, un tel greffage conduirait à la présence de chaînes alkyles à la surface externe de la couche moléculaire. Or, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, une telle couche est vulnérable à l'adsorption non spécifique de protéines. Hamers et al. [86] ont estimé que 25% des molécules de type $C_p(EG)_6OH$ se lient à la surface par l'oxygène terminal. Aussi, bien que l'on s'attende à ce qu'un groupement méthyle en bout de chaîne rende la surface plus hydrophobe, il est nécessaire de remplacer la fonction alcool en la remplaçant par un méthyle. De nombreuses études ont par ailleurs montré que des couches moléculaires poly(éthylène glycol) terminées par un alcool ou un méthyle sont similairement efficaces pour limiter l'adsorption non spécifique de protéines [72; 73]. La réaction de méthylation de l'alcool résulte de l'action de l'iodure de méthyle CH_3I sur le $C_p(EG)_6OH$ en présence d'hydrure de sodium NaH.

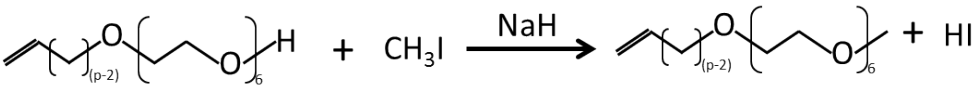

FIGURE 2.2 – Protection de l'alcool

2.3.1 Protocole Expérimental

Le montage expérimental est constitué d'un Schlenk relié à une rampe vide-argon. L'iodure de méthyle (CH_3I, Sigma Aldrich, 99%) et l'hydrure de sodium (NaH, Sigma Aldrich, 60%) sont fournis par Sigma Aldrich. Comme précédemment, on met le Schlenk sous vide 3 fois, en cassant le vide à chaque fois avec l'argon et on ajoute 1.5 équivalent de NaH. Le NaH, stocké à l'air, est protégé de l'eau atmosphérique par de l'huile paraffine et celle-ci doit être éliminée. Pour cela, on ajoute de l'éther dans le Schlenk pour solubiliser la paraffine. On laisse décanter avant de retirer l'éther via une seringue purgée sous argon et de rajouter du tetrahydrofurane (THF) distillé, solvant de la réaction. On plonge le Schlenk dans de la glace avant d'ajouter doucement 1 équivalent de $C_p(EG)_6OH$. On laisse ensuite le Schlenk 15 minutes hors de la glace avant de rajouter 1.5 équivalent d'iodure de méthyle CH_3I.

La réaction est laissée sous agitation pendant la nuit et son avancement est vérifié par CCM (AcOEt/EtOH, 95/5) jusqu'à disparition de la tache caractéristique du $C_p(EG)_6OH$. Le mélange est ensuite dilué dans de l'eau et la phase organique extraite plusieurs fois dans du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées et lavées à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium $MgSO_4$ et le solvant est évaporé. Le produit est finalement séché sous vide. Le rendement de la réaction est d'environ 95%.

Le groupement méthyle substitué à l'hydrogène rend inerte la terminaison de la molécule. On est donc sûr que seule la réaction de la terminaison alcène de cette

molécule avec la surface hydrogénée de silicium peut conduire à un greffage par réaction d'hydrosilylation.

2.3.2 Caractérisation

RMN

$C_{11}(EG)_6OMe$: $C_{24}H_{48}O_7$. M=448 g.mol^{-1}.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300MHz) : δ = 1,35 (m, 12H, CH_2=CH-CH_2-$\underline{CH_2}$) ; 1,46 (m, 2H, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2-O-CH_2-) ; 1,96 (m, 2H, CH_2=CH-$\underline{CH_2}$-CH_2) ; 3,24 (s, 3H, O-$\underline{CH_3}$) ; 3,37 (t, 2H, -CH_2-$\underline{CH_2}$-O-CH_2-CH_2-) ; 3,5-3,8 (m, 24H, -O-$\underline{CH_2\text{-}CH_2}$-O) ; 5,00 (m, 2H, $\underline{CH_2}$=CH-CH_2-) ; 5,70 (m, 1H, CH_2=$\underline{CH}$-CH_2-) ppm.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 300MHz) : δ = 25,98 (-CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2-CH_2-O) ; 28,8-29,6 (6 × CH_2) ; 33,71 (CH_2=CH-$\underline{CH_2}$-CH_2) ; 58,87 (OCH_3) ; 70,0-71,9 (13 × OCH_2) ; 114,05 ($\underline{CH_2}$=CH-CH_2-) ; 139.17 (CH_2=$\underline{CH}$-CH_2-) ppm.

$C_5(EG)_6OMe$: $C_{18}H_{36}O_7$. M=364 g.mol^{-1}.

RMN ^1H ($CDCl_3$, 300MHz) : δ = 1,50 (m, 2H, CH_2=CH-CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2-O) ; 1,96 (m, 2H, CH_2=CH-$\underline{CH_2}$-CH_2) ; 3,24 (s, 3H, O-$\underline{CH_3}$) ; 3,37 (t, 2H, -CH_2-$\underline{CH_2}$-O-CH_2-CH_2-) ; 3,5-3,8 (m, 24H, -O-$\underline{CH_2\text{-}CH_2}$-O) ; 5,00 (m, 2H, $\underline{CH_2}$=CH-CH_2-) ; 5,70 (m, 1H, CH_2=$\underline{CH}$-CH_2-) ppm.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 300MHz) : δ = 31.8 (CH_2=CH-CH_2-$\underline{CH_2}$-) ; 33,7 (CH_2=CH-$\underline{CH_2}$-CH_2-) ; 58,9 (OCH_3) ; 70,0-71,9 (13 × OCH_2) ; 114,0 ($\underline{CH_2}$=CH-CH_2-) ; 139,2 (CH_2=$\underline{CH}$-CH_2-) ppm.

Infrarouge

La figure 2.3 montre le spectre obtenu en faisant passer le faisceau infrarouge à travers une couche fine de $C_{11}(EG)_6OMe$ coincée entre deux lames de fluorure de baryum, matériau transparent à ces longueurs d'ondes.

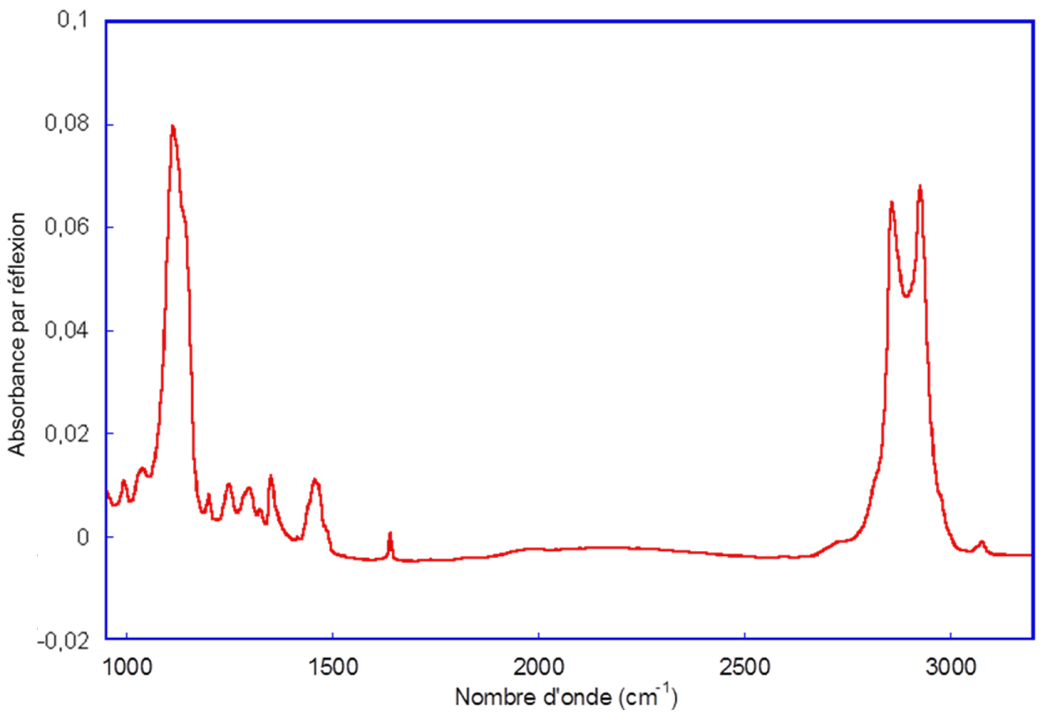

FIGURE 2.3 – Spectre infrarouge en transmission du $C_{11}EG_6OMe$.

Les différents pics caractéristiques des poly(éthylène glycol) ainsi que des chaînes alkyles se retrouvent sur ce spectre notamment un ensemble de pics caractéristiques entre 1000 et 1500 cm^{-1}. Ces pics correspondent parfaitement aux descriptions de spectres PEG amorphes détaillées par Harder et al. [80]. La figure 2.4 montre la zone 1000-1800 cm^{-1} et permet de mieux distinguer les pics caractéristiques associés aux vibrations suivantes :

- L'élongation des C-O et des C-C à 1035, 1113 et 1140 cm^{-1}.
- La déformation symétrique dans le plan ("rocking") des $-OCH_3$ à 1200 cm^{-1}.
- La déformation antisymétrique hors du plan ("twist") des $-OCH_2$ à 1248 et 1296 cm^{-1}.
- La déformation symétrique hors du plan ("wag") des $-OCH_2$ à 1323 et 1350 cm^{-1}.
- La déformation antisymétrique dans le plan ("scissor") des $-OCH_2$ à 1460 cm^{-1} qui se recouvre avec celle des CH_2 de la chaîne alkyle à 1467 cm^{-1}.
- L'élongation des alcènes C=C à 1640 cm^{-1}.

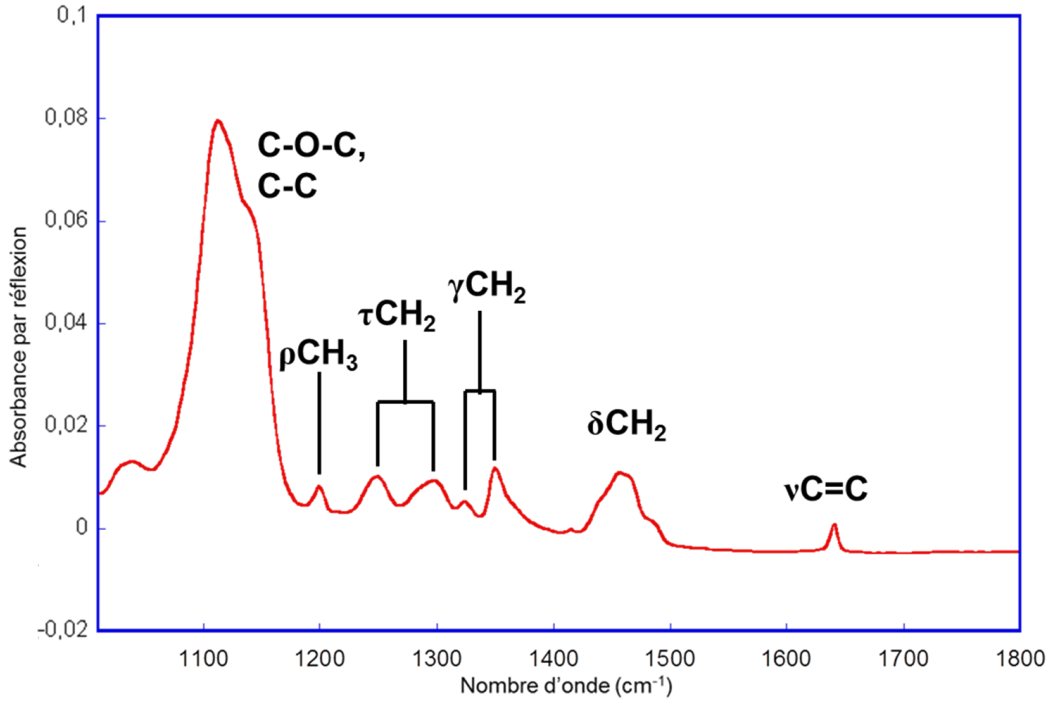

FIGURE 2.4 – Zoom du spectre infrarouge du $C_{11}EG_6OMe$ sur la zone 1000-1800 cm^{-1}.

Dans la zone 2600-3050 cm^{-1}, on s'attend à voir les pics suivants [80] :

- un pic large de vibration de combinaison à 2740 cm^{-1}.
- L'élongation symétrique des -OCH_3 à 2820 cm^{-1}.
- L'élongation symétrique des CH_2 des chaînes alkyles à 2855 cm^{-1}.
- L'élongation antisymétrique des CH_2 des chaînes alkyles à 2925 cm^{-1}.
- L'élongation antisymétrique des -OCH_3 à 2980 cm^{-1}.
- Les élongations symétriques et antisymétriques des CH_2 des chaînes PEG formant des pics larges à 2875 et 2935-40 cm^{-1} respectivement.
- L'élongation du CH_2 de la double liaison CH_2=CH à 3100 cm^{-1}.

La figure 2.5 montre le spectre infrarouge de cette zone. On peut y voir les pics des élongations des CH_2 chaînes alkyles ainsi que des épaulements dus aux élongations des -OCH_3. Les pics des élongations des PEG sont visibles mais se fondent dans la masse des pics des élongations des chaînes alkyles plus fins. On peut cependant voir que l'allure de cette zone du spectre est très différente de celle observée pour une chaîne décyle ou $(EG)_n$OMe comme on peut le voir sur les figures 1.11 et 1.12 du chapitre 1. Ceci est dû à la présence des pics d'élongations des CH_2 des chaînes PEG. L'analyse plus détaillée de ces spectres infrarouge sera effectuée dans le chapitre 3.

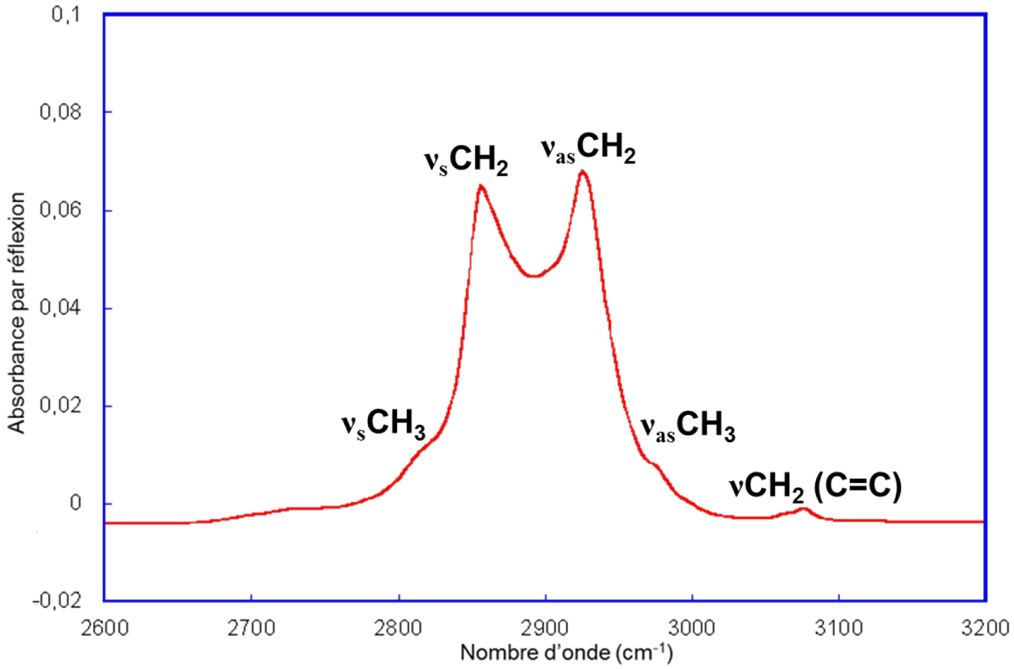

FIGURE 2.5 – Zoom du spectre infrarouge du $C_{11}EG_6OMe$ sur la zone 2600-3050 cm^{-1}.

2.4 Augmentation de la longueur de la chaîne éthylène glycol : $C_p(EG)_{12}OMe$

Comme il a été vu dans le chapitre 1, des couches comportant des chaînes éthylène glycol plus longues sont plus efficaces pour limiter l'adsorption non spécifique de protéines. Il est donc intéressant de pouvoir synthétiser des précurseurs avec des chaînes PEG plus longues. Pour cela, on peut coupler une molécule de $C_p(EG)_6OH$ avec une molécule d'hexaéthylène glycol monométhyl éther H-$(EG)_6OMe$ par réaction de Williamson. Afin d'assurer la substitution nucléophile, il faut un bon groupe partant au bout de l'une des molécules. Pour cela, nous avons tosylé le $C_p(EG)_6OH$ par du chlorure de 4-toluènesulfonyle (CH_3-C_6H_4-$SO_2Cl \equiv$ TsCl) et on obtient alors la molécule $C_p(EG)_6OTs$. Le groupe tosylate est un excellent groupe partant contrairement au groupe hydroxyle et peut être substitué par de multiples autres groupes même peu nucléophiles. Ainsi, la molécule $C_p(EG)_6OTs$ réagit avec une molécule d'hexaéthylène glycol monométhyl éther pour donner du $C_p(EG)_{12}OMe$.

2.4.1 Protocole Expérimental

Purification du chlorure de 4-toluènesulfonyle (TsCl)

Le chlorure de 4-toluènesulfonyle (TsCl, 98%) et le chloroforme ($CHCl_3$, 99%) utilisés sont fournis par Sigma Aldrich, et la potasse (KOH, 85%) par SDS. La purification du TsCl se déroule en deux étapes :

– Afin de faire précipiter les premières impuretés, on dissout le TsCl dans un petit volume de chloroforme. On filtre le mélange et on le dissout dans de l'éther

de pétrole pour précipiter les impuretés. On filtre de nouveau la solution et on évapore le solvant.

– On recristallise ensuite le TsCl dans de l'hexane. Pour cela, on dissout le TsCl dans de l'hexane à chaud, on ajoute du charbon actif, on filtre la solution et on laisse le TsCl se recristalliser à température ambiante. On filtre ensuite pour isoler le chlorure de tosyle.

Tosylation

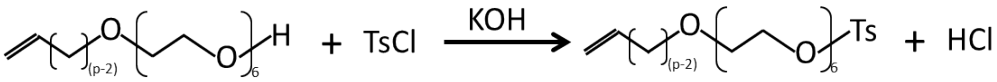

FIGURE 2.6 – Tosylation

On introduit 1 équivalent de $C_p(EG)_6OH$ dans un ballon tricol sous argon. On ajoute au goutte à goutte 1 équivalent du chlorure de 4-toluènesulfonyle, en solution dans du dichlorométhane (environ 10 mL par mmol de $C_p(EG)_6OH$). On place le tricol dans de la glace et on ajoute 8 équivalents de KOH. On agite ensuite pendant 2h30 à froid.

On suit l'avancement de la réaction par CCM (AcOEt/EtOH, 95/5) jusqu'à disparition de la tache caractéristique du $C_p(EG)_6OH$. Le mélange est ensuite dilué dans de l'eau et extrait plusieurs fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées et lavées à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium $MgSO_4$ et le solvant est évaporé. Le produit est ensuite séché sous vide et finalement isolé par chromatographie flash sur colonne de silice (éluant : AcOEt). Le rendement de la réaction est d'environ 45%.

Hexaéthylène glycol monométhyl éther

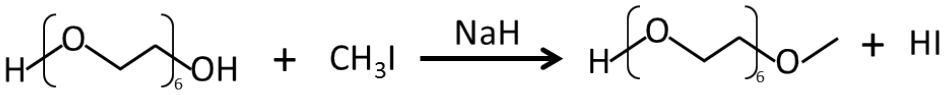

FIGURE 2.7 – Synthèse de l'hexaéthylène glycol monométhyl éther

Ce protocole est similaire à celui vu dans la section 2.3. Dans un Schlenk sous argon, on place 2 équivalents d'hydrure de sodium NaH et on ajoute de l'éther pour éliminer la paraffine. On retire ensuite l'éther puis on rajoute le tetrahydrofurane (THF) et on place le Schlenk dans la glace. On ajoute ensuite 4 équivalents d'hexaéthylène glycol H-$(EG)_6OH$ et on laisse le Schlenk 15 minutes hors de la glace avant de rajouter 1 équivalent d'iodure de méthyle CH_3I. On laisse la réaction se poursuivre pendant une nuit. On neutralise ensuite le milieu avec de l'acide chlorhydrique avant d'évaporer les solvants et de purifier le produit par chromatographie flash sur colonne d'alumine (éluant : THF). Le rendement de la réaction est d'environ 70%.

Couplage

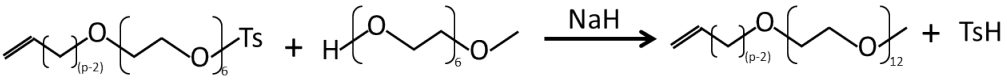

FIGURE 2.8 – Allongement de la chaîne éthylène glycol

On introduit 1 équivalent d'hexaéthylène glycol monométhyl éther $H(EG)_6OMe$ dans un Schlenck contenant du tetrahydrofurane (environ 10 mL par mmol de H-$(EG)_6OMe$) distillé, puis 2 équivalents d'hydrure de sodium NaH déprotégé. On agite sous azote pendant 24h, puis on refroidit le milieu réactionnel à 0°C. On introduit alors goutte à goutte 1 équivalent de $C_p(EG)_6OTs$ en solution dans du THF. On maintient l'agitation pendant 6 jours.

On suit la réaction par CCM (éluant : AcOEt) jusqu'à disparition de la tache caractéristique du $H(EG)_6OMe$. On évapore le THF sous vide, avant d'introduire de l'eau et extraire les phases organiques avec du dichlorométhane. On purifie le produit par chromatographie flash sur colonne de silice (éluant : AcOEt pur d'abord puis mélange THF/EtOH 85/15). Le rendement de la réaction est d'environ 60%.

2.4.2 Caractérisation

RMN

$C_{11}(EG)_6OTs$: $C_{30}H_{52}O_9S$. M=589 g/mol. RMN ^1H ($CDCl_3$, 300MHz) : δ 7,74 (m, 2H, -CH- aromatique) ; 7,32 (m, 2H, -CH- aromatique) ; 5,75 (m, 1H, -CH=CH_2), 4,96 (m, 2H, CH=CH_2) ; 4,11-4,10 (m, 2H, -CH_2-O-Ts) ; 3,61 (m, 22H, O-CH_2-CH_2-O) ; 3,4 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-) ; 2,41 (s, 3H, -CH_3), 2,00 (m, 2H, -O-CH_2-...-CH_2-CH=CH_2) ; 1,53 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-) ; 1,32 (m, 12H, CH_2=CH-CH_2-CH_2) ppm.

$H(EG)_6OMe$: $C_{13}H_{28}O_7$. M=296 g/mol. RMN ^1H ($CDCl_3$, 300MHz) : δ 3,5-3,8 (m, 28H, -O-CH_2-CH_2-O-) ; 3,34 (s, 3H, -CH_3) ; 2,85 (s, 1H, -OH) ppm.

$C_{11}(EG)_{12}OMe$: $C_{36}H_{72}O_{13}$. M=712 g/mol. RMN ^1H ($CDCl_3$, 300MHz) : δ = 1,35 (m, 12H, CH_2=CH-CH_2-CH_2) ; 1,46 (m, 2H, -CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-) ; 1,96 (m, 2H, CH_2=CH-CH_2-CH_2) ; 3,24 (s, 3H, O-CH_3) ; 3,37 (t, 2H, -CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-) ; 3,5-3,8 (m, 48H, -O-CH_2-CH_2-O) ; 5,00 (m, 2H, CH_2=CH-CH_2-) ; 5,70 (m, 1H, CH_2=CH-CH_2-) ppm.

2.5 Synthèse à partir des précurseurs commerciaux

Nous avons cherché à simplifier les synthèses multiétapes décrites précédemment, de manière à pouvoir obtenir facilement et en grande quantité des molécules avec des PEG de longueur ajustable. Pour cela, nous avons développé une méthode permettant d'utiliser les distributions H-$(EG)_nOMe$ (Sigma-Aldrich) utilisées au chapitre 1 (PEG350 ($<n> \approx 7$), PEG550 ($<n> \approx 12$), PEG750 ($<n> \approx 16$)) comme précurseurs à nos synthèses. Ces molécules sont couplées à la chaîne alkyle et séparées

suivant leur taille après le couplage. La méthode présente l'avantage d'utiliser des molécules de poly(éthylène glycol) déjà protégées par un groupe méthyle. Ceci permet de s'affranchir de l'étape de protection mais aussi de pouvoir utiliser le précurseur PEG dans des proportions stoechiométriques avec les autres réactifs, sans obtenir de disubstitutions. Le principe du couplage est le même que celui vu dans la section 2.2.

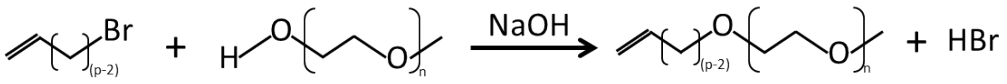

FIGURE 2.9 – Synthèse à partir des distributions

2.5.1 Protocole Expérimental

Le protocole expérimental est exactement le même que celui décrit dans la section 2.2 mais les proportions des réactifs ont été changées. Afin d'augmenter le rendement de la réaction, pour un équivalent de $H(EG)_nOMe$, on utilise 2 équivalents de NaOH et de bromure d'alcène (C_pBr). Les bromures d'alcènes utilisés sont le bromure d'allyle (p=3), le bromopentène (p=5) et le bromoundécène (p=11) (Aldrich, 95%). Le rendement final de ces réactions se situent entre 65% et 70%.

2.5.2 Caractérisation

RMN

Après la réaction, la chromatographie flash permet de séparer les différentes longueurs de chaînes PEG. Les figures 2.10 et 2.11 montrent les spectres RMN des fractions obtenues en début et en fin de chromatographie flash après la réaction entre le bromopentène et le PEG350. Les spectres sont évidemment similaires mais les intégrations montrent qu'alors que la chaîne PEG de la molécule récupérée en début de chromatographie a une longueur d'environ 6 unités, celle de la molécule récupérée en fin de chromatographie a une longueur d'environ 8 unités.

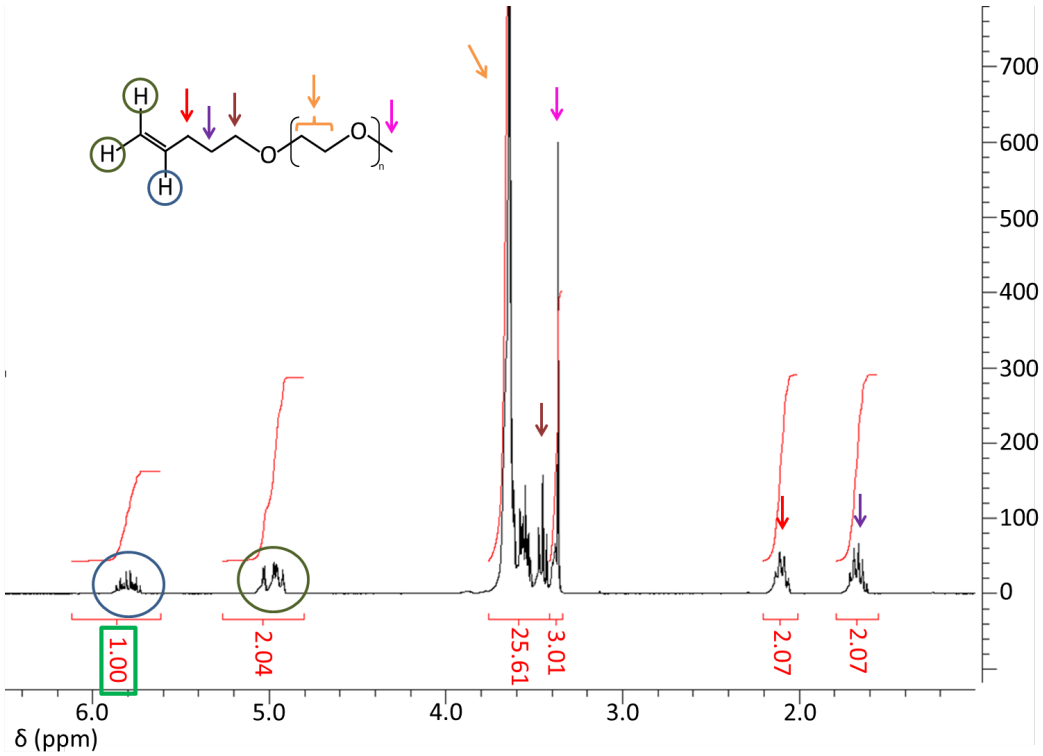

FIGURE 2.10 – RMN du proton de fractions obtenues en début de colonne. L'intégration des pics indique que la molécule isolée est le $C_5(EG)_6OMe$.

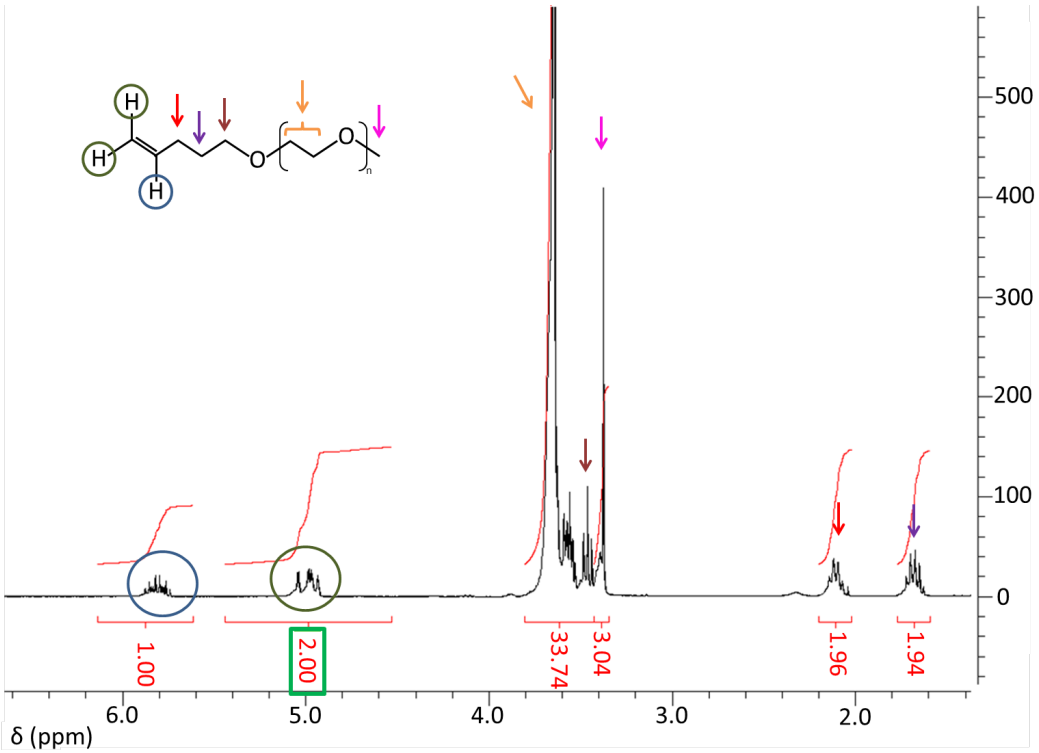

FIGURE 2.11 – RMN du proton de fractions obtenues en fin de colonne. L'intégration des pics indique que la molécule isolée est le $C_5(EG)_8OMe$.

Infrarouge

La figure 2.12 montre les spectres infrarouge de quelques molécules $C_p(EG)_nOMe$ obtenues par ce procédé de synthèse. La position et la forme des pics décrits dans la section 2.3.2 restent inchangés. Seule la forme globale de la zone d'élongation des CH_2 a changé pour se rapprocher de celle observée dans le chapitre 1 pour les molécules PEG ne possédant pas de chaînes alkyles. Ceci est dû au fait que les molécules dont les spectres sont montrés sur la figure 2.12 ont des chaînes éthylène glycol beaucoup plus longues que leurs chaînes alkyles. En particulier, on peut voir dans la zone 2800-3000 cm^{-1}, que le pic principale est situé à 2870 cm^{-1} et correspond à l'élongation symétrique des CH_2 des chaînes PEG. Ce pic large a un grand recouvrement avec les pics voisins mais on peut aussi voir des épaulements à 2855 et 2925 cm^{-1} dus aux élongations des CH_2 des chaînes alkyles. Comme l'on pouvait s'y attendre, ceux-ci sont plus marqués pour les spectres de molécules $C_p(EG)_nOMe$ avec un rapport p/n plus grand.

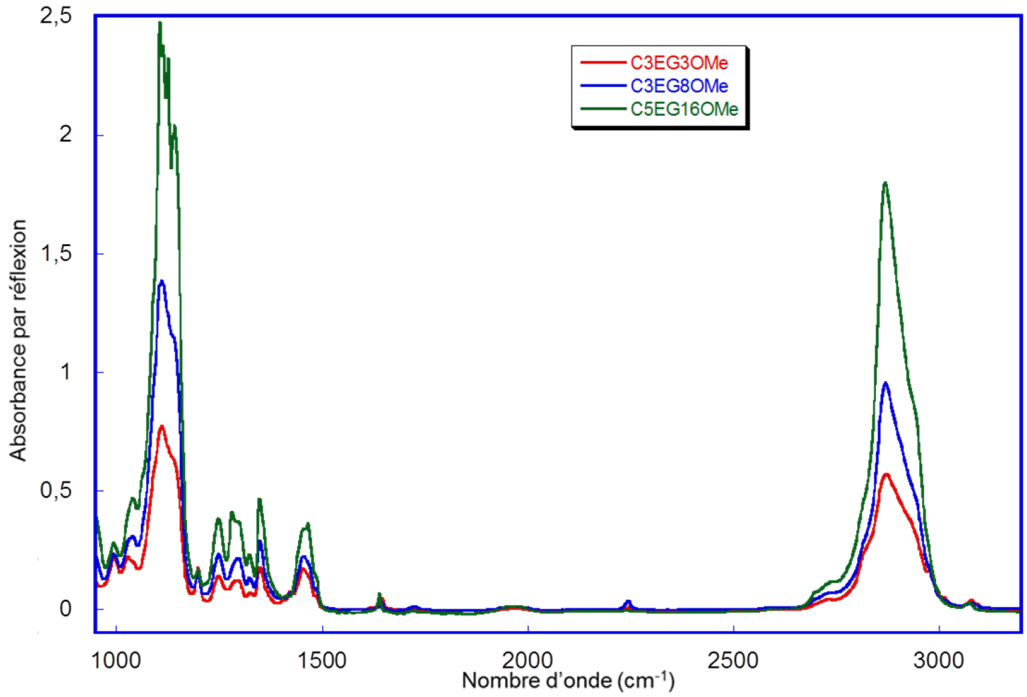

FIGURE 2.12 – Spectres infrarouge des différents $C_p(EG)_nOMe$ liquides

2.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons détaillé diverses méthodes de synthèses organiques permettant d'obtenir de nombreuses molécules couplant chaîne alkyle et chaîne éthylène glycol. L'alcène en bout de chaîne alkyle permettra le greffage de ces molécules sur les surfaces de silicium hydrogénées par formation de liaisons Si-C stables, tandis que le méthyle en bout de chaîne éthylène glycol empêchera ce même greffage par le côté PEG de la molécule.

Chapitre 3

Greffage de chaînes alkyles/PEG sur silicium

3.1 Introduction

Les différents précurseurs $C_p(EG)_nOMe$ ayant été synthétisés, il s'agit maintenant de déterminer comment les greffer sur substrat de silicium et de caractériser la couche moléculaire obtenue. Contrairement aux molécules greffées dans le chapitre 1, la faible quantité de précurseurs obtenus (de quelques centaines de milligrammes à quelques grammes) rend difficile un greffage à partir des produits purs et nécessite donc l'utilisation d'un solvant inerte pour pratiquer le greffage en voie liquide avec des protocoles similaires à ceux déjà connus. Ce solvant doit être capable de solubiliser à la fois la partie poly(éthylène glycol) hydrophile et la partie alkyle hydrophobe. La nature amphiphile de ces nouveaux précurseurs laisse entrevoir des difficultés particulières pour mettre au point des rinçages efficaces et obtenir une surface vierge de résidus après greffage. Ce chapitre se focalise sur la mise au point du protocole de greffage. La composition, densité et stabilité des couches obtenues sont alors évaluées.

Depuis 2003, trois groupes de recherches ont décrit la fabrication de couches moléculaires de $C_p(EG)_nOMe$ sur silicium. Le groupe de Cai s'est d'abord focalisé sur la fonctionnalisation de pointes AFM par une couche $C_{11}(EG)_3OMe$ obtenue par greffage thermique [142]. Ces chercheurs ont montré que ces pointes avaient une interaction réduite avec des protéines telles que le fibrinogène et la BSA. Ils ont ensuite préparé le même type de couches sur des substrats de silicium (111) par greffage photochimique et ont mesuré les angles de contact (56°-59° pour n = 3 et 46°-49° pour n = 6 et 7) et l'épaisseur des couches avant et après traitement au fibrinogène [143]. Ils ont montré que, par rapport aux surfaces hydrogénées, des surfaces greffées par des molécules $C_{11}(EG)_3OMe$, $C_{11}(EG)_6OMe$, $C_{11}(EG)_9OMe$ réduisaient l'adsorption de fibrinogène de 30, 95 et 98% respectivement. Leur procédure de greffage photochimique proposait de n'utiliser que 1 mg de produit sans solvant. Ils ont aussi réalisé une étude montrant qu'une couche moléculaire de $C_{11}EG_7OMe$ était plus stable sur Si(111) que sur Si(100) dans des conditions variées comme au contact de tampons biologiques, des acides et des bases et qu'elle permettait une réduction de l'adsorption du fibrinogène de 97% [85].

Hamers et al. ont préparé photochimiquement des couches moléculaires mixtes contenant à la fois des fonctions amines et des molécules $C_{11}(EG)_3OH$ sur diamant et silicium [86]. Ils ont suivi l'adsorption de nombreuses protéines fluorescentes (streptavidine, BSA, caséine, fibrinogène) sur ces surfaces et ont montré que les couches moléculaires pouvaient diminuer la quantité de protéines adsorbées sur les surfaces de 60% sur silicium et 70% sur diamant en augmentant la proportion de $C_{11}(EG)_3OH$ sur la surface. Ils ont ensuite étudié l'influence de la longueur de la chaîne éthylène glycol montrant que des couches de $C_{11}(EG)_6OH$ étaient plus efficaces que celles de $C_{11}EG_3OH$ pour toutes les protéines étudiées [87].

Gooding et al. ont obtenu par voie thermique des monocouches de $C_{11}(EG)_3OMe$ sur silicium. Ils ont montré que de telles couches étaient moins efficaces pour lutter contre l'adsorption non spécifique de protéines que des couches de la même molécule $C_{11}(EG)_3OMe$ sur or [144]. En se basant sur des mesures XPS et d'angles de contact, ils en ont déduit que ceci pouvait être dû à la plus faible quantité de molécules greffées. En effet, ils ont déduit que leurs couches sur silicium contenaient 3,0-3,1 $.10^{14}$ molécules.cm^{-2} et qu'elles n'étaient pas aussi organisées que sur or. Ceci suggère l'existence d'une limite inférieure, en plus de la limite supérieure déjà évoquée [81], à partir de laquelle la couche ne joue plus son rôle de limitation de l'adsorption non spécifique de protéines. Gooding et al. ont aussi préparé des couches moléculaires de $C_{11}(EG)_4$ protégées par des t-butyldiméthylsilyles afin de modifier par la suite la fonctionnalisation de surface, et ont de nouveau mesuré une épaisseur de couche plus faible que celle attendue, indiquant encore l'organisation ouverte des couches [88]. Les valeurs de densité de greffage obtenues par Gooding sont pourtant très importantes pour un greffage sur silicium, et on est en droit de penser que la faible résistance de ses couches est plutôt liée au faible nombre d'unités PEG.

C'est en partant de ces constats que nous avons décidé de compléter ces études en s'intéressant à des chaînes éthylène glycol dans une gamme plus large (n allant de 3 à 16), mais aussi en jouant sur la longueur de la chaîne alkyle (p allant de 3 à 11), chose qui n'avait jamais été réalisée avant.

3.2 Protocole initial

Les méthodes de greffage des $C_p(EG)_nOMe$ utilisées dans notre étude s'inspirent de celles de la littérature et de celle utilisée pour le greffage des $H(EG)_nOMe$ détaillée dans le chapitre 1. Le greffage se déroule sur une surface de silicium fraichement hydrogénée qui est plongée dans un Schlenk contenant une solution de $C_p(EG)_nOMe$ à 0.1M dans un solvant dépendant des longueurs des chaînes alkyles et PEG et de la voie de greffage (photochimique ou thermique). Le Schlenk est maintenu sous atmosphère inerte soit pendant 3 heures sous irradiation UV (λ=312 nm, 6 mW.cm^{-2}) soit pendant 20 heures à 180°C. L'échantillon est ensuite rincé avant que la surface ne soit caractérisée par AFM et/ou spectroscopie infrarouge. Contrairement aux études précédentes, la méthodologie de greffage a été optimisée en testant différents solvants pour le greffage et les rinçages. De plus, nous avons aussi fait varier les longueurs de chaînes alkyles et éthylène glycol des molécules que nous avons greffées afin d'étudier

l'impact que ces longueurs ont sur la capacité des surfaces à limiter l'adsorption non spécifique de protéines.

3.3 Détermination du solvant

La synthèse des $C_p(EG)_nOMe$ ne produit typiquement que quelques centaines de milligrammes de précurseurs au bout des différentes étapes de fabrication. La méthode de synthèse utilisée à partir des précurseurs commerciaux (section 2.5 du chapitre 1) permet d'augmenter cette quantité à quelques grammes mais cela ne suffit tout de même pas à réaliser le greffage pur de ces molécules qui nécessite plusieurs millilitres de produit. Il convient donc de les mettre en solution. De nombreux solvants ont été testés et leur efficacité dépend parfois du rapport des longueurs des chaînes éthylène glycol et alkyle. Ainsi, des alcanes comme l'hexane et l'heptane sont adaptés à la solubilisation des $C_p(EG)_nOMe$ pour un rapport p/n supérieur à 1 mais ne solubilisent pas les molécules à longues chaînes éthylène glycol. De plus les greffages dans ces solvants n'ont pas été extrêmement reproductibles, et les spectres infrarouge des surfaces greffées montrent systématiquement une contamination entre 1600 et 1800 cm^{-1} comme on peut le voir sur la figure 3.1 qui montre le spectre infrarouge d'une surface $C_{11}(EG)_6OMe$ obtenue par voie photochimique. L'utilisation de ces alcanes n'est donc pas optimale pour notre étude. D'autres solvants comme le dioxane, l'acétate d'éthyle ou des dérivés de l'éthylène glycol comme le diglyme (diéthylène glycol diméthyle éther) ont été testés comme solvants de greffages photochimiques, mais alors qu'ils solubilisent bien les différents $C_p(EG)_nOMe$, ces derniers ne semblent pas se greffer efficacement à la surface du silicium dans ces conditions.

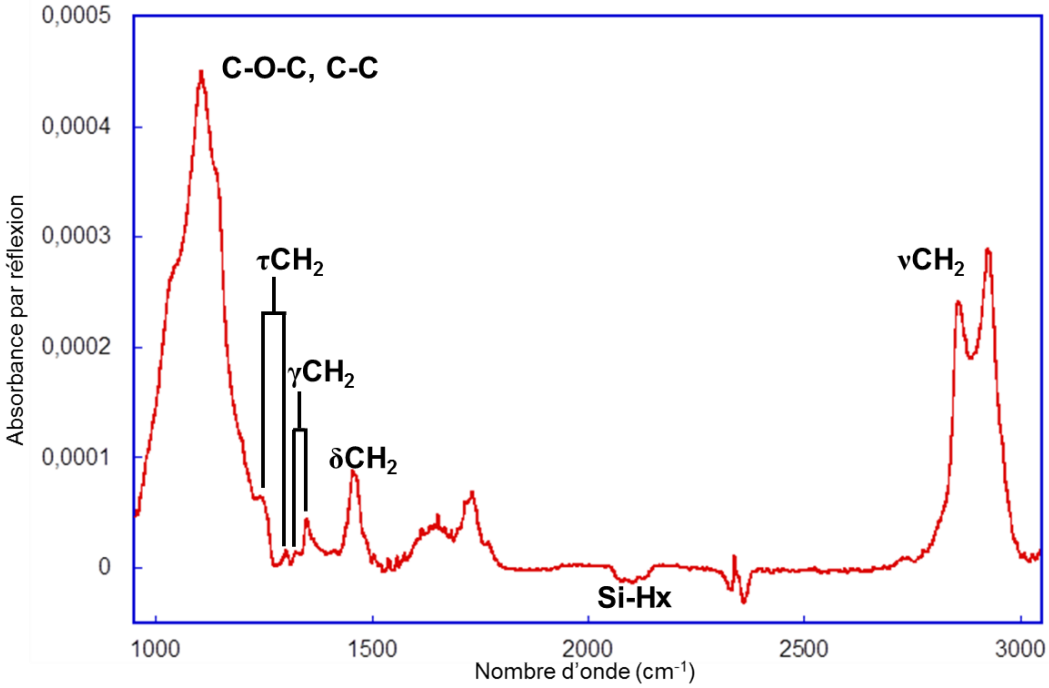

FIGURE 3.1 – Spectre infrarouge d'une surface greffée par des molécules $C_{11}(EG)_6OMe$, obtenue par greffage photochimique dans de l'heptane.

Nous avons également entrepris plusieurs greffages thermiques. Pour ces derniers, les greffages réalisés dans le mésitylène (voir figure 3.2) ont offert la meilleure densité de la couche et une bonne reproductibilité. Cependant on retrouve encore une importante contamination entre 1600 et 1800 cm^{-1} (figure 3.2), ainsi qu'une grande oxydation de la surface caractérisé par le pic à 1040 cm^{-1}. Cette grande oxydation était déjà présente sur les surfaces greffées thermiquement avec des molécules $H(EG)_nOMe$ et ceci nous a incité à délaisser cette voie de greffage pour se focaliser sur l'optimisation de greffages photochimiques.

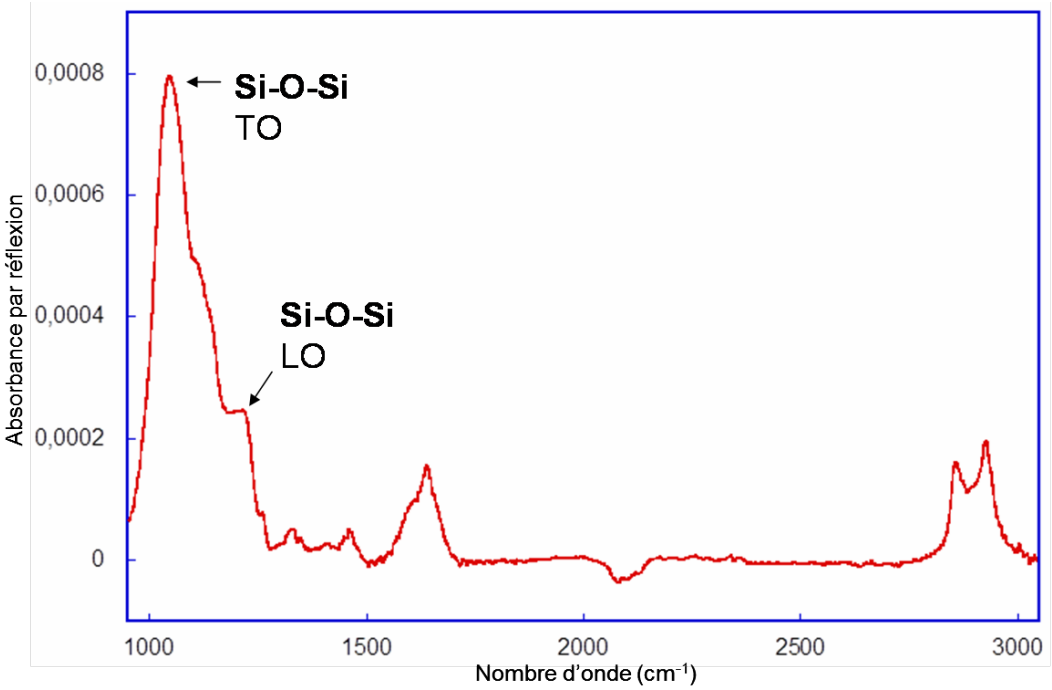

FIGURE 3.2 – Spectre infrarouge d'une surface greffée par des molécules $C_{11}(EG)_6OMe$, obtenue par greffage thermique dans du mésitylène.

Finalement les greffages photochimiques effectués dans du toluène distillé sur sodium-benzophénone se sont montrés à la fois aussi denses que les meilleurs greffages dans des alcanes mais aussi bien reproductibles. La figure 3.3 montre les spectres infrarouge de diverses molécules $C_p(EG)_nOMe$ obtenues par greffage photochimique dans du toluène distillé. Ces spectres infrarouge des surfaces obtenues par greffages photochimiques de $C_p(EG)_nOMe$ dans le toluène distillé ont les meilleurs caractéristiques de reproductibilité, propreté (pas de contamination vers 1600 et 1800 cm^{-1}) et densité de greffage de tous les greffages effectués. Il reste un pic large dans la région de l'oxyde (qui est aussi celle des liaisons C-O-C), mais d'amplitude moindre et qui ne montre plus de façon évidente d'un dédoublement LO/TO. Ce dédoublement des modes de vibrations des Si-O-Si est caractéristique d'un oxyde en quantité appréciable.

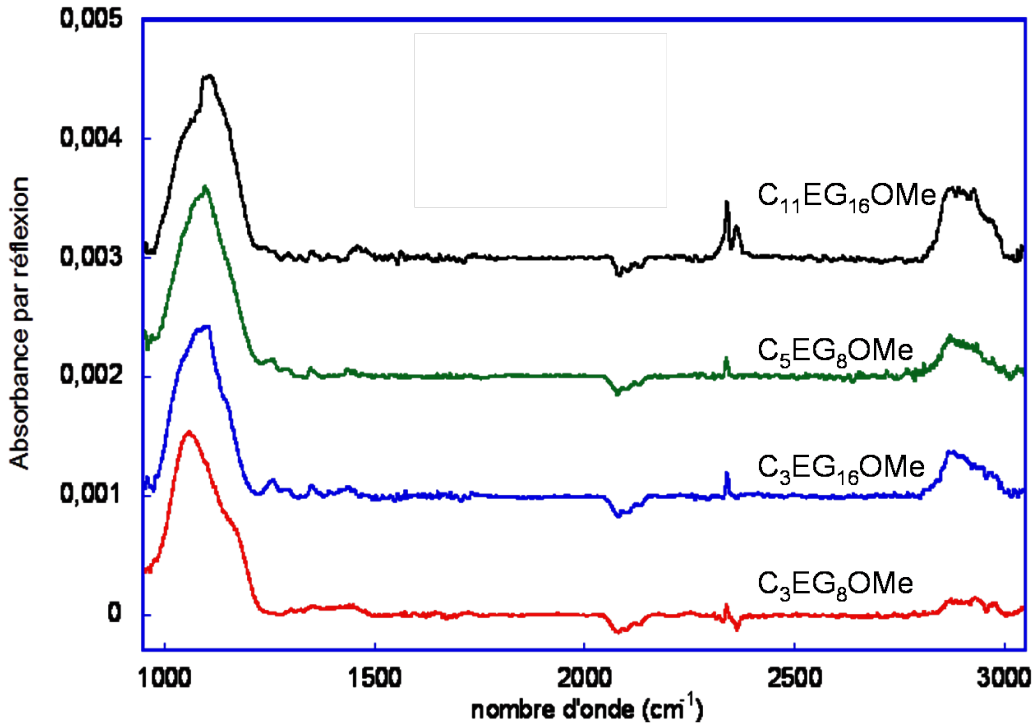

FIGURE 3.3 – Spectres infrarouge de surfaces greffées par différentes molécules $C_p(EG)_nOMe$, obtenues par greffage photochimique dans du toluène distillé.

3.4 Optimisation du rinçage

Une autre partie importante du protocole de greffage est le rinçage de la surface. Celui-ci permet d'éliminer toute impureté qui aurait pu se déposer sur la surface et qui pourrait en modifier les propriétés, ainsi que de se débarrasser des molécules de $C_p(EG)_nOMe$ physisorbées sur la surface. Les premiers rinçages que nous avons testés ont été ceux utilisés pour les $H(EG)_nOMe$ (voir section 1.3.2 du chapitre 1), c'est à dire dans l'éthanol qualité RSE (2 rinçages de 15 minutes à 65°C) et le dichlorométhane qualité HPLC (5 minutes à température ambiante) avant de sécher l'échantillon sous un flux d'azote. Ce rinçage est aussi celui utilisé par l'équipe de Cai [85] qui obtient les surfaces les plus efficaces contre l'adsorption non spécifique de protéines. Dans notre étude il est précédé par un rinçage de 15 minutes à 60°C dans le toluène, solvant du greffage. Une caractérisation par AFM permet de déterminer l'efficacité du rinçage en contrôlant la propreté de la surface et son homogénéité. Alors que ce rinçage $EtOH/CH_2Cl_2$ était très efficace pour les $H(EG)_nOMe$ (figure 1.10 dans le chapitre 1), son efficacité est moindre dans le cas des C_pEG_nOMe. La qualité des surfaces obtenues n'est en effet que peu reproductible. La figue 3.4 montre des images AFM de deux surfaces greffées par des molécules $C_5(EG)_6OMe$ obtenues par greffage dans le toluène et rincées selon la méthode décrite précédemment. Alors que l'image (a) montre une surface propre avec peu de résidus et que l'on peut y voir la structure en marche d'escalier de la surface de silicium sous-jacente, la surface de l'image (b) est couverte de résidus indésirables. Ces résidus peuvent être des impuretés présentes dans le Schlenk lors du greffage ou associées à des micelles dues à des hétérogénéités de la solution de $C_p(EG)_nOMe$ qui s'adsorberaient sur la

surface au cours du greffage. Ces résidus adhèrent suffisamment à la surface pour ne pas être ôtés par les rinçages, mais suffisamment peu pour être entraînés par la pointe AFM comme le montre l'existence de traînées sur l'image (b). Ces images ont été enregistrées en mode contact et ces traînées (lorsqu'elles sont présentes) sont observées même lorsqu'on applique la force la plus faible possible à la pointe. Elles ne sont plus présentes lors du deuxième balayage, ce qui implique bien que la pointe AFM les a entraînées lors du premier balayage.

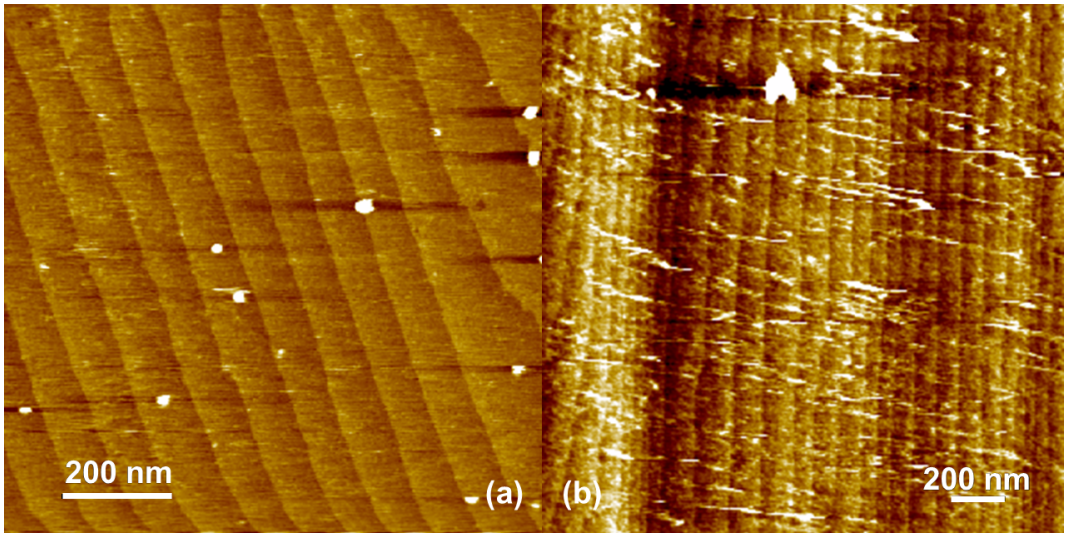

FIGURE 3.4 – Images AFM de surfaces greffées par des molécules $C_5(EG)_6OMe$ après rinçage $EtOH/CH_2Cl_2$.

La difficulté du rinçage provient du caractère amphiphile des $C_p(EG)_nOMe$ et bien que le toluène solubilise ces molécules et que l'éthanol soit connu comme étant miscible avec les phases aqueuses et organiques, ce rinçage n'est pas idéal. Même s'il peut engendrer de belles surfaces, son efficacité est variable et dépend de facteurs que nous ne contrôlons pas dans notre étude. Il a donc fallu trouver d'autres solvants qui permettraient d'obtenir à chaque rinçage des surfaces propres.

La première étape de rinçage dans le toluène a toutefois été conservée car elle permet de faire une transition douce entre la solution de greffage et les différents solvants de rinçage. La figure 3.5 montre des images de surfaces greffées par des molécules $C_5(EG)_6OMe$ qui ont par la suite été rincées dans du THF (15 minutes à température ambiante) (a), du décanol (15 minutes à 100°C) (b) ou de l'eau (15 minutes à 90°C) (c). L'échantillon est ensuite séché sous flux d'azote. Aucune de ces surfaces n'est propre et ces rinçages ne semblent donc pas plus efficaces que celui initialement testé.

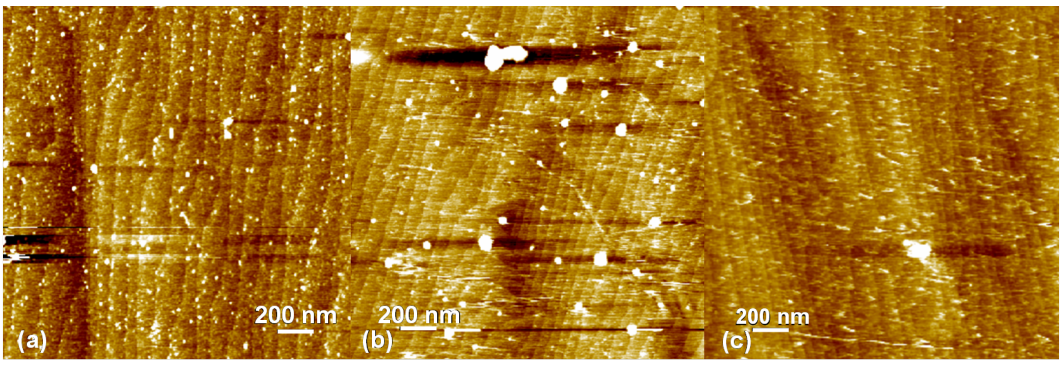

FIGURE 3.5 – Image AFM de surfaces greffées par des molécules $C_5(EG)_6OMe$ après rinçage THF (a), décanol (b) et eau (c).

Des dérivées de l'éthylène glycol (le tétra(éthylène glycol) diméthyl éther et le di(éthylène glycol) diméthyle éther, appelé diglyme) ont ensuite été testés et les conclusions sont similaires à celles tirées pour le rinçage $EtOH/CH_2Cl_2$. En effet, ces rinçages permettent parfois d'obtenir des surfaces très propres et homogènes mais ne sont pas toujours reproductibles. La figure 3.6 montre des images AFM de deux surfaces greffées par des molécules $C_5(EG)_6OMe$ obtenues dans le mêmes conditions après rinçages dans le diglyme. Ces solutions semblent donc très efficaces comme le témoigne l'image (a) mais encore une fois, le problème vient de la répétabilité des résultats (image (b)).

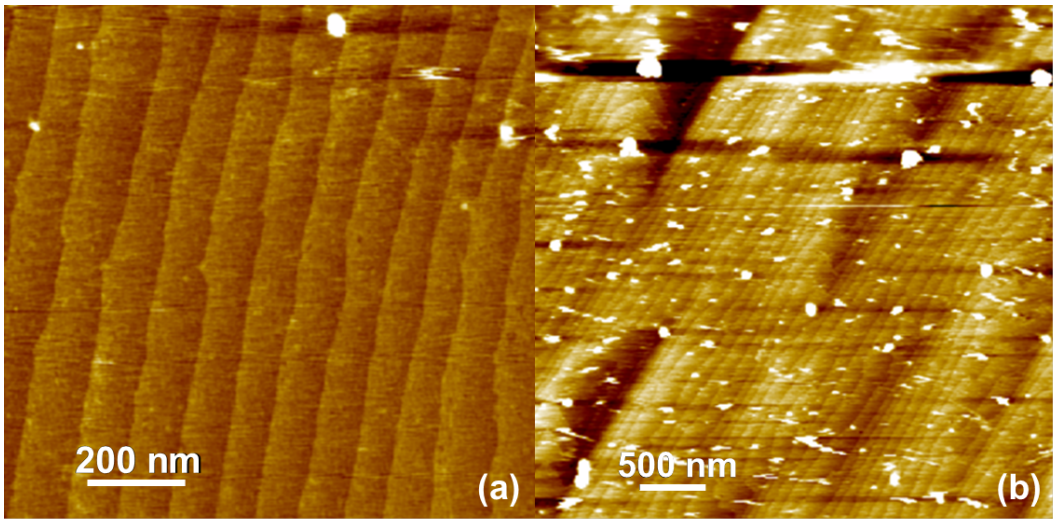

FIGURE 3.6 – Images AFM de surfaces greffées par des molécules $C_5(EG)_6OMe$ après rinçage dans le diglyme.

Finalement, le caractère amphiphile de nos molécules nous a amenés à penser qu'une solution de SDS (sodium dodécyl sulfate), un surfactant puissant pouvait être efficace pour détacher des résidus amphiphiles adsorbés sur les surfaces. La figure 3.7 montre des images AFM d'une surface greffée par des molécules $C_5EG_{16}OMe$ rincée avec $EtOH/CH_2Cl_2$ (a) puis rincée dans une solution saline de SDS (0.1% de SDS

dans du PBS 1X) pendant 5 minutes. Afin de diminuer progressivement la salinité de la solution, l'échantillon est ensuite rincé dans du PBS 0.2X puis 0.1X pendant 1 minute, avant d'être copieusement rincé à l'eau pour enlever toute trace de sels, et séché sous flux d'azote (b). Les surfaces obtenues suivant ce protocole de rinçage sont toujours dépourvues de résidus et apparaissent bien homogènes. On peut y voir la structure en marches d'escalier sous-jacente. Le rinçage PBS/SDS semble très efficace pour retirer les quelques résidus présents sur la surface. Cependant des caractérisations réalisées sur des surfaces rincées directement dans la solution saline après greffage ont montré qu'il reste nécessaire de réaliser au préalable les rinçages dans le toluène, l'éthanol et le dichlorométhane.

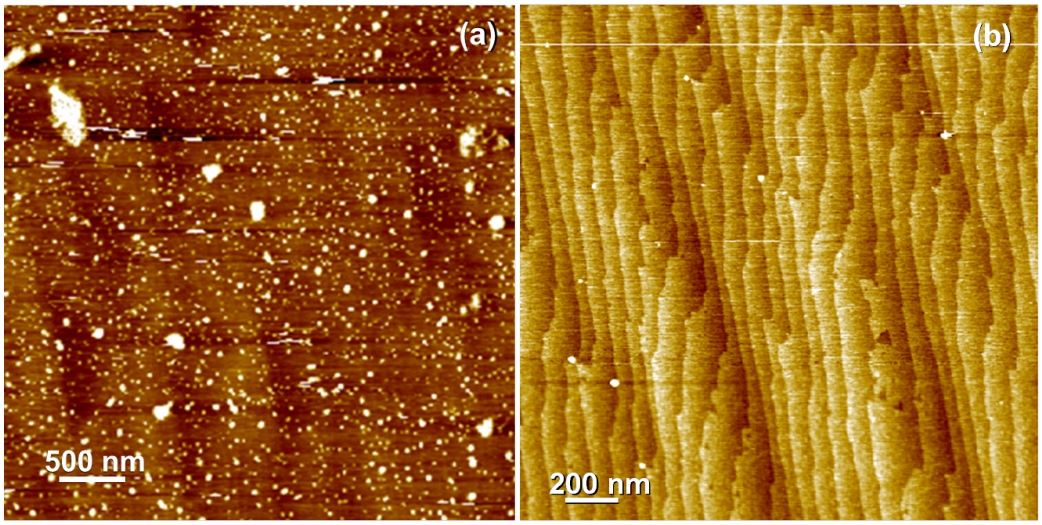

FIGURE 3.7 – Images AFM d'une surface greffée avec des molécules $C_5(EG)_{16}OMe$ après le rinçage standard $EtOH/CH_2Cl_2$ (a), puis rincé dans la solution saline des SDS (b).

La figure 3.8 montre les spectres infrarouge d'une surface greffée avec des molécules $C_5(EG)_{16}OMe$ rincée avec $EtOH/CH_2Cl_2$ avant et après le rinçage dans la solution saline de SDS. On observe une diminution de l'intensité de la plupart des pics présents, ce que l'on peut corréler avec les résidus retirés par le rinçage salin.

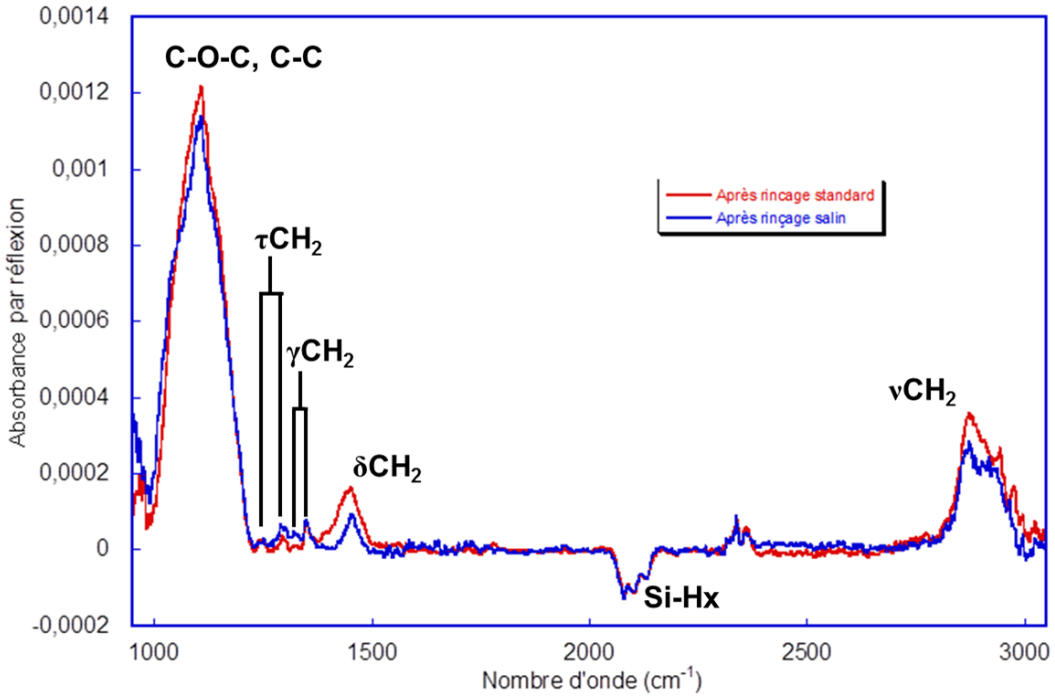

FIGURE 3.8 – Spectres infrarouge d'une surface greffée avec des molécules $C_5(EG)_{16}OMe$ avant et après rinçage salin.

3.5 Protocole retenu

Le protocole d'obtention de couches moléculaires $C_p(EG)_nOMe$ sur silicium par voie photochimique est le suivant :

La solution de greffage est constituée de 0.1 mol.L^{-1} de précurseur $C_p(EG)_nOMe$ dans du toluène distillé sous Na-benzophénone. Cette solution est introduite dans un Schlenk et dégazée à 70°C pendant 10 minutes. Pendant ce temps, on prépare une surface de silicium hydrogénée (voir chapitre 1) puis on l'introduit dans le Schlenk refroidi à température ambiante. On continue le dégazage pendant 15 minutes avant de placer le Schlenk sous irradiation UV (λ=312 nm, 6 mW.cm^{-2}) pendant 3 heures.

L'échantillon est ensuite sorti du Schlenk, introduit dans un porte échantillon et rincé pendant 15 minutes dans du toluène distillé à 65°C. On procède ensuite à deux rinçages de 15 minutes à 65°C dans l'éthanol de qualité RSE et à un rinçage de 5 minutes à température ambiante dans du dichlorométhane HPLC. L'échantillon est ensuite rincé dans une solution de 0.1% de SDS dans du PBS 1X pendant 5 minutes, puis dans du PBS 0.2X pendant 1 minute et du PBS 0.1X pendant 1 minute avant d'être copieusement rincé à l'eau ultra pure (MilliQ, 18,2MΩ.cm) et séché sous flux d'azote.

Ceci permet d'obtenir des greffages reproductibles de couches moléculaires de $C_p(EG)_nOMe$ uniformes sur la surface et sans impuretés.

3.6 Caractérisation infrarouge

Les spectres infrarouge des surfaces avec différentes molécules greffées possèdent les pics caractéristiques des chaînes alkyles et PEG [80] :

- L'élongation des liaisons C-O et C-C est caractérisée par une pic intense vers 1104-1110 cm^{-1} qui connait des épaulements en 1040 cm^{-1} et 1140 cm^{-1}. L'épaulement en 1040 cm^{-1} est souvent caché derrière les pics de l'oxydation de la surface mais est visible sur les figures 3.1 et 3.3.
- La déformation symétrique dans le plan ("rocking") du méthyle terminal à 1200 cm^{-1}.
- La déformation antisymétrique hors du plan ("twist") des CH_2 de la chaîne PEG vers 1247 cm^{-1} et 1296 cm^{-1}, correspondant à la polarisation parallèle et perpendiculaire à l'axe de la molécule PEG. .
- La déformation symétrique hors du plan ("wag") des CH_2 de la chaîne PEG est aussi caractérisé par plusieurs pics. Celui à 1325 cm^{-1} est d'intensité faible et correspond à la configuration "trans" tandis que celui à 1350 cm^{-1} correspond à la configuration gauche.
- Les déformations antisymétriques dans le plan ("scissor") des CH_2 de la chaîne PEG et de la chaîne alkyle viennent se superposer formant au final un pic assez large vers 1465 cm^{-1}.
- Les élongations des CH_2 des chaînes alkyles et PEG se situent dans la zone 2800-3000 cm^{-1}. Cette zone, dont l'analyse sera détaillée ci-après, a une allure différente selon le rapport des longueurs des chaînes alkyles et PEG. On voit en effet deux formes très différentes pour une surface greffée avec des molécules $C_{11}(EG)_6OMe$ (figure 3.1) ou $C_{11}(EG)_{16}OMe$ (figure 3.3).

Différents pics sont attendus dans la zone 2800-3000 cm^{-1} (figure 3.9) [80] :

- L'élongation symétrique des -OCH_3 ($\nu_s OCH_3$) à 2820 cm^{-1}.
- Les élongations symétriques et antisymétriques des CH_2 ($\nu_s OCH_2$ et $\nu_{as} OCH_2$) des chaînes PEG à 2875 et 2935-40 cm^{-1} respectivement.
- Les élongations symétriques et antisymétriques des CH_2 ($\nu_s CH_2$ et $\nu_{as} CH_2$) des chaînes alkyles à 2855 et 2925 cm^{-1} respectivement.
- L'élongation antisymétrique des -OCH_3 ($\nu_{as} OCH_3$) à 2980 cm^{-1}. Comme indiqué dans le chapitre 1, ce pic est parfois difficilement observable et a par conséquent été négligé lors des ajustements.

Les positions des pics observées dans la zone 1000-1500 cm^{-1} sont indiscernables de celles du spectres de PEG liquide ou des couches moléculaires de $H(EG)_nOMe$ obtenues dans le chapitre 1, ce qui suggère de nouveau une configuration amorphe des molécules sur la surface. Ceci est confirmé par les positions des pics d'élongation des CH_2 ($\nu_{as} CH_2$ à 2925 cm^{-1}) qui suggèrent une structure désordonnée de la chaîne alkyle.

La figure 3.9 montre les spectres, dans la zone des pics d'élongation des CH_2, des surfaces greffées avec les différents $C_p(EG)_nOMe$.

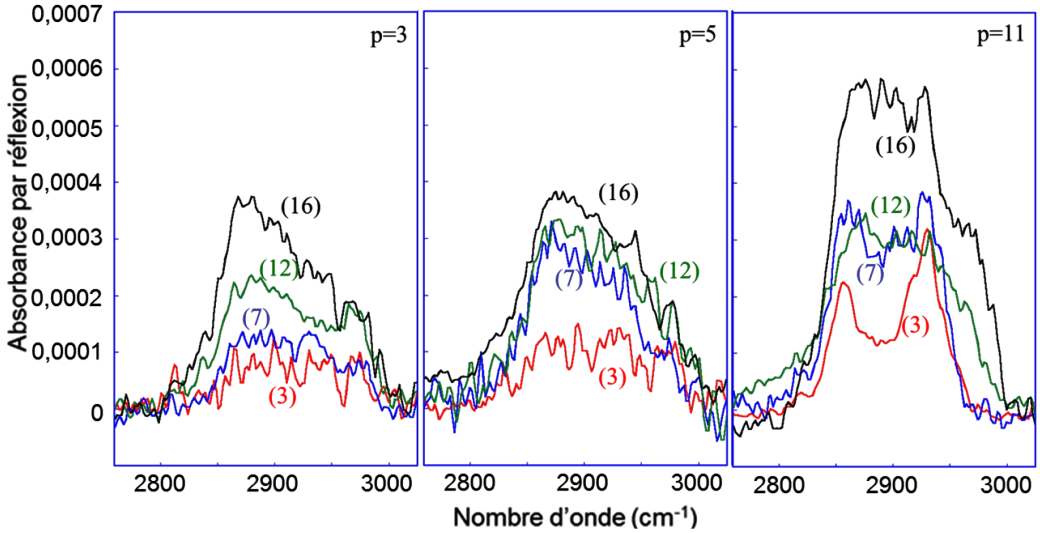

FIGURE 3.9 – Détail, dans la zone 2800-3000 cm^{-1} des spectres des diverses couches moléculaires $C_p(EG)_nOMe$ greffées. Chaque série de spectres correspond à une valeur de p, et la valeur de n est notée à coté de chaque spectre.

On peut observer que pour de faibles valeurs de p et de grandes valeurs de n, on retrouve des formes similaires à celles observées pour les couches moléculaires obtenus par le greffages des molécules PEG commerciales (chapitre 1). En revanche, en particulier pour p=11, on peut voir l'influence de la présence de la chaîne alkyle sur le signal de cette zone.

La présence de ces deux contributions distinctes (celle des PEG et celle des chaînes alkyles) dans la région 2800-3000 cm^{-1} rend plus difficile que précédemment la détermination de la concentration en molécules greffées à partir de l'intensité des vibrations d'élongation des groupements CH_2 et CH_3.

L'ajustement d'une zone large contenant de très nombreux pics peut être réalisé de plusieurs manières très différentes. Il s'agit donc de trouver un critère qui permette de maintenir la réalité physique du signal obtenu afin de s'assurer de la pertinence de l'ajustement.

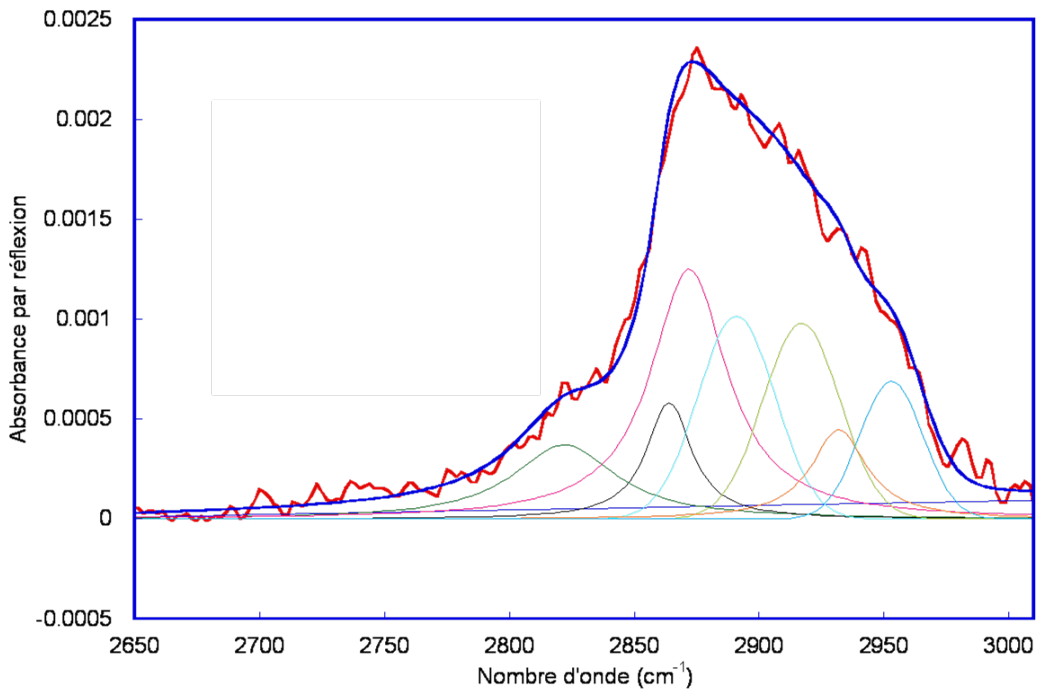

FIGURE 3.10 – Ajustement de la zone des pics d'élongation des CH_2 du spectre obtenu lors de la calibration de $C_5(EG)_8OMe$.

Comme il a été fait pour l'évaluation de la densité de molécules $H(EG)_nOMe$ dans le chapitre 1, l'ajustement de cette zone est réalisé à partir de fonctions pseudo-Voigt centrées sur les pics identifiés (figure 3.10). Les pics correspondant aux élongations des CH_2 de la chaîne PEG sont similaires à ceux utilisés pour l'ajustement des surfaces greffées par les molécules $H(EG)_nOMe$. Le fait d'utiliser ces cinq pics, et d'en rajouter deux correspondant à ceux identifiés aux élongations des CH_2 de la chaîne alkyle, permet la décomposition du signal en deux parties distinctes : la contribution de la chaîne alkyle et celle de la chaîne PEG. Obtenir un ajustement correct est un problème multiparamétrique et il y aura toujours des doutes quant à l'unicité de la solution trouvée et la fiabilité dans la détermination de la part attribuée aux chaînes PEG et aux chaînes alkyles. Nous allons donc adopter une autre approche en considérant l'intégrale de l'ensemble de la bande d'élongation, c'est à dire le signal infrarouge total abs_s^0. Si les contributions des chaînes PEG et alkyles à l'absorption dans la gamme 2800-3000 cm^{-1} sont respectivement proportionnelles au nombre p de groupements méthylènes dans la chaîne alkyle et au nombre n de groupement éthylèn glycol dans la chaîne PEG, le signal infrarouge intégré s'écrit selon l'équation 3.1,

$$abs_s^0 = A \times n + B \times p \tag{3.1}$$

A et B représentent donc respectivement la contribution de la chaîne PEG et celle de la chaîne alkyle au signal total observé dans la zone 2800-3000 cm^{-1}. On doit donc pouvoir obtenir A et B tels que,

$$\frac{abs_s^0}{n} = A + B \times \frac{p}{n} \tag{3.2}$$

pour toutes valeurs de n et p. Or, les valeurs de n et p sont a priori connues, car ce sont celles du précurseurs utilisé pour le greffage. La figure 3.11 montre les points obtenus par l'intégration dans l'intervalle 2800-3000 cm^{-1} des signaux obtenus lors des calibrations des molécules suivantes (C=0.1M soit 6,02.10^{19} molécules.cm^{-3}) :

- PEG350 ($\frac{p}{n}$=0)
- PEG550 ($\frac{p}{n}$=0)
- PEG750 ($\frac{p}{n}$=0)
- $C_3(EG)_{10}OMe$ ($\frac{p}{n}$=0.3)
- $C_5(EG)_{16}OMe$ ($\frac{p}{n}$=0.3125)
- $C_3(EG)_8OMe$ ($\frac{p}{n}$=0.375)
- $C_5(EG)_8OMe$ ($\frac{p}{n}$=0.625)
- $C_5(EG)_6OMe$ ($\frac{p}{n}$=0.8333)
- $C_{11}(EG)_8OMe$ ($\frac{p}{n}$=1.375)

Ces points sont très bien ajustés par la relation linéaire,

$$\frac{abs_s^0}{n} = 0.026 + 0.0088 \times \frac{p}{n}. \tag{3.3}$$

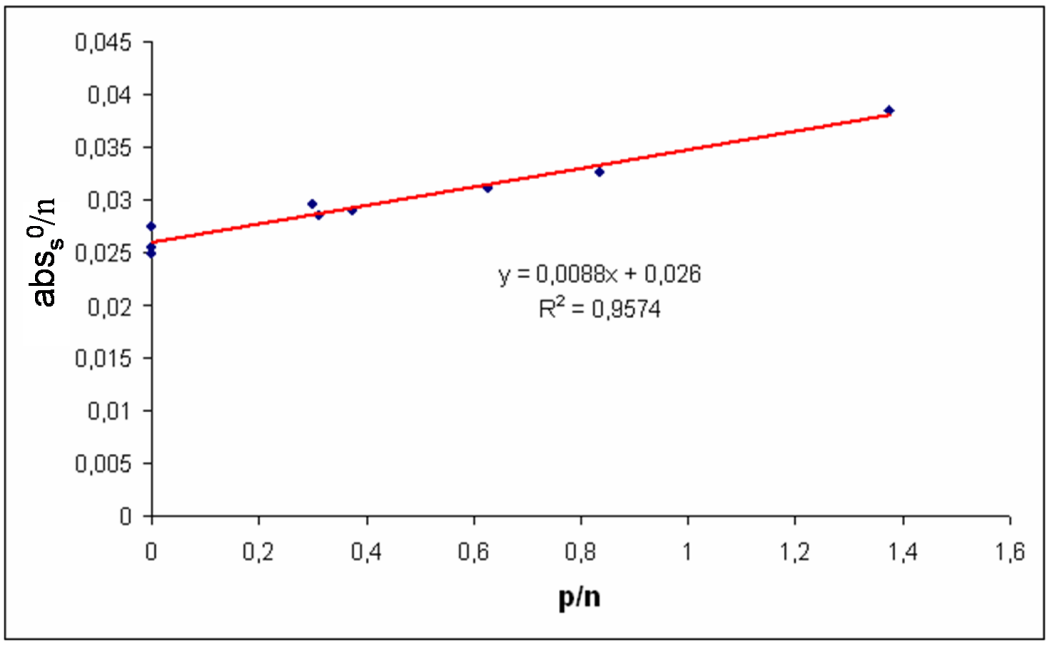

FIGURE 3.11 – Détermination de la relation entre intensité intégrée du signal infrarouge de la zone 2800-3000 cm^{-1} et longueurs des chaînes alkyles (p) et PEG (n).

Cette relation linéaire montre bien que les contributions des chaînes PEG et alkyles au signal infrarouge total ne dépendent que de la longueur de ces chaînes. Le découplage permet de s'affranchir de la nécessité de réaliser la calibration de l'ensemble de nos molécules car les valeurs de abs_s^0 peuvent être déduite de l'équation 3.1 pour toute valeur de n et de p. Pour les surfaces greffées, il n'est alors plus nécessaire de réaliser un ajustement en utilisant les différents pics montrés sur la figure 3.10. Seule l'intégrale totale du signal de la zone est requise. A titre indicatif, et de manière peut être heureuse mais réconfortante, l'ajustement par 5+2 profils de

Voigt de la forme du spectre fournit des valeurs pour A et B très proches de celles déterminées par la méthode ci-dessus.

On peut maintenant reprendre les équations permettant de déterminer la densité de molécules sur la surface obtenues dans le chapitre 1,

$$N_{\parallel} = \frac{abs_s}{abs_s^0}\frac{I_y^0}{I_y}\frac{C}{3}\delta \tag{3.4}$$

$$N_{\perp} = \frac{C}{3} \times \frac{\delta}{2}\frac{I_y^0}{I_y}\frac{I_y abs_p - I_x abs_s}{abs_s^0 \times I_z \times \frac{1}{\epsilon_z'^2}} \tag{3.5}$$

pour déterminer celles permettant de remonter à la densité de molécules sur la surface :

$$N_{\parallel} = 6,06.10^{14}\frac{1}{abs_s^0}abs_s \tag{3.6}$$

$$N_{\perp} = 5,80.10^{14}\frac{1}{abs_s^0}(2,07abs_p - 1,88abs_s) \tag{3.7}$$

Dans ces équations, les différentes valeurs de abs_s^0, correspondant aux différentes molécules greffées, peuvent être obtenues à partir de l'équation 3.1 et des expériences de calibration regroupées dans la figure 3.11. Ces valeurs et les densités de molécules moyennes déduites sur les surfaces greffées sont regroupées dans le tableau 3.1

Molécule	abs_s^0	Densité de molécules moyennes
$C_3(EG)_3OMe$	0,104	$6,34.10^{13}$ (8.1%)
$C_3(EG)_7OMe$	0,208	$7,20.10^{13}$ (9.2%)
$C_3(EG)_{12}OMe$	0,338	$6,66.10^{13}$ (8.5%)
$C_3(EG)_{16}OMe$	0,442	$7,67.10^{13}$ (9.8%)
$C_5(EG)_3OMe$	0,122	$1,05.10^{14}$ (13.4%)
$C_5(EG)_7OMe$	0,226	$1,26.10^{14}$ (16.1%)
$C_5(EG)_{12}OMe$	0,356	$1,16.10^{14}$ (14.8%)
$C_5(EG)_{16}OMe$	0,460	$1,09.10^{14}$ (13.9%)
$C_{11}(EG)_3OMe$	0,175	$1,12.10^{14}$ (14.3%)
$C_{11}(EG)_7OMe$	0,279	$1,24.10^{14}$ (15.8%)
$C_{11}(EG)_{12}OMe$	0,409	$1,18.10^{14}$ (15.1%)
$C_{11}(EG)_{16}OMe$	0,513	$1,15.10^{14}$ (14.7%)

TABLE 3.1 – Valeurs calculées de abs_s^0 et de la densité de molécules sur différentes surfaces $C_p(EG)_nOMe$.

La détermination de la concentration en espèces greffées a mis en évidence que les molécules $C_p(EG)_nOMe$ se greffent moins bien lorsque les chaînes alkyles sont très courtes (p=3). En plus d'une oxydation plus importante (figure 3.3), ces surfaces sont aussi caractérisées par une densité de greffage moindre, indépendamment de la longueur de la chaîne PEG.

Pour p > 3, la densité moyenne constatée est d'environ 1,1.10^{14} molécules.cm^{-2}. Ces valeurs sont significativement inférieures à celles obtenues avec le greffage des H(EG)$_n$OMe pour lesquels on trouvait un taux de recouvrement d'environ 25% (2.10^{14} molécules.cm^{-2}). Ceci peut en partie être imputé à la différence de concentration des solutions C$_p$(EG)$_n$OMe et H(EG)$_n$OMe utilisées pour le greffage. En effet, alors que les H(EG)$_n$OMe commerciaux ont été greffés purs, les C$_p$(EG)$_n$OMe sont dilués à 0.1M. Afin d'évaluer l'importance de cette différence, le greffage de PEG550 dilué à 0.1M à été réalisé. Le taux de recouvrement pour ce greffage est de 13% (1,0.10^{14} molécules.cm^{-2}) ce qui montre bien que la dilution de la solution de greffage a un impact sur la quantité de molécules greffées. Les valeurs d'environ 3,1.10^{14} molécules.cm^{-2} mesurées par Gooding et al. sur ses surfaces [144] ont été obtenues par des greffages thermiques à 200°C dans une solution de 1,3,5-triéthylbenzène contenant 0.2M de C$_{11}$(EG)$_3$OMe. Pour limiter l'oxydation de surface, causée par les traces d'eau attendues autour des groupements éthylène glycol, la solution est mélangée avec du sodium, redistillé sous pression réduite et stockée sur tamis moléculaire dans une atmosphère d'argon. Les différences de protocoles et l'utilisation d'une molécule à longue chaîne alkyle et courte chaîne PEG peuvent expliquer les différences de densité des couches obtenues.

3.7 Stabilité au vieillissement

L'intérêt principal de l'utilisation des molécules C$_p$(EG)$_n$OMe par rapport aux H(EG)$_n$OMe disponibles commercialement est d'assurer une plus grande stabilité de la couche moléculaire obtenue. En effet, les surfaces où l'on a greffé les molécules H(EG)$_n$OMe s'hydrolysent et ne sont donc pas utilisables en solution aqueuse dont font partie les milieux biologiques d'intérêt. Les études antérieures de greffages d'alcènes sur silicium ont indiqué la grande stabilité des couches formées dans une vaste gamme de conditions, au moins quand la concentration superficielle des chaînes greffées est suffisante [85; 138].

Afin de tester la stabilité de nos couches, nous avons donc laissé nos échantillons vieillir dans différentes conditions. Les signaux infrarouge attestent qu'il n'y a ni disparition du signal PEG ni augmentation de celui de l'oxyde lorsque les échantillons sont vieillis à l'air et à la lumière pendant plusieurs semaines. Ceci est aussi vrai quand l'échantillon est stocké dans de l'eau pendant au moins 8 jours pour tous les échantillons testés (C$_{11}$(EG)$_6$OMe, C$_5$(EG)$_6$OMe, C$_5$(EG)$_{12}$OMe et C$_5$(EG)$_{16}$OMe). Le stockage sous atmosphère inerte et/ou à l'obscurité n'altère pas lui non plus les couches organiques mais les résultats précédents montrent que cette précaution n'est pas nécessaire. La chaîne alkyle joue donc bien son rôle de passivation de la surface.

3.8 Conclusion

La détermination des solvants et des rinçages appropriés ont permis l'obtention reproductible de surfaces C$_p$(EG)$_n$OMe exemptes de tout défaut. L'utilisation du toluène permet de solubiliser l'ensemble des molécules indépendamment de la longueur

de leur chaîne alkyle et PEG, et les rinçages dans le toluène, l'éthanol, le dichlorométhane puis dans le solution saline de SDS permettent de retirer de la surface tous les résidus qui s'y déposent pendant le greffage afin d'obtenir une surface $C_p(EG)_nOMe$ uniforme. Le rendement des greffages obtenus dans des solutions à 0.1M est reproductible et dépend de la longueur de la chaîne alkyle. Il est plus faible que celui obtenu pour les molécules commerciales $H(EG)_nOMe$ purs mais cohérent avec celui obtenu pour des greffages dans les mêmes conditions. De plus, l'ensemble des surfaces obtenues par le greffage de $C_p(EG)_nOMe$ est stable que ce soit à l'air ou dans l'eau. Ce sont donc des surfaces utilisables en milieu biologique et leur efficacité pour limiter l'adsorption non spécifique de protéines est étudiée dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Etude de la capacité des surfaces $C_p(EG)_nOMe$ à limiter l'adsorption non spécifique de protéines

4.1 Introduction

Dans ce chapitre nous allons évaluer l'efficacité des surfaces greffées avec nos différentes molécules $C_p(EG)_nOMe$ vis-à-vis de l'adsorption non spécifique de protéines. Dans le chapitre 1, nous avons vu sur les surfaces fonctionnalisées par $H(EG)_nOMe$ que des chaînes PEG plus longues étaient plus efficaces pour limiter l'adsorption non spécifique de protéines. Ceci a aussi été observé par les équipes de Cai et d'Hamers sur des $C_{11}(EG)_nOMe$ avec n variant de 3 à 9 [87; 143]. Notre étude permettra de voir si cet effet s'étend pour des chaînes encore plus longues (jusqu'à 16). Notre étude permettra aussi d'évaluer l'influence de la longueur de la chaîne alkyle pour des valeurs de p de 0 (chapitre 1), 3, 5 et 11. En effet, aucune étude n'a été entreprise sur l'influence de la longueur de la chaîne alkyle : les travaux des équipes de Cai, Hamers et Gooding ont tous été réalisés dans le cas $p = 11$ [81; 85–88; 142; 143].

L'importance du rinçage de la surface sera également évaluée. Il a été montré au chapitre 3 que le rinçage de la surface dans une solution saline de SDS après greffage des molécules permet de retirer les résidus (contamination et micelles de $C_p(EG)_nOMe$) qui restent sur la surface. L'influence de la présence de ces résidus sera évaluée. Pour cela, les tests d'adsorption non spécifique de protéines ont été réalisés à la fois sur des surfaces n'ayant subi que le rinçage éthanol/dichlorométhane, et d'autres ayant subi un rinçage supplémentaire dans la solution saline de SDS comme décrit dans la section 3.5.

Comme précédemment (chapitre 1), la protéine initialement utilisée est la BSA et l'évaluation s'appuie sur la spectroscopie infrarouge. Notre étude a aussi été élargie à d'autres protéines (fibrinogène, streptavidine, thrombine) en utilisant des couches moléculaires greffées sur des couches minces de silicium amorphe carboné permettant une étude par fluorescence. Ceci permet de tester les propriétés de nos surfaces au

contact de protéines aux spécificités variées.

4.2 Comparaison de l'efficacité des différentes surfaces

4.2.1 Protocole expérimental

L'efficacité des différentes surfaces obtenues dans le chapitre 3 a été testée selon le protocole suivant :

- La surface greffée est rincée dans le toluène distillé (15 min, 65°C), deux fois dans l'éthanol (qualité RSE) à 65°C pendant 15 minutes puis pendant 5 minutes dans le dichlorométhane (qualité HPLC) à température ambiante.
- L'échantillon est plongé dans une solution de BSA (1 mg.mL^{-1}) dans du PBS 1X pendant une heure.
- L'échantillon est ensuite retiré de la solution, rincé 10 secondes dans du PBS 1X puis 2 minutes à l'eau ultrapure.

La surface est ensuite caractérisée par mesure d'angle de contact et par spectroscopie infrarouge ou microscopie à force atomique. De la même manière que dans le chapitre 1, la capacité de nos surfaces à limiter l'adsorption non spécifique des protéines est comparée à celle de surfaces décylées.

Il faut d'ores et déjà noter que, dans un premier temps et conformément au protocole décrit ci dessus, les performances des couches moléculaires ont été évaluées dans des conditions non optimales. En effet, à ce stade, le rinçage optimisé décrit au chapitre 3 n'a pas été utilisé. Nous reviendrons sur ce point plus tard dans ce chapitre.

4.2.2 Caractérisation par angle de contact

Les angles de contact d'une goutte d'eau sur les différentes surfaces ont été mesurés avant et après passage dans la solution de BSA. Ceci devrait nous donner une première indication quant au changement d'hydrophilicité de la surface dû à la présence de protéines adsorbées. Cai et al. ont mesuré des valeurs de 49° et 46° pour les angles de contact à l'avancée et au retrait sur une surface greffée avec du $C_{11}(EG)_7OMe$ [85] et n'ont pas observé de changement significatif après passage dans leur solution de protéines. On trouve aussi deux études mentionnant les angles de contact d'une goutte d'eau sur des surfaces d'or fonctionnalisées par des PEG terminés par un groupement méthyle. Prime et Whitesides [76] ont mesuré un angle à l'avancée d'environ 48° (pour n = 6) alors que Herrweth et al. [81] l'ont mesuré à 67° sur leurs surfaces, indépendamment de la longueur de la chaîne PEG (n = 1, 2, 3 et 6). Gooding et al. [88] ont mesuré un angle à l'avancée et au retrait de 47° et 40° et un angle statique de 45° sur des surfaces de silicium fonctionnalisées par des PEG (n = 4) terminés par un alcool et Whitesides et al. ont fait de même (n = 3) sur des surfaces d'or et trouvent un angle à l'avancée de 54° dans une étude [73] et 38° dans une autre [75], indépendamment de la longueur de la chaîne PEG (n = 3, 4, 5, 6, 7). Herrwerth et al. rapportent des valeurs d'environ 35° pour les angles à l'avancée pour des surfaces $(EG)_nOH$ sur or et argent, indépendamment de n (n = 2, 3, 6). Il est intéressant de noter qu'il ne semble pas y avoir plus de différences entre les surfaces

où ont été greffées des PEG méthylés et celles où ont été greffées des PEG terminés par un alcool qu'entre les surfaces d'or et de silicium ayant été fonctionnalisées avec le même type de molécules, ou qu'entre certaines études des mêmes molécules entre elles. Ceci peut être dû aux méthodes employées pour obtenir ces angles à l'avancée (voir annexe D).

Dans notre étude, nous avons mesuré l'angle de contact statique (θ) d'une goutte d'eau sur nos surfaces après rinçage à l'éthanol et au dichlorométhane. Nous avons trouvé que pour toutes nos surfaces celui-ci est compris entre 45° et 60° avec peu de différence selon la nature de la couche organique greffée. Il semble cependant que les surfaces ayant été greffées avec des $C_p(EG)_nOMe$ ayant un rapport n/p élevé soient plus hydrophiles, θ se rapprochant de la valeur de 36° obtenue pour une surface greffée par $H(EG)_nOMe$ dans le chapitre 1. Globalement, l'angle de contact s'avère pour les couches moléculaires étudiées ici, comme un moyen rapide mais assez rustique pour caractériser la surface. La seule tendance indiscutable est que les surfaces greffées par des molécules $C_p(EG)_nOMe$ sont plus hydrophobes que celles fonctionnalisées par $H(EG)_nOMe$. La plus grande hydrophilicité des couches greffées avec des molécules possédant une chaîne alkyle courte est compatible avec cette tendance. Cependant, en particulier pour les surfaces greffées avec des $C_3(EG)_nOMe$, l'oxydation de la surface peut aussi expliquer cette plus grande hydrophilicité.

Les angles de contact ont aussi été mesurés après le passage des surfaces dans la solution de BSA. On ne note pas de variations notables ($\Delta\theta \leq 5°$). Ceci suggère que la surface n'a pas été modifiée par le passage dans la solution de BSA mais d'autres méthodes de caractérisation sont bien entendu nécessaires pour s'en assurer.

4.2.3 Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Par construction, les protéines sont riches en liaisons amides correspondant au couplage peptidique entre acides aminés. Cela permet comme au chapitre 1 d'obtenir un dosage de la quantité de protéines adsorbées sur la surface par intégration des pics amides I et II apparaissant à 1650 cm^{-1} et 1550 cm^{-1}. Ceci permet d'évaluer quantitativement la résistance à l'adsorption non spécifique des protéines conférée par les différentes couches moléculaires greffées.

La figure 4.1 montre la zone 1475-1800 cm^{-1} des spectres infrarouge de surfaces greffées par différentes molécules $C_p(EG)_nOMe$ après exposition à la BSA. Le tableau 4.1 regroupe les valeurs de la quantité de BSA déduites par l'intégration des pics amides et normalisées par l'intégration des pics obtenus sur la surface décylée. La figure 4.2 représente les mêmes données obtenues pour les différentes molécules $C_p(EG)_nOMe$, en fonction de n et de p.

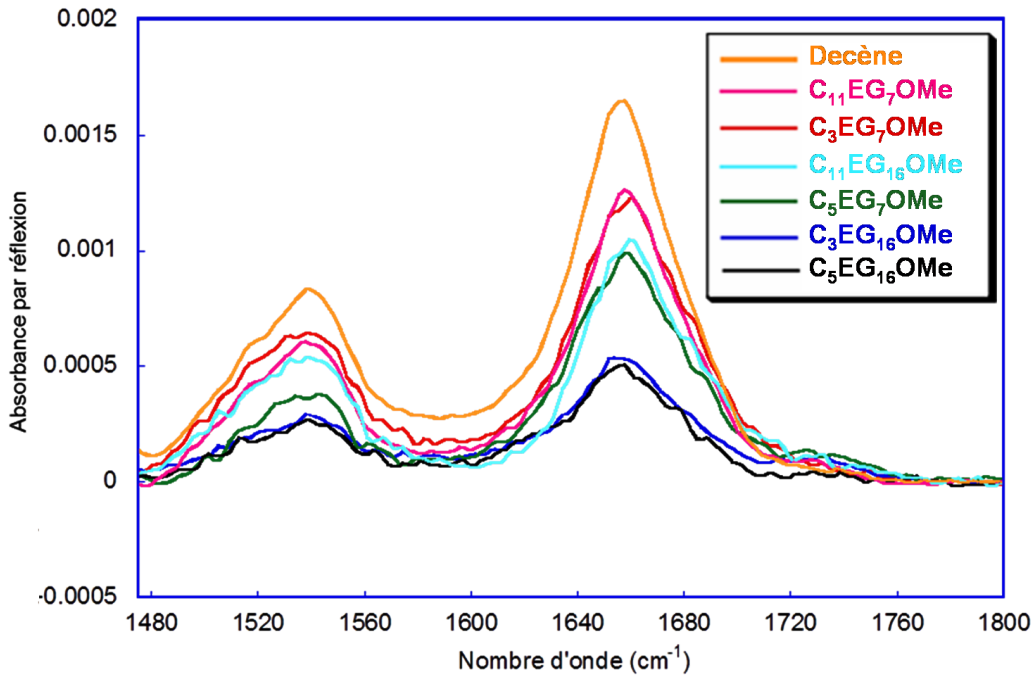

FIGURE 4.1 – Spectres infrarouge dans la zone amide de surfaces greffées avec différentes molécules $C_p(EG)_nOMe$, après exposition pendant 1h à une solution de BSA (1 mg.mL^{-1}) et rinçage au PBS et à l'eau. Les surfaces greffées avant exposition à la solution de BSA sont prises comme référence.

Type de surface	SiO_2	SiHx	Décène	$C_p(EG)_nOMe$				
				p \ n	3	7	12	16
Quantité relative de BSA	0.8	1	1	0	0.3	0.12	0.04	0
				3	0.8	0.7	0.45	0.25
				5	0.55	0.45	0.35	0.25
				11	0.85	0.65	0.6	0.5

TABLE 4.1 – Quantité relative de BSA restant adsorbée en surface après exposition pendant 1h à une solution de BSA (1 mg.mL^{-1}) et rinçage au PBS et à l'eau. La mesure est faite pour différents types de surface, en particulier des surfaces greffées avec des $C_p(EG)_nOMe$. La quantité est normalisée par la quantité mesurée sur la surface décylée. Plus cette quantité est faible, meilleure est la résistance à l'adsorption non spécifique de la BSA.

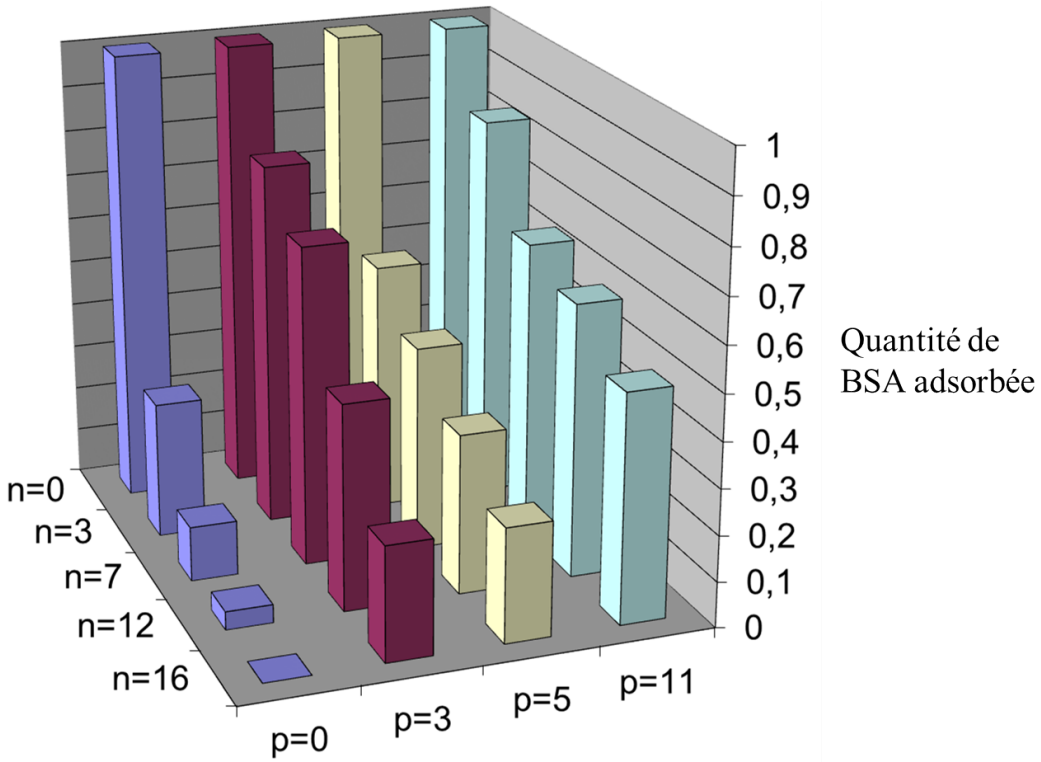

FIGURE 4.2 – Quantité de BSA présente sur les différentes surfaces greffées par des molécules de type $C_p(EG)_nOMe$, après exposition pendant 1h à une solution de BSA (1 mg.mL^{-1}) et rinçage au PBS et à l'eau. La mesure, faite à partir du spectre infrarouge, est normalisée par la quantité mesurée sur la surface décylée (mise pour plus de clarté à n=0 pour toute valeur de p) dans les mêmes conditions.

Nous avions déjà observé que la BSA s'adsorbait autant sur une surface hydrogénée que sur une surface décylée. Ce sont toutes deux des surfaces très hydrophobes. Cependant, une surface oxydée, très hydrophile adsorbe presque autant, indiquant que l'hydrophilicité de la surface n'est pas le critère déterminant dans son efficacité à limiter l'adsorption non spécifique des protéines.

On peut aussi facilement déduire de la figure 4.2 que les couches moléculaires avec de longues chaînes PEG sont les plus efficaces, ce qui est similaire aux conclusions du chapitre 1. On peut aussi remarquer que des chaînes alkyles longues (p=11) rendent la couche moléculaire moins efficace. La plus grande quantité de BSA adsorbée sur les couches moléculaires $C_3(EG)_nOMe$, par rapport aux couches greffées avec des molécules $C_5(EG)_nOMe$, est probablement due à la concentration plus faible des molécules $C_3(EG)_nOMe$ greffées et à la plus grande oxydation de la surface. En effet, comme le témoigne l'adsorption de la surface SiO_2 (tableau 4.1), la BSA s'adsorbe sur les surfaces oxydées. Le critère principal pour juger l'efficacité de la couche moléculaire $C_p(EG)_nOMe$ semble donc le rapport n/p : plus celui-ci est grand, plus la couche est efficace à limiter l'adsorption de BSA.

On remarque aussi que contrairement aux surfaces $H(EG)_nOMe$ présentées dans le chapitre 1, la présence d'une chaîne alkyle dans les molécules $C_p(EG)_nOMe$ (p≥3) ne permet pas d'obtenir de couches moléculaires empêchant totalement la BSA de s'adsorber, même pour des valeurs de n atteignant 16. Apparemment, ces couches ne

permettent qu'une limitation plus ou moins efficace de l'adsorption.

4.2.4 Caractérisation par microscopie à force atomique

La figure 4.3 montre des images AFM de surfaces greffées avec $C_{11}(EG)_6OMe$ (a), $C_5(EG)_6OMe$ (b) et $C_5(EG)_{16}OMe$ (c) après passage dans la solution de BSA. Ces trois images ont été enregistrées lors du premier passage de la pointe AFM sur la surface. Pour toutes ces surfaces, on observe des images assez chaotiques, sans aucune mémoire de la structure topographique de la surface observée avant exposition à la BSA.

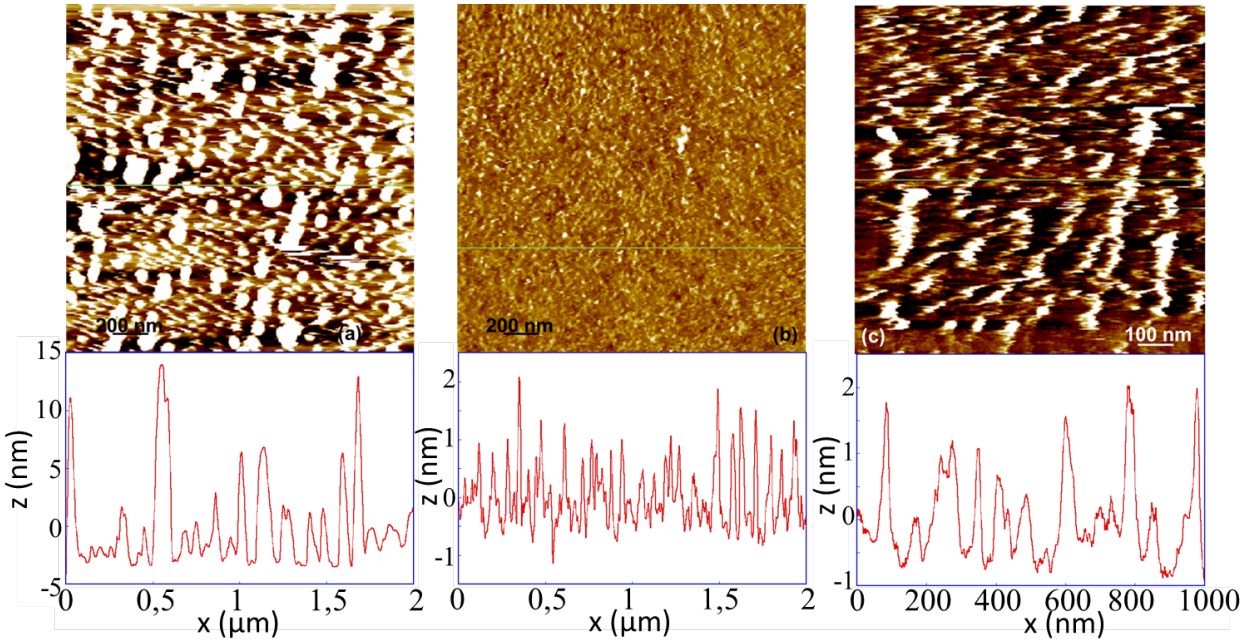

FIGURE 4.3 – Images AFM de surfaces greffées avec $C_{11}(EG)_6OMe$ (a), $C_5(EG)_6OMe$ (b) et $C_5(EG)_{16}OMe$ (c) après immersion dans la solution de BSA.

Toutefois, l'échantillon greffé avec $C_5(EG)_6OMe$ présente une surface assez homogène et relativement peu rugueuse. Il est assez naturel de penser que la surface est recouverte d'une couche de protéines qui empêche d'observer la structure en marches d'escalier de la surface de silicium. La surface greffée avec $C_{11}(EG)_6OMe$, quant à elle, présente de nombreux agrégats dont la hauteur atteint 15 nm et de diamètre variable mais pouvant dépasser la centaine de nm. On a l'impression d'observer dans ce cas des agrégats de BSA disséminés sur la surface. La surface greffée avec $C_5(EG)_{16}OMe$ présente aussi une couche de protéine, mais un examen attentif permet de deviner dans certaines zones la structure en marches d'escalier du silicium. Ceci est beaucoup plus visible lors de balayages successifs par la pointe AFM (figure 4.4 (b-c)). Il semble donc que, pour toutes les surfaces greffées avec des molécules de types $C_p(EG)_nOMe$ étudiées ($p \neq 0$), de la BSA reste adsorbée sur les surfaces ce qui correspond aux résultats obtenus par la caractérisation par spectroscopie infrarouge.

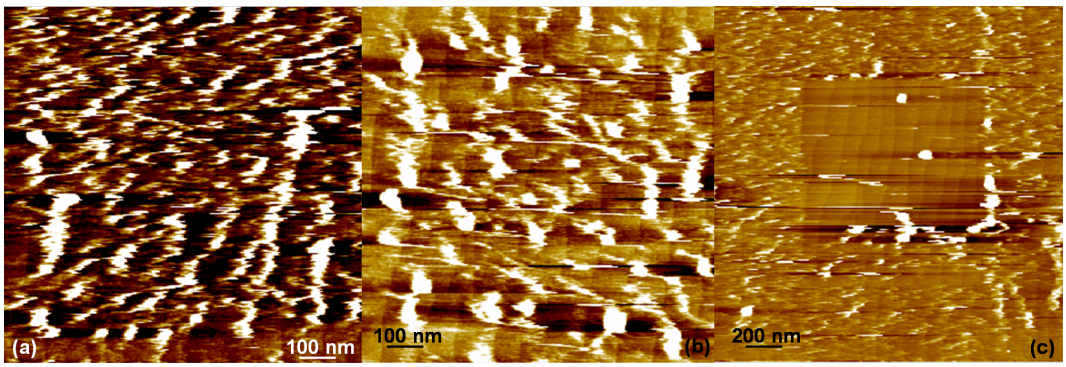

FIGURE 4.4 – Images AFM d'une surface greffée avec $C_5(EG)_{16}OMe$ après immersion dans la solution de BSA. Les différentes images montrent la même région imagée par différents balayages de la pointe (premier balayage (a), deuxième balayage (b) et image en champ élargi après 5 balayages en champ resserré(c).

La figure 4.4 montre des images de la même surface greffée avec $C_5(EG)_{16}OMe$ après le premier passage de la pointe (a), le deuxième passage de la pointe (b) et une image dézoomée où l'on peut voir une zone ayant été balayée 5 fois au préalable entourée d'une zone balayée pour la première fois (c). On voit que la pointe AFM entraîne la plus grande partie des protéines sur les extrémités de la zone de balayage et l'on peut facilement reconnaître la structure en marche d'escalier de la surface de silicium. Seuls quelques agrégats de protéines restent sur la zone balayée. Ceci est le cas pour les surfaces greffées avec $C_5(EG)_6OMe$ et $C_{11}(EG)_6OMe$ (figure 4.5 (a) et (b)), mais pas pour la surface décylée (figure 4.5 (c)). Le fait que les protéines sont entraînées par la pointe sur les surfaces greffées avec des molécules $C_p(EG)_nOMe$ indique que les protéines s'adsorbent moins fortement sur ces couches moléculaires que sur celles constituées de chaînes décyles. Ceci permet de supposer qu'un rinçage plus vigoureux pourrait permettre de désorber une grande partie de ces protéines présentes à la surface.

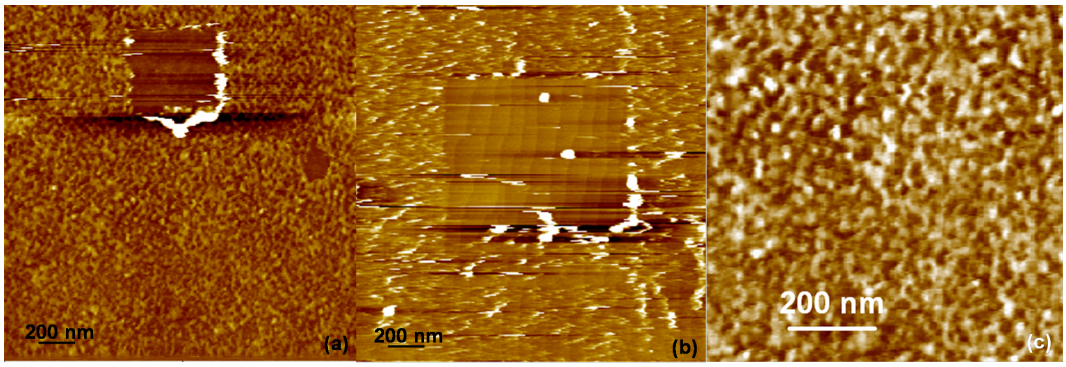

FIGURE 4.5 – Images AFM de surfaces greffées avec $C_5(EG)_6OMe$ (a), $C_{11}(EG)_6OMe$ (b) et du décène (c) après passage dans la solution de BSA. Ces images ont été obtenues après 5 balayages de la pointe AFM sur une zone resserrée. On remarque l'absence de trace associée aux balayages antérieurs dans le cas de la surface décylée.

Les surfaces fonctionnalisées avec des $C_p(EG)_nOMe$ permettent de limiter l'adsorption non spécifique de BSA en particulier pour une chaîne PEG longue et une

chaîne alkyle courte (p=5). Parmi les couches moléculaires étudiées, celle composée de $C_5(EG)_{16}OMe$ semble la meilleure candidate pour obtenir une surface empêchant totalement les protéines de s'adsorber de manière non spécifique. Toutefois, au terme de cette première phase, il faut s'interroger sur les raisons qui laissent le résultat imparfait et empêchent d'atteindre pleinement l'objectif de surface totalement immune aux adsorptions non spécifiques. On peut travailler sur un rinçage plus vigoureux qui permettrait de désorber efficacement les protéines absorbées, mais finalement assez faiblement liées à la surface. Mais il apparaît encore plus souhaitable de limiter efficacement l'adsorption de ces protéines. Or nous avons vu dans le chapitre 3 qu'en l'absence d'un rinçage salin (PBS/SDS) après greffage, il tendait à rester des agrégats non greffés de molécules PEG en surface. Il est tout à fait envisageable que ces agrégats agissent comme des points d'ancrage pour les protéines en surface et favorisent leur adsorption. Il faut donc reprendre l'étude précédente sur des surfaces rincées de façon optimale après greffage.

4.3 Influence du rinçage

4.3.1 Effet du rinçage de la surface après greffage

Caractérisation par angle de contact

Le rinçage dans la solution PBS/SDS a permis de faire diminuer l'angle de contact θ d'une surface fonctionnalisée par $C_5(EG)_{16}OMe$ à 38°, ce qui tend à montrer que pour les couches moléculaires à grand rapport n/p, ce sont les résidus présents sur la surface qui causent son hydrophobicité et que l'on peut retrouver l'hydrophilicité des surfaces $H(EG)_nOMe$ à condition d'éliminer ces résidus. Après passage dans la solution de BSA, la valeur de θ reste la même.

Caractérisation par spectroscopie infrarouge

La figure 4.6 montre la zone des pics amides d'une surface fonctionnalisée par $C_5(EG)_{16}OMe$ après immersion dans la solution de BSA en fonction du rinçage pratiqué après le greffage. Le spectre (a) est celui obtenu sur une couche décyle, à titre de comparaison, tandis que le spectre (b) est celui obtenu pour une surface rincée dans l'éthanol et le dichlorométhane seulement et le spectre (c) est celui obtenu après le rinçage supplémentaire selon le protocole de la section 3.5.

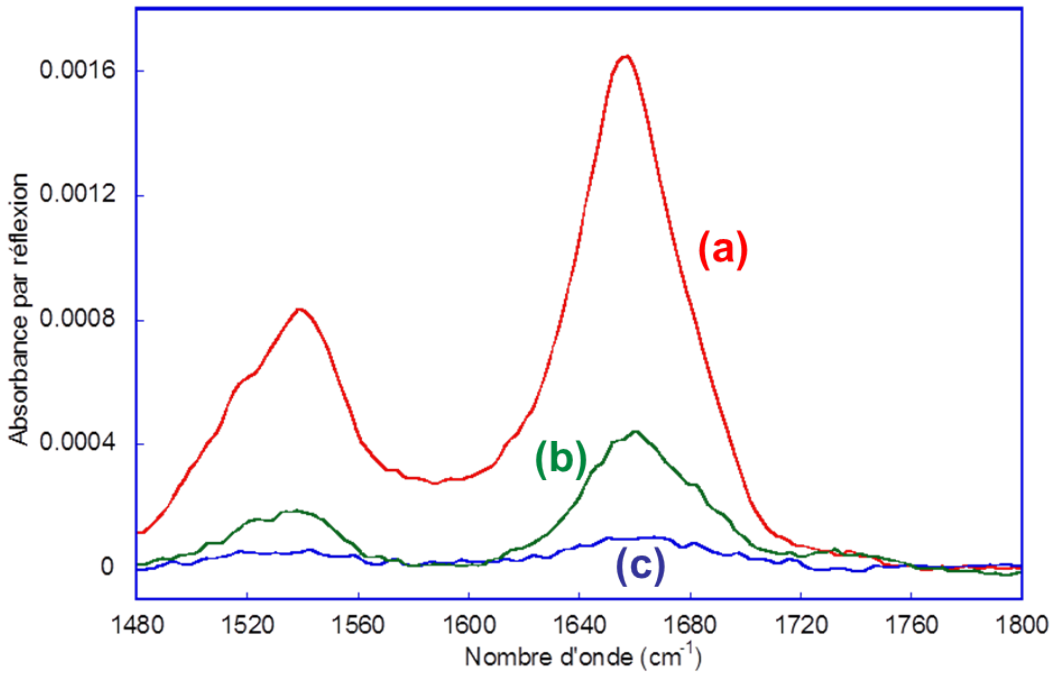

FIGURE 4.6 – Spectres infrarouge dans la zone des pics amides de surfaces fonctionnalisées par différentes couches moléculaires après immersion dans une solution de BSA (1 mg.mL^{-1}). Par rapport à une couche constituée de chaînes décyles (a), une couche de molécules $C_5(EG)_{16}OMe$ rincée de façon non optimale (b), présente encore une quantité non négligeable de protéines adsorbées. Cette quantité est notablement réduite par le rinçage salin effectué après greffage (c).

Le rinçage salin utilisé après le greffage permet de diminuer sensiblement la quantité de protéines adsorbées, comme le montre la comparaison des spectres (b) et (c). Quantitativement, pour ces couches $C_5(EG)_{16}OMe$ optimisées, on mesure seulement 5% d'adsorption spécifique après exposition à la BSA (spectre (c)) par rapport à une surface décylée (spectre (a)), alors que l'on obtenait une valeur de 25% pour les couches $C_5(EG)_{16}OMe$ imparfaitement rincées après greffage (spectre (b)).

Caractérisation par microscopie à force atomique

La figure 4.7 montre les images AFM de surfaces greffées avec $C_5(EG)_{16}OMe$ n'ayant pas subi (a) ou ayant subi (b) le rinçage complémentaire dans la solution PBS/SDS après greffage et ayant été ensuite immergées dans la solution de BSA.

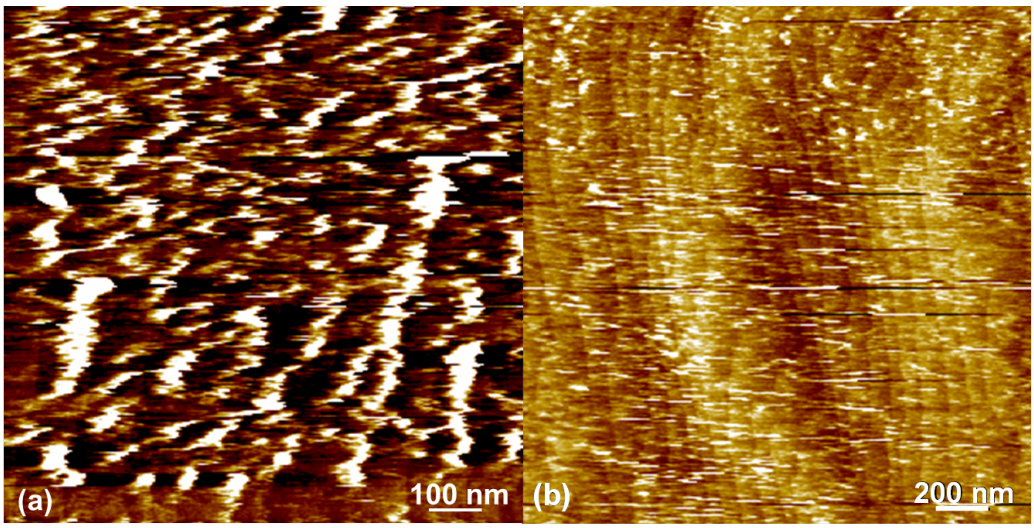

FIGURE 4.7 – Images AFM de surfaces greffées avec $C_5(EG)_{16}OMe$ après exposition à une solution de BSA (1 mg.mL^{-1}). Sur l'image (a), la surface a seulement subi un rinçage éthanol/dichlorométhane après greffage ; l'ajout du rinçage PBS/SDS après greffage (b) diminue très notablement la quantité de protéines en surface.

Clairement, comme le montrait la spectroscopie infrarouge, un rinçage optimisé après greffage permet de diminuer notablement la quantité de protéines adsorbées. Ainsi, l'image (b) laisse voir beaucoup plus nettement la topographie en marches d'escalier de la surface de silicium que l'image (a) obscurcie par la présence de protéines adsorbées.

On observe toutefois la présence de quelques protéines à l'origine des traces horizontales sur l'image, associées à leur entraînement par la pointe lors du balayage. Cette présence est en accord avec la signature faible détectée par infrarouge. L'objectif consistant à obtenir une surface totalement résistante à l'adsorption non spécifique des protéines nous conduits maintenant à reconsidérer le rinçage final effectué après immersion dans la solution de BSA.

4.3.2 Rinçage des protéines adsorbées

Pour augmenter l'efficacité du rinçage, nous avons choisi de mettre en oeuvre une solution saline, couramment utilisée pour la solubilisation des protéines, contenant un surfactant susceptible de favoriser la désorption de la surface. Ces considérations nous ont amenés à utiliser un rinçage identique à celui pratiqué en fin de greffage. Plus particulièrement, après exposition à la solution 1 mg.mL^{-1} de BSA, les différentes surfaces ont subi le rinçage suivant :

- 5 minutes dans une solution à 0.1% de SDS dans du PBS 1X.
- 1 minute dans du PBS 0,2X.
- 1 minute dans du PBS 0,1X.
- 2 minutes dans de l'eau ultrapure pour éliminer toute trace de sels.

Caractérisation par spectroscopie infrarouge

La figure 4.8 montre la zone des pics amides I et II des spectres infrarouge après exposition à la solution de BSA d'une surface décylée (a) et d'une surface fonctionnalisée par $C_5(EG)_{16}OMe$ et rincée après greffage dans les conditions optimales décrites précédemment. Le spectre (b) est obtenu après le rinçage simple PBS/eau décrit dans la section 4.2.1, tandis que le spectre (c) est obtenu après le rinçage dans la solution PBS/SDS. Le rinçage final modifié ôte toute trace de protéines adsorbées dans ce spectre infrarouge.

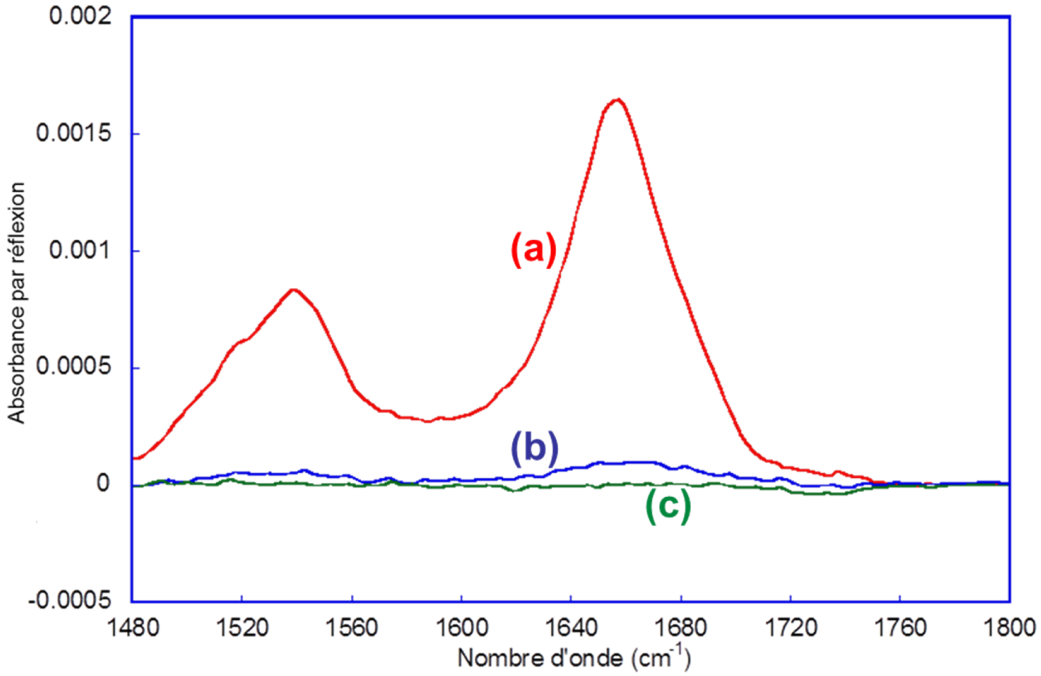

FIGURE 4.8 – Spectres infrarouge dans la zone des pics amides, après immersion dans la solution de BSA, d'une surface greffée avec des molécules $C_5(EG)_{16}OMe$ et rincée de manière optimale après greffage. Un rinçage PBS/SDS après exposition à la BSA (c) permet de retirer toute trace de protéines adsorbées, alors qu'un simple rinçage PBS (b) laisse une faible concentration. Le spectre (a) montre, à titre de comparaison, une surface greffée avec des chaînes décyles qui, indépendemment du rinçage après exposition à la BSA, retient une forte quantité de protéines adsorbées.

En revanche, sur une surface greffée avec des couches décyles, ce rinçage PBS/SDS n'a aucun effet sur la quantité de BSA détectée par infrarouge. Cela montre que dans ce cas, les protéines sont beaucoup plus fortement adsorbées à la surface.

Le même rinçage effectué après exposition à la BSA de couches greffées avec des molécules $C_p(EG)_nOMe$ présentant un rapport n/p plus faible diminue aussi notablement la quantité de protéines qui restent adsorbées en surface, sans toutefois la ramener complètement à zéro.

Les tableaux 4.2, 4.3 et 4.4 montrent les valeurs obtenues pour la quantité de BSA adsorbée sur des surfaces fonctionnalisées par $C_5(EG)_{16}OMe$, $C_5(EG)_{12}OMe$ et $C_{11}(EG)_{16}OMe$ respectivement, et ayant subi les rinçages standard (toluène, éthanol

puis dichlorométhane seulement) ou optimisé (avec le rinçage PBS/SDS complémentaire) après greffage, et les rinçages PBS ou PBS/SDS après exposition à la BSA.

$C_5(EG)_{16}OMe$		rinçage après protéine	
		PBS	PBS/SDS
rinçage après greffage	standard	0.25	0.12
	optimisé	0.05	0

TABLE 4.2 – Quantité relative de BSA sur une surface fonctionnalisée par $C_5(EG)_{16}OMe$ avec différents rinçages.

$C_5(EG)_{12}OMe$		rinçage après protéine	
		PBS	PBS/SDS
rinçage après greffage	standard	0.35	0.25
	optimisé	0.20	0.05

TABLE 4.3 – Quantité relative de BSA sur une surface fonctionnalisée par $C_5(EG)_{12}OMe$ avec différents rinçages.

$C_{11}(EG)_{16}OMe$		rinçage après protéine	
		PBS	PBS/SDS
rinçage après greffage	standard	0.50	0.35
	optimisé	0.35	0.20

TABLE 4.4 – Quantité relative de BSA sur une surface fonctionnalisée par $C_{11}(EG)_{16}OMe$ avec différents rinçages.

Les taux de greffage obtenus pour ces 3 molécules sont très voisins (environ $1{,}1.10^{14}$ cm^{-2}, voir tableau 3.1). Ainsi, les différences constatées sont principalement attribuables à la nature chimique de la molécule greffée. Le gain obtenu par le rinçage optimisé après greffage s'avère moins spectaculaire que sur les couches $C_5(EG)_{16}OMe$ pour des couches $C_p(EG)_nOMe$ présentant un rapport n/p plus faible. Ainsi, un rinçage optimisé après greffage permet de réduire la quantité de protéines adsorbées de 35% à 20% pour des couches $C_5(EG)_{12}OMe$ et de 50% à 35% pour des couches $C_{11}(EG)_{16}OMe$. Ceci confirme la capacité intrinsèque des couches $C_5(EG)_{16}OMe$ à limiter l'adsorption non spécifique et que les résidus de greffage présents sur la surface après le rinçage standard sont le facteur le plus limitant pour ces couches.

Caractérisation par microscopie à force atomique

La figure 4.9 montre les images AFM de surfaces greffées avec $C_5(EG)_{16}OMe$ après immersion dans une solution 1 $mg.mL^{-1}$ de BSA. L'image (a) montre une surface ayant été rincée 10 secondes dans la PBS 1X comme celles de la section 4.2.4, tandis que l'image (b) montre une surface ayant été rincée dans la solution PBS/SDS.

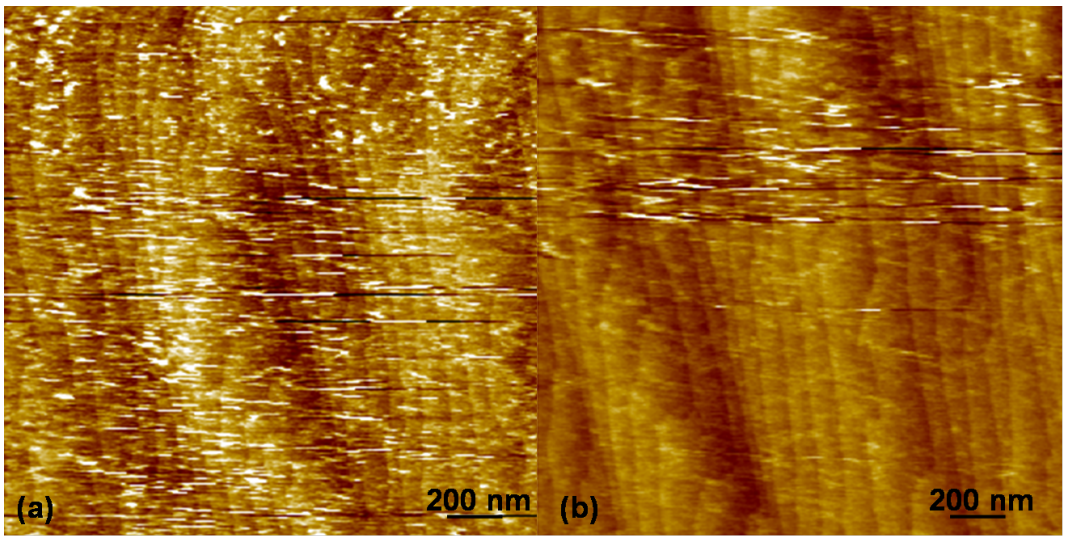

FIGURE 4.9 – Images AFM de surfaces greffées avec $C_5(EG)_{16}OMe$. Les deux surfaces ont été rincées dans la solution saline de SDS avant le passage dans la solution de BSA. L'image (a) montre la surface après rinçage PBS et l'image (b) la surface ayant reçu le rinçage PBS/SDS.

Les deux images permettent de discerner facilement la structure en marches d'escalier du substrat greffé. On peut tout de même remarquer une diminution sensible de la quantité de protéines observée sur la surface ayant rincé dans la solution PBS/SDS, ce qui est cohérent avec les conclusions de l'étude par spectroscopie infrarouge. Toutefois, même l'image (b), obtenue pour les meilleurs rinçages à toutes les étapes, n'est pas exempte de traînées témoignant la présence de protéines. Il est vraisemblable que la qualité de la surface soit meilleure que le rendu de l'image, car si une protéine ou un petit amas de protéines est entraîné par la pointe lors du balayage, cet amas n'est pas toujours abandonné facilement en fin de ligne, et son effet sur l'image peut se prolonger sur plusieurs lignes successives. De ce point de vue, il aurait été intéressant d'imager les surfaces en mode "non contact", moins sensible à ce genre de perturbations.

Afin de tester la stabilité dans le temps de cette capacité des surfaces greffées avec des $C_5(EG)_{16}OMe$ à résister à l'adsorption non spécifique des protéines, nous avons aussi réalisé des tests d'adsorption de BSA après 5 et 15 jours. A chaque fois, les spectres infrarouge des surfaces fonctionnalisées par des $C_5(EG)_{16}OMe$ ne présentait aucun pic amide après rinçage. Ces couches moléculaires ont donc des propriétés de biorésistance stables dans le temps, contrairement à celles obtenues par greffage de $H(EG)_nOMe$.

En conclusion, les couches greffées avec des molécules $C_p(EG)_nOMe$ ont une faible propension intrinsèque à adsorber une protéines comme la BSA. Toutefois, il est important pour conserver cette faculté de contrôler l'agencement de la couche au niveau moléculaire, de petits défauts ou agrégats présents après le greffage pouvant agir comme des points d'ancrage pour l'adsorption non spécifique des protéines. De la même façon, des procédures de rinçage suffisamment énergiques peuvent s'avérer nécessaires pour désorber des protéines faiblement ancrées à la couche moléculaire.

Lorsque tous ces facteurs sont pris en considération, il apparaît toutefois que, comme on pouvait s'y attendre, les molécules présentant un fort rapport n/p sont celles ayant la propension la plus faible à adsorber les protéines. Dans le cas de la BSA, une couche moléculaire formée en greffant des molécules $C_5(EG)_{16}OMe$ s'avère quasi idéale, n'adsorbant qu'une quantité de BSA inférieure au seuil de détection infrarouge et offrant une parfaite stabilité dans le temps.

4.4 Ouverture à d'autres protéines

4.4.1 Choix des protéines

Même si la résistance à l'adsorption non spécifique de la BSA constitue un test particulièrement exigeant, comme cela a déjà été mentionné, il n'en demeure pas moins que la grande variété des protéines induit une grande diversité dans leur tendance à s'adsorber sur une surface. Ceci nous a conduits à explorer brièvement la résistance à l'adsorption non spécifique de nos couches moléculaires optimisées $C_5(EG)_{16}OMe$ vis-à-vis de quelques autres protéines représentatives : fibrinogène, streptavidine et thrombine. Ces protéines ont été choisies car elles ont des tailles et des propriétés différentes. En particulier, le fibrinogène est une protéine bien plus grosse que les autres (340 kDa, 67 kDa pour la BSA, 37 kDa pour la thrombine et 52.8 kDa pour la streptavidine) et sensiblement plus hydrophobe que les autres. Ces protéines possédent aussi des points isoélectriques différents (autour de 6 pour le fibrinogène, tandis que celui de la BSA se trouve à 4,7 et celui de la thrombine est à 7). Ces protéines sont fréquemment utilisées en biochimie ce qui les rendent aisément disponibles. Cai et al. [85] ont utilisé le fibrinogène pour leurs études tandis que le groupe de Hamers [87] a testé l'efficacité de ses surfaces avec la BSA, le fibrinogène, l'avidine et la caséine. La thrombine est une protéine présentant un intérêt particulier dans le cadre de cette étude, comme cela apparaîtra dans le chapitre 5.

4.4.2 Détection de fluorescence

Nous avons décidé d'évaluer la résistance de différentes couches moléculaires à l'adsorption non spécifique des protéines choisies en déposant des échantillons de ces protéines à la surface des couches moléculaires et en mesurant quelle proportion de protéines déposées pouvait être ôtée de la surface par lavage. Afin de réaliser une étude en parallèle des différentes protéines déposées en quantité variable, nous avons décidé de détecter la présence de ces protéines à la surface des couches par fluorescence. Cette étude a été menée sur des couches moléculaires de chaînes décylées ou obtenues par greffage de molécules PEG550 ($H(EG)_nOMe$ avec $<n>\approx 12$) et $C_5(EG)_{16}OMe$.

La fluorescence est un processus de luminescence permettant à une molécule (appelée fluorophore) de passer d'un état électronique excité à un état d'énergie plus basse, par émission de lumière. Afin de pouvoir détecter nos protéines, il est nécessaire que celles-ci soient marquées par un fluorophore.

L'utilisation du silicium cristallin comme substrat est défavorable pour les études par fluorescence. En effet, en considérant les intensités des champs électriques d'ex-

citation et d'émission du fluorophore, on peut estimer une diminution d'un facteur 10 du facteur de sensibilité F de la fluorescence pour un émetteur situé à la surface du silicium (F $\approx$ 0,04) par rapport au même fluorophore situé à la surface du verre (F $\approx$ 0,4) [136]. Ce facteur de sensibilité est défini comme le produit de l'intensité du champ excitateur et du champ émis pour le fluorophore considéré, normalisé par la valeur de ce produit lorsque le fluorophore est dans l'espace libre. L'atténuation constatée (F $<$ 1) au voisinage d'une surface est due à l'effet de "canalisation" de l'émission associé à l'indice optique du substrat. Cet effet est grand pour le silicium dont l'indice de réfraction est élevé.

Toutefois, pour pouvoir bénéficier de la chimie de surface contrôlée développée sur silicium, il est possible d'utiliser une couche mince de silicium amorphe hydrogéné ou un alliage silicium-carbone amorphe [58; 60; 136; 145].

L'utilisation du silicium amorphe carboné permet de diminuer l'indice optique du substrat. Plus le taux de carbone est élevé, plus l'indice de réfraction diminue. En effet, l'atome de carbone étant plus petit que l'atome de silicium, la liaison Si-C est plus courte que la liaison Si-Si. Ceci entraîne une augmentation des interactions entre les atomes, donc une augmentation de l'énergie du gap optique E_g qui conduit à une diminution de l'indice optique.

La géométrie de couche mince permet aussi de jouer sur des effets d'interférences pour augmenter la valeur de F lorsque le substrat est réfléchissant [146–148]. Ceci conduit à chercher le substrat le plus réfléchissant possible aux longueurs d'ondes d'absorption et d'émission des fluorophores utilisés. Les meilleurs rendements de réflexion à une longueur d'onde donnée ne sont pas obtenus par des miroirs métalliques, mais par des miroirs diélectriques dits "miroirs de Bragg" [149].

Un miroir de Bragg, conçu pour une longueur d'onde λ_{Bragg} donnée, consiste en une alternance de couches d'indice élevé et faible, d'épaisseurs choisies telles que le déphasage induit par le passage dans une couche sous une incidence normale vaille $\pi/2$ (figure 4.10). Ainsi l'épaisseur e_i d'une couche i d'indice n_i est choisie d'après l'équation 4.1 telle que :

$$e_i \times n_i \times \frac{2\pi}{\lambda_{Bragg}} = \frac{\pi}{2} \rightarrow e_i = \frac{\lambda_{Bragg}}{4n_i} \tag{4.1}$$

Lors de la réflexion entre une couche d'indice faible et une couche d'indice élevé, le rayon lumineux subit un déphasage de π. Comme lors de son trajet aller-retour dans le miroir le rayon subit, pour chaque couche, un déphasage de π ($\pi/2$ aller ; $\pi/2$ retour), il suffit de commencer le miroir par une couche d'indice fort pour que tous les rayons qui ressortent du miroir soient réfléchis en phase. Pour un nombre suffisant de couches, le coefficient de réflexion est très proche de 1. Mais dans ce cas, tous les rayons sont réfléchis par la structure avec un déphasage de π, c'est à dire en opposition de phase avec leur rayon incident, ce qui annule le champ électromagnétique sur la surface. On préfère donc, comme représenté sur la figure 4.10, commencer le miroir par une couche d'indice faible (couche de SiO_2 dans le cas présent) de façon à ce que les rayons réfléchis par la structure (sauf celui réfléchi à l'interface air/SiO_2) interfèrent constructivement avec le faisceau incident.

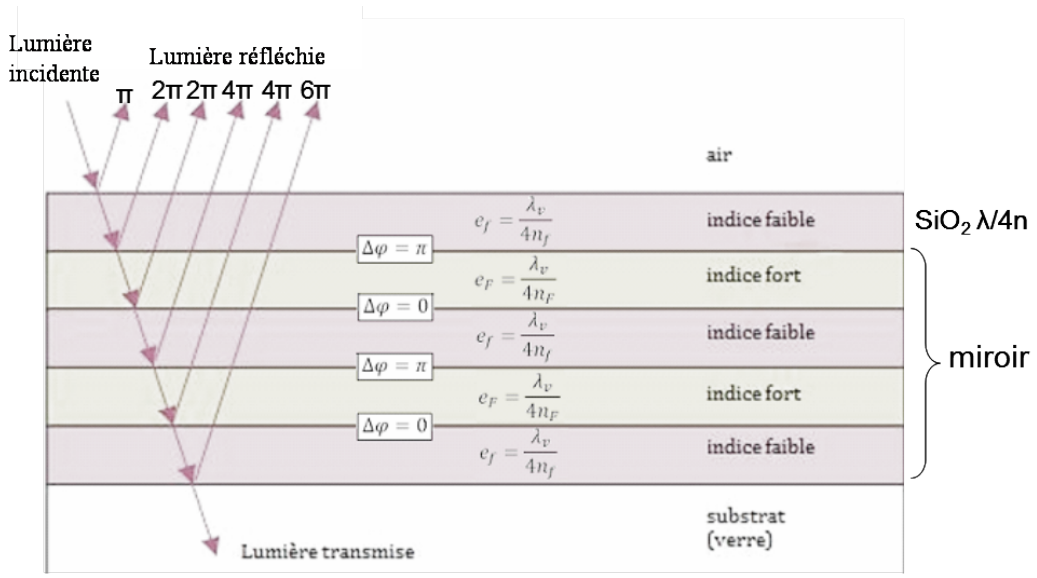

FIGURE 4.10 – Architecture du miroir de Bragg, qui reflète la structure des lames "Amplislide", utilisé comme réflecteur pour amplifier le signal de fluorescence.

Dans le domaine des biocapteurs plusieurs équipes (CEA, Genewave) ont cherché à optimiser la fluorescence en utilisant des miroirs de Bragg, essentiellement basés sur une alternance de couches SiO_2 / TiO_2 (n_{SiO_2} = 1,48 / n_{TiO_2} = 1,94) [146; 148].

Dans notre étude nous allons utiliser les miroirs de Bragg de la société Genewave (lames "Amplislide") qui correspondent à une lame de verre sur laquelle 8 couches alternées SiO_2/TiO_2 ont été déposées. La longueur d'onde choisie est λ_{Bragg} = 612 nm, ce qui correspond à une valeur moyenne des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission pour les fluorophores cyanine 3 (Cy3) et cyanine 5 (Cy5).

Afin d'utiliser la lame "Amplislide" de Genewave dans nos expériences et d'utiliser une chimie de surface contrôlée, nous avons décidé de recouvrir cette lame d'une très fine couche (5 nm) de silicium amorphe carboné à 20% (a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H). L'épaisseur de la couche rajoutée induit un déphasage pour les rayons lumineux de 0.3 radian [136], très faible par rapport à π, déphasage caractéristique d'une interférence destructive. La perte d'intensité due à l'ajout de cette fine couche de a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H est de l'ordre de 2% [136] par rapport à un miroir de Bragg non modifié. Ceci nous permet d'utiliser cette architecture pour bénéficier d'une chimie contrôlée et d'un gain optique maximal.

4.4.3 Mode Opératoire

Dépôt de silicium amorphe

Nous déposons nos couches minces de silicium amorphe carboné par décomposition chimique en phase vapeur assistée par plasma (PECVD) sous excitation radiofréquence (13,56 MHz) en "régime basse puissance" (densité de puissance de 0,1 W.cm^{-2}). Les dépôts sont effectués à 250°C sous une pression de 35 mTorr et avec un flux des gaz de 2 L/h. La proportion des gaz à introduire est calculée d'après le modèle empirique proposé par Solomon et coll [150]. Ainsi, il faut 81% (1,62 L/h

soit 27 sccm) de méthane et 19% de silane (0,38 L/h soit 6,3 sccm) pour obtenir la composition voulue, a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H. Les lames amplislides sont introduites telles quelles dans le réacteur et placées à l'anode. On obtient l'épaisseur désirée de 5 nm en 15 secondes.

Greffage sur lame

Une fois les lames sorties du réacteur, la surface a-$Si_{0.8}C_{0.2}$:H est hydrogénée par exposition à des vapeurs de HF pendant 15 secondes. Ces surfaces hydrogénées sont ensuite soumises au même protocole de greffage que les échantillons de silicium cristallin, à savoir placées dans un Schlenk dégazé contenant du décène, PEG550 ou une solution de $C_5(EG)_{16}OMe$ à 0.1M dans du toluène distillé, et laissées sous irradiation UV pendant 3 heures avant d'être rincées, sous légère agitation :

- au THF (15 minutes) et dichlorométhane (15 minutes) pour les surfaces décylées,
- à l'éthanol (65°C, 30 minutes) et dichlorométhane (5 minutes) pour les surfaces fonctionnalisées par le PEG 550,
- au toluène (65°C, 15 minutes), éthanol (65°C, 30 minutes) et dichlorométhane (5 minutes), puis dans la solution de SDS à 0.1% dans du PBS 1X (5 minutes), dans du PBS 0.2X (1 minute) et dans du PBS 0.1X (1 minute) avant d'être rincé à l'eau ultrapure (2 minutes), pour les surfaces fonctionnalisées avec $C_5(EG)_{16}OMe$.

Spotting de protéines

Les protéines fluorescentes utilisées pour cette étude sont :

- la BSA, la streptavidine et le fibrinogène marqués à l'Alexa Fluor 647 provenant de Molecular Probes
- la thrombine provenant de Sigma et marquée au laboratoire à l'Alexa Fluor 647.

L'Alexa Fluor 647 est un fluorophore communément utilisé pour marquer les protéines car il possède de nombreux groupements succinimides se couplant bien aux groupements amines des protéines. Il absorbe à 650 nm et émet à 665 nm. Son rendement quantique (nombre de photons émis / nombre de photons absorbés) de 0.33 est légèrement supérieur à celui de la cyanine 5 (0.28) émettant dans la même zone et communément utilisée dans les puces à ADN. Le marquage des protéines est assuré par la reaction d'amidation entre les amines présentes sur les protéines et l'ester de succinimide présent sur l'Alexa Fluor 647.

Afin de marquer la thrombine, cette dernière est solubilisée à une concentration de 2 $mg.mL^{-1}$ dans 130 μL d'une solution à 0.1M de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$). 1 mg d'Alexa Fluor 647 est solubilisé dans 100 μL de diméthylsulfoxyde (DMSO). 14 μL de cette solution sont mélangés dans les 65 μL de la solution de bicarbonate de sodium contenant la thrombine et le tout est laissé à température ambiante pendant 150 minutes. La thrombine marquée est ensuite purifiée sur filtre à centrifugation Microcon (Millipore). Pour cela, on commence par introduire 200 μL de PBS 1X

dans le réservoir du Microcon et on centrifuge pendant 20 minutes à 12°C et à 12000 tours.min^{-1}. Environ 150 μL du PBS 1X traverse la membrane et on introduit ensuite la solution contenant la protéine marquée. On centrifuge 5 fois en rajoutant à chaque fois 100 μL de PBS1X dans le réservoir, puis on récupère la thrombine marquée dans le réservoir.

Afin de connaitre les concentrations en protéines et le degré de marquage de celles-ci (c'est à dire le nombre moyen de fluorophores par protéine), on mesure l'absorbance des différentes solutions à 280 nm et 650 nm (A_{280} et A_{650}) dans un spectromètre UV-visible. La concentration en protéines est donnée par l'équation,

$$C = \frac{A_{280} - F_c * A_{650}}{\varepsilon * l} \tag{4.2}$$

où C est la concentration en protéines, F_c, le facteur de correction permettant de prendre en compte l'absorption du fluorophore à 280 nm (pour l'Alexa Fluor 647, F_c=0.03), ε est le coefficient d'extinction molaire de la protéine, et l est l'épaisseur d'échantillon traversée par le faisceau.

Le degré de marquage est obtenu par la relation,

$$N = \frac{A_{650}}{\varepsilon_{Alexa} * C * l} \tag{4.3}$$

où N est le nombre moyen de fluorophores par protéine, et ε_{Alexa} est le coefficient d'extinction molaire de l'Alexa Fluor 647 à 650 nm ($\approx$ 239000 cm^{-1}.M^{-1}). Ainsi, on trouve un nombre de fluorophore moyen de 4,0 pour la BSA, 6,6 pour la thrombine et 8,5 pour le fibrinogène. La connaissance de C et N nous permet aussi de remonter à la concentration en fluorophores de nos solutions de protéines.

Pour faire varier la quantité de protéines déposée en surface, on dépose, à l'aide d'un robot, un même volume de solution de différentes concentrations en protéine. Pour faciliter la comparaison et limiter les incertitudes de mesure, il est avantageux de mesurer la fluorescence en utilisant un seul temps d'exposition. Pour cela, nous avons décidé de maintenir la concentration de fluorophore Alexa Fluor 647 à 0.523 μM, tout en faisant varier les concentrations totales de protéines sur une large gamme : 0.1, 0.2, 0.5, 1 et 2 mg.mL^{-1} pour la BSA, le fibrinogène et la streptavidine et 0.09, 0.3 et 0.9 mg.mL^{-1} pour la thrombine. Afin de pouvoir faire varier les concentrations totales de protéines tout en gardant constant la concentration de protéines fluorescentes, nous avons réalisé un mélange de protéines marquées et non marquées. Les protéines utilisées ont été diluées dans une solution tampon contenant 46,26% volumique de glycérol, 1.44% volumique de Triton, la concentration de protéines souhaitée et le reste d'eau.

Les différentes solutions de protéines ont été déposées sur les lames à l'aide d'un spotteur à tête jet d'encre Arrayjet Sprint Microarrayer. Chaque concentration a été spottée 6 fois pour chaque protéine (environ 300 pL par spot). Le fait que les différentes protéines ont pu être spottée sur les mêmes lames provient bien sûr du multiplexage possible sur les biopuces. Cependant, il est nécessaire de noter que toutes ces protéines subissnent dès lors le même traitement, dans les mêmes solutions. En particulier, nous avons déjà évoqué que ces protéines possèdent des points

isoélectriques différents et auront donc des charges globales différentes les unes des autres. Il n'est donc pas impossible que ceci ait une influence quand à leur propension à s'adsober de manière spécifique sur les surfaces. En particulier, il a été montré que le fibrinogène avait tendance à s'adsorber en plus grande quantité plus le pH se rapproche de son point isoélectrique [151].

Une fois les lames retirées du spotteur, elles ont été caractérisées par un scanneur DiagArray de la société Genewave.

Les lames ont ensuite été rincées dans une solution saline de SDS à 0.1% dans du PBS 1X pendant 25 minutes, puis dans du PBS 0.2X (5 minutes) et du PBS 0.1X (5 minutes) avant d'être rincées à l'eau ultrapure (25 minutes) pour retirer toute trace de sels. Après rinçage, les lames ont de nouveau été scannées afin de déterminer dans quelle mesure les protéines spottées restaient adsorbées sur la surface.

4.4.4 Caractérisation des lames

Bovine Serum Albumine

La figure 4.11 montre des spots avec différentes concentrations de BSA déposées sur les trois types de lames avant et après rinçage. La fluorescence similaire de tous ces spots avant rinçage est due au fait que la concentration de fluorophore déposée est la même pour tous les spots (0.523 μM d'Alexa Fluor 647). Les différentes concentrations spottées sont 2, 1, 0.5, 0.2 et 0.1 mg.mL^{-1}.

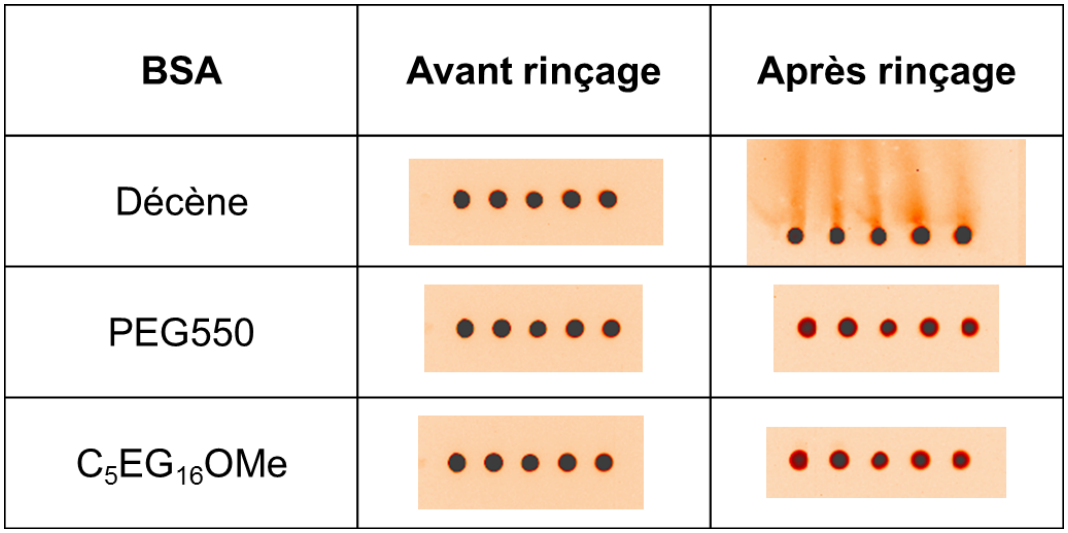

FIGURE 4.11 – Spots de BSA à différentes concentrations (de gauche à droite : 2, 1, 0.5, 0.2 et 0.1 mg.mL^{-1}) avant et après rinçage.

Il peut sembler surprenant que les spots les plus intenses soient obtenus pour les concentrations de protéines les plus faibles, mais ceci est en réalité attendu, car les concentrations de fluorophores sont les mêmes sur tous les spots. Ainsi, les spots les plus dilués en protéines sont aussi ceux qui possède la plus grande proportion de protéines marquées. Les protéines restant à la surface sont donc en moyenne plus fluorescentes sur ces spots.

Le tableau 4.5 montre le rapport R des intensités de fluorescence après rinçage / avant rinçage. Ce rapport exprime la proportion de protéines restant sur la surface après rinçage. Il est construit à partir de l'intensité médiane des pixels composant les spots de l'image. Ce choix est couramment utilisé pour obtenir des tendances quantitatives en s'affranchissant autant que possible des variations de fluorescence au sein des spots. Les valeurs du tableau 4.5 sont les moyennes (sur les 6 spots déposés pour chaque concentration) des rapports obtenus pour chaque spot.

Molécule greffée / Concentration spottée (mg.mL^{-1})	Décène	PEG550	$C_5(EG)_{16}OMe$
2	0.02	0.014	0.013
1	0.02	0.016	0.015
0.5	0.027	0.016	0.015
0.2	0.068	0.02	0.019
0.1	0.094	0.025	0.024

TABLE 4.5 – Rapport de l'intensité de fluorescence des spots après rinçage sur l'intensité initiale après exposition à la BSA.

En connaissant le volume de solution spotté ($V \approx$ 300pL soit 3.10^{-13} m^3) et sa concentration en protéine C (par exemple, pour la BSA, 2 mg.mL^{-1} vaut environ 0,03 mol.m^{-3}) , on peut remonter au nombre de protéines spottées et, grâce aux rapports d'intensité R obtenus, remonter au nombre de protéines restant sur la surface après rinçage. En tenant compte de l'aire moyenne des spots A (le diamètre des spots considéré est de 216 μm donc l'aire moyenne vaut 3,7.10^{-8} m^2) et le volume d'une protéine Vol, on peut remonter à l'épaisseur moyenne de la couche de protéines restant sur la surface e, selon l'équation

$$e = \frac{V \times C \times R \times Vol \times \mathcal{N}}{A} \tag{4.4}$$

où $\mathcal{N}$ est le nombre d'Avogadro. Cette évaluation fait implicitement l'hypothèse qu'il n'y a pas d'extinction de luminescence dans la couche épaisse de protéines laissées sur la surface avant rinçage. La BSA a un volume de 140*40*40 Å^3 (2,25.10^{-25} m^3) et les valeurs de l'épaisseur de la couche restant après rinçage sont regroupées dans la tableau 4.6

Molécule greffée / Concentration spottée (mg.mL^{-1})	Décène	PEG550	$C_5(EG)_{16}OMe$
2	6.6 Å	4.6 Å	4.3 Å
1	3.3 Å	2.6 Å	2.5 Å
0.5	2.2 Å	1.3 Å	1.2 Å
0.2	2.2 Å	0.66 Å	0.63 Å
0.1	1.6 Å	0.41 Å	0.40 Å

TABLE 4.6 – Epaisseur moyenne des spots de BSA après rinçage de la lame.

Tout d'abord, on remarque que plus la solution de BSA spottée est concentrée plus il reste de protéine à la surface, ce qui semble naturel.

On peut aussi voir que les surfaces fonctionnalisées par le $C_5(EG)_{16}OMe$ et le PEG550 ont une efficacité assez similaire, et supérieure à celle de la lame décylée, ce qui confirme ce qui avait été vu par spectroscopie infrarouge. En revanche, on ne retrouve pas le même écart. Alors que, d'après la spectroscopie infrarouge, seuls quelques pourcents de la quantité de BSA qui s'adsorbe sur les surfaces décylée s'adsorbent sur les surfaces fonctionnalisées par le PEG550 et le $C_5(EG)_{16}OMe$, ces dernières ne semblent être que 2 à 4 fois plus efficaces que les surfaces décylées dans cette évaluation. Ces différences sont probablement dues aux modes opératoires distincts pour l'exposition aux protéines : pour l'évaluation par spectroscopie infrarouge, les surfaces sont mises au contact d'une solution de concentration fixée (1 $mg.mL^{-1}$) avant rinçage, et pour l'évaluation par fluorescence, la solution déposée s'évapore et donc se reconcentre et le résidu sec des protéines reste au contact de la surface avant rinçage.

On peut aussi remarquer que toutes les épaisseurs moyennes calculées sont significativement inférieures à l'épaisseur d'une couche complète de BSA, qui serait de 40 Å. Malgré cela, on peut facilement distinguer les différents spots ce qui atteste de la grande sensibilité de la détection par fluorescence. La valeur de 40 Å ne serait obtenue que pour une couche compacte de protéines.

On peut enfin remarquer sur la surface décylée la présence de taches de fluorescence autour des spots. Celles-ci ne peuvent être attribuées qu'à des protéines marquées ayant été enlevées des spots lors du rinçage et qui se sont redéposées sur la surface. La forme de traînée de ces taches est due à l'agitation lors du rinçage qui est assurée par un barreau magnétique et qui entraîne donc toujours dans le même sens la solution de rinçage. Ces traces ne sont pas comptabilisées dans l'évaluation présentée dans les tableaux 4.5 et 4.6. Leur présence est néanmoins significative de l'efficacité des couches moléculaires PEG 550 et $C_5(EG)_{16}OMe$ à limiter l'adsorption non spécifique. En effet, en l'absence de ces molécules, la surface décyle retient des protéines retirées des spots par la solution de rinçage. Au contraire, il n'y a aucune traînée sur les surfaces fonctionnalisées par le PEG550 et le $C_5(EG)_{16}OMe$.

Streptavidine

La figure 4.12 montre des spots avec différentes concentrations de streptavidine déposées sur les trois types de lames avant et après rinçage.

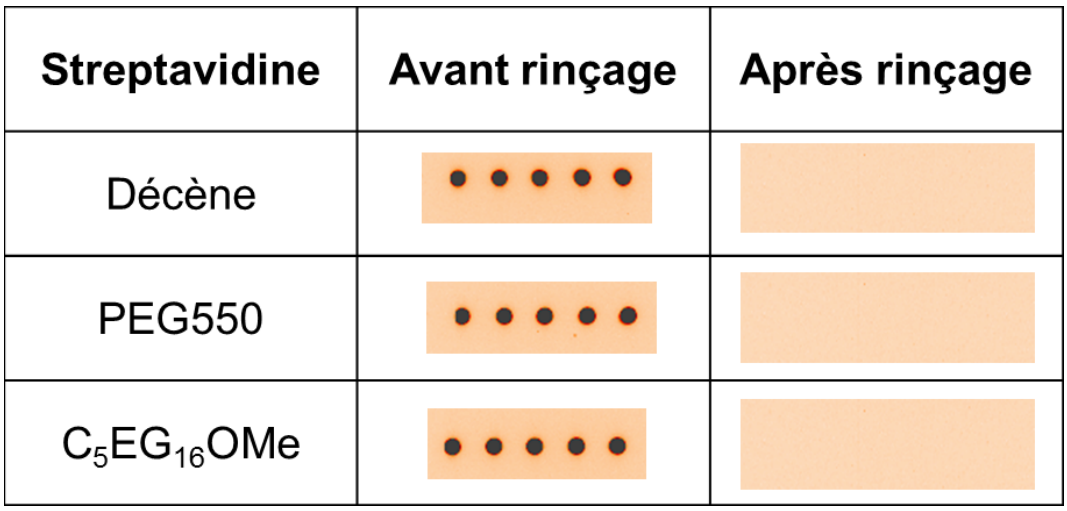

FIGURE 4.12 – Spots de streptavidine à différentes concentrations (de gauche à droite : 2, 1, 0.5, 0.2 et 0.1 mg.mL^{-1}) avant et après rinçage.

La streptavidine ne semble pas s'adsorber de façon significative sur les différentes surfaces étudiées. Le dépôt de streptavidine ne semble donc pas un test très exigeant des capacités des différentes surfaces.

Thrombine

La figure 4.13 montre des spots avec différentes concentrations de thrombine déposées sur les trois types de lames avant et après rinçage.

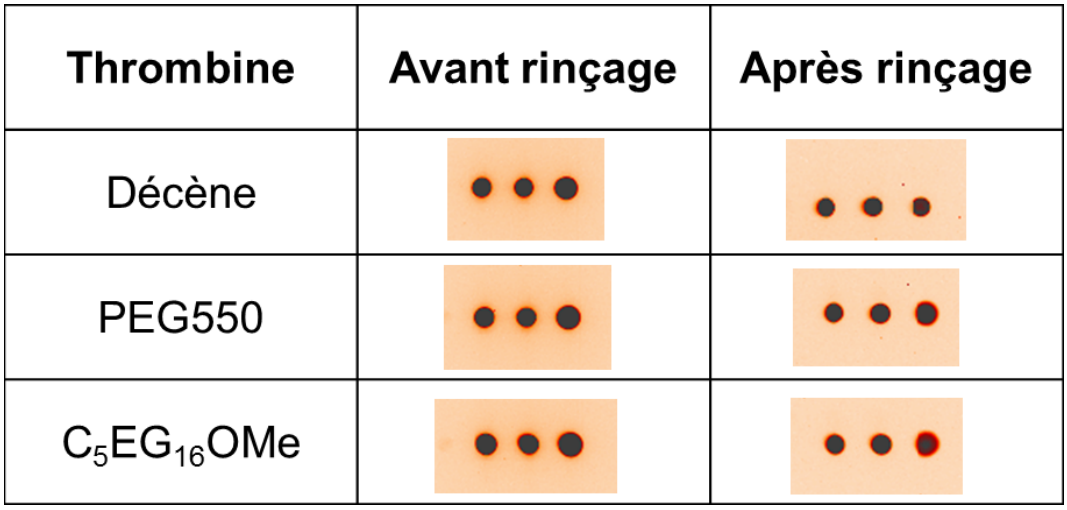

FIGURE 4.13 – Spots de thrombine à différentes concentrations (de gauche à droite : 0.9, 0.3, 0.09 mg.mL^{-1}) avant et après rinçage.

La tableau 4.7 montre la proportion de fluorescence restant sur la surface après rinçage selon les surfaces et les concentrations déposées et le tableau 4.8 montre les épaisseurs moyennes calculées en prenant le volume de la thrombine à 80*100*100 Å^3.

Molécule greffée / Concentration spottée (mg.mL^{-1})	Décène	PEG550	$C_5(EG)_{16}OMe$
0.9	0.016	0.015	0.015
0.3	0.024	0.025	0.023
0.09	0.031	0.035	0.034

TABLE 4.7 – Rapport de l'intensité de fluorescence des spots après rinçage sur l'intensité initiale après exposition à la thrombine.

Molécule greffée / Concentration spottée (mg.mL^{-1})	Décène	PEG550	$C_5(EG)_{16}OMe$
0.9	7.9 Å	7.4 Å	7.4 Å
0.3	4.0 Å	4.1 Å	3.8 Å
0.09	1.5 Å	1.7 Å	1.7 Å

TABLE 4.8 – Epaisseur moyenne des spots de thrombine après rinçage de la lame.

De manière assez surprenante, on ne remarque pas de différences significatives entre la quantité de thrombine restant sur les différentes surfaces. Les épaisseurs moyennes de thrombine restant après rinçage sont similaires à celles obtenues pour la BSA et bien inférieures à une monocouche de thrombine compacte, ce qui pourrait indiquer que toutes les surfaces sont assez efficaces pour limiter l'adsorption non spécifique de thrombine. Une étude infrarouge a aussi été entreprise afin de confirmer ces valeurs. Des surfaces décylées et fonctionnalisées avec des $C_5(EG)_{16}OMe$ ont été mise en contact, entre lame et lamelle, avec une solution de PBS 1X contenant 1mg.mL^{-1} de thrombine (non marquée), puis rincées selon le protocole de rinçage optimisé (voir section 4.3.2). La figure 4.14 montre les spectres obtenus.

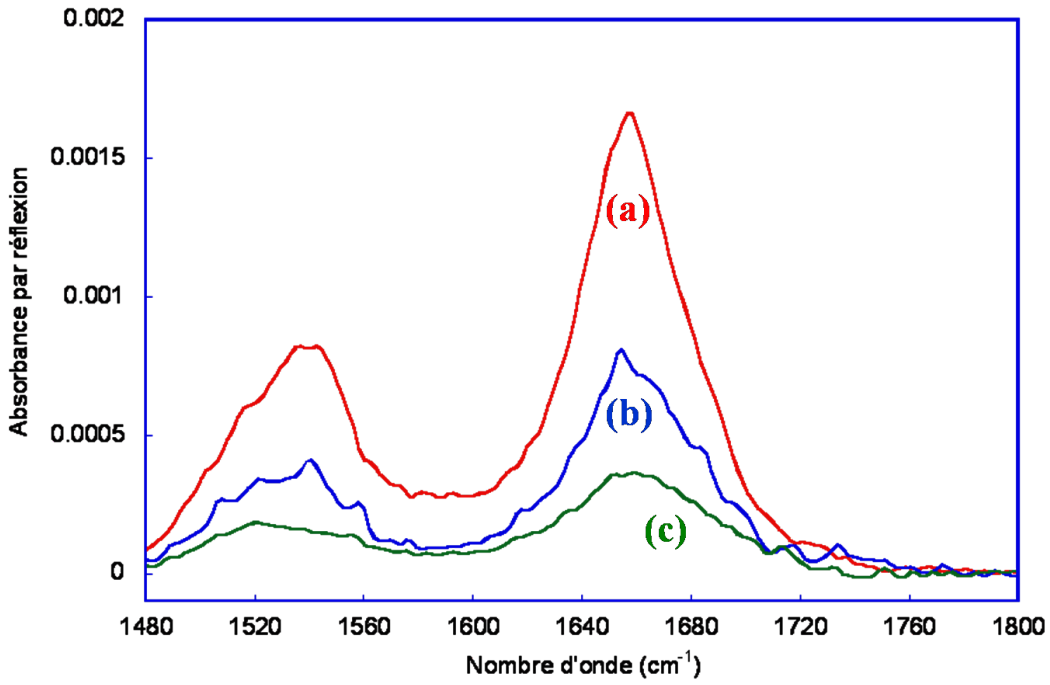

FIGURE 4.14 – Spectres infrarouge de la zone amide de surfaces décylées (b) et $C_5(EG)_{16}OMe$ (c) mises en contact avec une la solution de thrombine. A titre de comparaison, le spectre de la surface décylée après passage dans une solution de BSA de même concentration est fourni (a).

Tout d'abord, on peut remarquer que la thrombine tend à moins s'adsorber sur la surface décylée que la BSA. Le signal amide sur la surface greffées avec des $C_5(EG)_{16}OMe$ est environ 2 fois moins intense que celui de la surface décylée, ce qui montre que la couche moléculaire de $C_5(EG)_{16}OMe$ a un effet non négligeable de limitation de l'adsorption non spécifique, ce qui n'est pas visible dans la mesure de fluorescence. Encore une fois, la méthode de dépôt des protéines dans ce test (avec l'évaporation de la goutte de spotting), tend à maximiser la quantité de protéines adsorbées. Cependant, on ne peut que constater que la surface fonctionnalisée par $C_5(EG)_{16}OMe$ n'est pas totalement efficace pour empêcher l'adsorption non spécifique de la thrombine.

Fibrinogène

La figure 4.15 montre des spots avec différentes concentrations de fibrinogène déposées sur les trois types de lames avant et après rinçage.

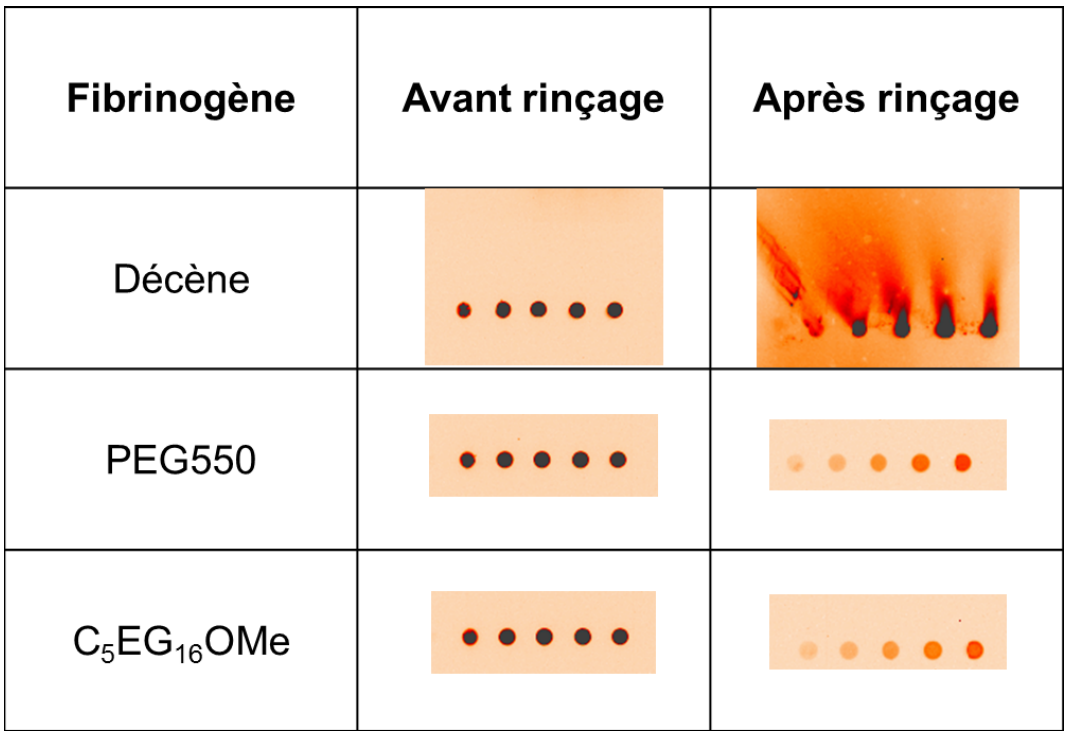

FIGURE 4.15 – Spots de fibrinogène à différentes concentrations (de gauche à droite : 2, 1, 0.5, 0.2 et 0.1 mg.mL^{-1}) avant et après rinçage.

Le tableau 4.9 montre la proportion de fluorescence restant sur la surface après rinçage selon les surfaces et les concentrations déposées et le tableau 4.10 montre les épaisseurs moyennes calculées en prenant le volume du fibrinogène à 475*65*65 Å^3.

Molécule greffée / Concentration spottée (mg.mL^{-1})	Décène	PEG550	$C_5(EG)_{16}OMe$
2	0.015	0.008	0.008
1	0.045	0.011	0.010
0.5	0.20	0.03	0.029
0.2	0.41	0.039	0.041
0.1	0.63	0.050	0.048

TABLE 4.9 – Rapport de l'intensité de fluorescence des spots après rinçage sur l'intensité initiale après exposition au fibrinogène.

Molécule greffée / Concentration spottée (mg.mL^{-1})	Décène	PEG550	$C_5(EG)_{16}OMe$
2	8.7 Å	4.7 Å	4.7 Å
1	13 Å	3.2 Å	2.9 Å
0.5	29 Å	4.4 Å	4.2 Å
0.2	24 Å	2.3 Å	2.4 Å
0.1	18 Å	1.5 Å	1.4 Å

TABLE 4.10 – Epaisseur moyenne des spots de fibrinogène après rinçage de la lame.

Encore une fois, la quantité de protéines restant adsorbées sur les surfaces fonctionnalisées par PEG550 et $C_5(EG)_{16}OMe$ est similaire. En revanche, contrairement à la thrombine, le fibrinogène adsorbe beaucoup plus sur la surface décylée (jusqu'à plus de 13 fois pour la plus faible concentration déposée). En plus, autour des spots de la surface décylée, on retrouve d'importantes traînées de fluorescence, ce que nous avions déjà remarqué pour la BSA. Le fait que ces traînées n'ont pas été comptabilisées dans le calcul de l'épaisseur moyenne de la couche de protéine après rinçage peut expliquer la faible valeur obtenue pour les fortes concentrations. Ces traînées impliquent que les protéines retirées des spots s'adsorbent sur le reste de la surface décylée. Ceci n'est pas particulièrement étonnant car le fibrinogène est une protéine très hydrophobe et qui a donc une tendance particulière à s'adsorber sur une surface alkyle. En revanche, l'absence de ces traînées et la faible intensité des spots après rinçage montrent que les surfaces fonctionnalisées par PEG550 et $C_5(EG)_{16}OMe$ sont très efficaces pour limiter l'adsorption non spécifique du fibrinogène.

4.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons évalué l'efficacité de nos surfaces fonctionnalisées par $C_p(EG)_nOMe$ à limiter l'adsorption non spécifique de protéines. Il a été mis en évidence que des monocouches $C_p(EG)_nOMe$ sont plus efficaces pour de longues chaînes PEG et de courtes chaînes alkyles. La longueur de cette dernière doit tout de même être suffisamment importante pour que la monocouche soit dense, et les surfaces où l'on a greffé le $C_5(EG)_{16}OMe$ se sont avérées les plus efficaces.

Nous avons aussi mis en évidence l'importance des rinçages, à la fois après le greffage pour obtenir des surfaces propres, sans résidus susceptibles d'ancrer des protéines sur la surface, mais aussi après immersion dans une solution de protéines, afin de retirer les protéines faiblement liées à la surface. En utilisant des rinçages dans des solutions salines de SDS, nous avons réalisé des surfaces de silicium fonctionnalisées par $C_5(EG)_{16}OMe$ empêchant totalement l'adsorption non spécifique de BSA. Des études de fluorescence ont montré que cette surface était aussi efficace dans une gamme élargie de protéines, avec la streptavidine, le fibrinogène et, dans une moindre mesure, la thrombine.

Chapitre 5

Immobilisation des sondes

5.1 Introduction

Les chapitres 1 à 4 ont détaillé les procédés utilisés afin d'obtenir des surfaces limitant l'adsorption non spécifique de protéines dans le but de réaliser des puces à protéines hautement sélectives et sensibles. La détection spécifique des cibles de l'échantillon à analyser se fait par reconnaissance biologique entre ces cibles et les molécules greffées sur la surface que l'on appelle sondes. S'il est important dans les puces à protéines de limiter l'adsorption non spécifique des cibles, il est aussi crucial d'assurer une immobilisation correcte des sondes. La méthode couramment utilisée pour fixer les sondes sur la surface d'une puce à protéine consiste à les déposer directement sans se soucier de leur orientation et à laisser réagir ou interagir la surface fonctionnalisée avec les groupements de l'enveloppe externe de la protéine. Ceci peut provoquer la mauvaise orientation et, si l'environnement n'est pas favorable, la dénaturation des protéines, entraînant une diminution de la quantité de sondes efficaces et donc une perte de sensibilité de la puce. Quelques études ont été réalisées pour tenter de limiter la mauvaise orientation et la dénaturation des protéines. Ces études se basent principalement sur des interactions d'affinité très spécifiques entre la surface modifiée et une protéine modifiée (surface avidine et protéine biotinisée [152], surface nickel et protéine marquée par une polyhistidine [22], utilisation de la protéine A pour les anticorps IgG [153]), et l'utilisation d'un modificateur sur la protéine sonde, ou celle utilisée comme intermédiaire de couplage, ne résout pas le problème tant que l'on ne sait pas attacher ce modificateur de façon déterminé sur la sonde, de sorte que le site actif de la sonde reste accessible.

Pour dépasser cette limitation, l'objectif de notre étude est d'utiliser des aptamères afin d'assurer que toutes les sondes présentes sur la surface de la puce soient efficaces. Un aptamère est une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) à simple brin qui peut se replier en une structure tridimensionnelle complexe ayant une affinité particulière avec une cible moléculaire, comme une protéine ou des sites spécifiques de la protéine dans le cas qui nous intéresse. L'immobilisation en surface d'un aptamère particulier peut donc constituer une fonctionnalisation intéressante pour l'immobilisation orientée d'un type de sonde. On peut rendre cette approche générique en utilisant le même aptamère pour toute une classe de sonde lorsque celles-ci présentent un fragment commun reconnu spécifiquement par l'aptamère. Ainsi, par

exemple, l'utilisation d'un seul aptamère, ayant une grande affinité avec la partie invariante des IgG, permettrait d'immobiliser une très large gamme de ces anticorps sur une même puce. Un tel aptamère a été identifié [102], mais il s'agit d'une molécule de type ARN, qui nécessite une manipulation particulièrement délicate. Afin de limiter les incertitudes expérimentales, il nous a paru plus raisonnable de tester l'immobilisation des aptamères et de leurs protéines associées avec la thrombine et ses aptamères ADN. Il s'agit donc dans un premier temps d'immobiliser l'aptamère sur la surface.

Le greffage covalent de molécules d'ADN sur des substrats de silicium a été beaucoup étudié [62; 64; 154]. Une méthode particulièrement pertinente est l'utilisation de monocouches d'acides carboxyliques greffés par hydrosilylation de manière similaire à celle utilisée pour les alcènes. Ces couches d'acides carboxyliques, après activation par N-ethyl-N'-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide (EDC) et N-hydroxysuccinimide (NHS), peuvent immobiliser par amidation des aptamères (ADN simple brin de synthèse terminé par un groupement hexylamine).

5.2 Surfaces Mixtes : acide-PEG

5.2.1 Greffage Acide

Comme il a été montré par d'autres travaux [63; 154–156], l'acide undécylénique ($C_{10}H_{19}COOH$) peut se greffer sur substrat de silicium par hydrosilylation de l'alcène. Dans un Schlenk préalablement dégazé 5 minutes à 100°C, l'acide undécylénique (Acros, pureté : 97%) est introduit puis dégazé à son tour pendant 30 minutes. Le Schlenk est ensuite refroidi à température ambiante pendant 15 minutes avant d'y introduire la surface hydrogénée fraîchement préparée. Une fois l'échantillon introduit, le dégazage continue quinze minutes avant de fermer le Schlenk. Il est alors placé 3 heures dans un réacteur sous irradiation UV (λ=312 nm ; 6 mW.cm^{-2}). L'échantillon est ensuite rincé 2 fois pendant 15 mn à l'acide acétique chauffé à 75°C sous argon [63].

Caractérisation AFM

Comme on peut le voir sur l'image AFM de la figure 5.1, les surfaces ainsi obtenues gardent la structure en marches d'escalier du silicium hydrogéné par NH_4F. Ceci confirme la formation d'une monocouche homogène sur la surface. On note aussi qu'il n'y a pas de résidus physisorbés sur la surface qui soient dus à une contamination ou un mauvais rinçage.

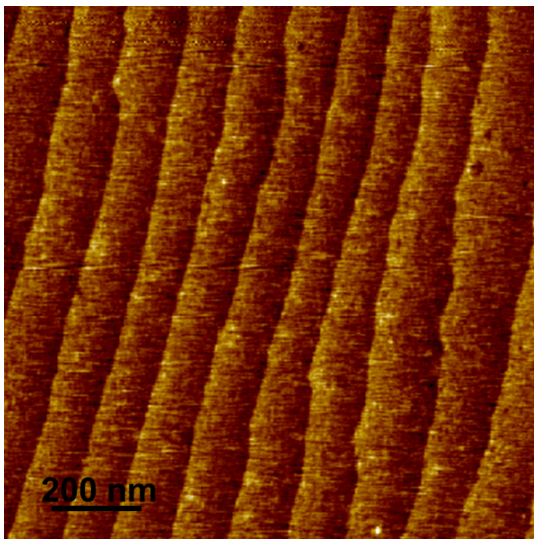

FIGURE 5.1 – Image AFM d'une surface acide après greffage d'acide undécylénique et rinçage dans l'acide acétique chaud.

Caractérisation Infrarouge

Les surfaces acides ont aussi été caractérisées par spectroscopie infrarouge en mode ATR (figure 5.2). On retrouve les pics attendus sur une telle surface [63] :

- élongation de la liaison C-OH à 1290 cm^{-1},
- déformation antisymétrique dans le plan ("scissor") de la liaison C-OH à 1415 cm^{-1}
- déformation antisymétrique dans le plan ("scissor") des groupements CH_2 à 1465 cm^{-1},
- élongation de la liaison C=O à 1715 cm^{-1},
- élongation symétrique et antisymétrique des groupements CH_2 à 2850 et 2920 cm^{-1}.

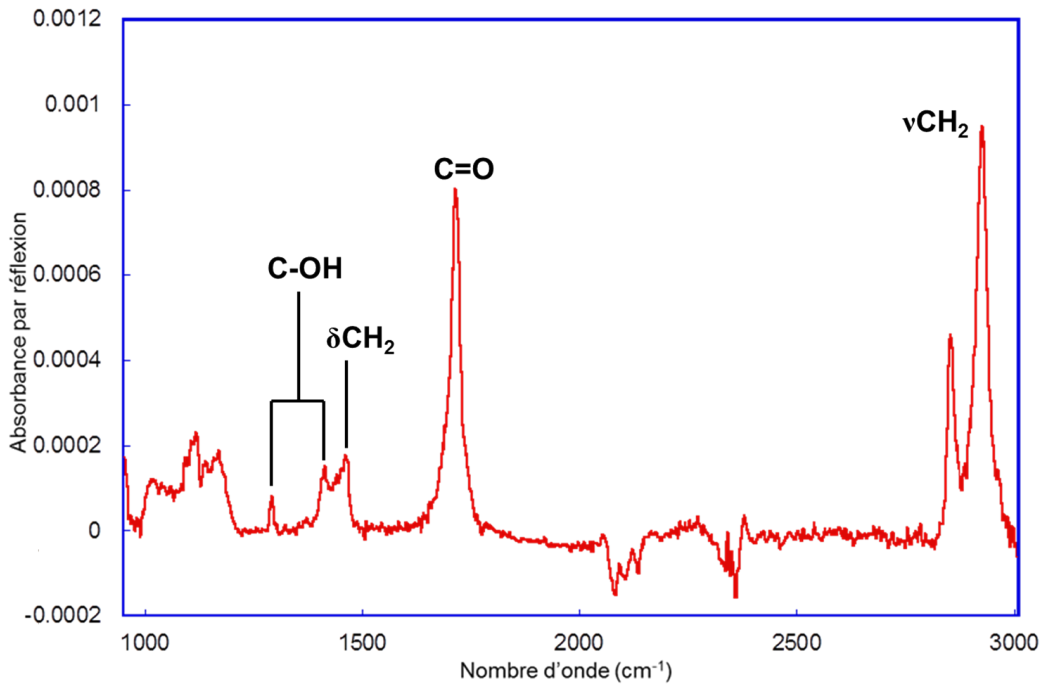

FIGURE 5.2 – Spectre infrarouge d'une surface acide après greffage photochimique d'acide undécylénique et rinçage dans l'acide acétique chaud.

On peut noter aussi la très faible oxydation de la surface (zone 1000-1200 cm^{-1}). Il est par ailleurs possible de déterminer quantitativement la composition de la couche, comme nous l'avons fait dans les chapitres précédents et d'en déduire le taux de greffage, en intégrant l'intensité du pic C=O. En utilisant l'équation déterminée par Faucheux et al. [63], on trouve une densité moyenne de molécules d'environ 2.10^{14} cm^{-2}, soit un taux de recouvrement d'environ 25%. Ce chiffre est similaire à celui déterminé par Moraillon [157] pour les surfaces mixtes obtenues sur les mêmes surfaces par le greffage d'un mélange acide undécylénique/décène.

Afin de tester la résistance de ces surfaces vis-à-vis de l'adsorption non spécifique de protéines, elles ont été immergées pendant 1 heure dans une solution de BSA (1 $mg.mL^{-1}$ dans du PBS 1X). L'ajustement des pics amides dus aux protéines adsorbées apparaissant sur le spectre infrarouge indique qu'environ 75% des protéines s'adsorbant sur une surface décylée s'adsorbent sur ces surfaces acides. Ces dernières ne permettent donc pas de limiter efficacement l'adsorption non spécifique des protéines.

Afin de contourner cet inconvénient des surfaces acides, il nous est apparu intéressant d'évaluer les propriétés de couches moléculaires obtenues en partant d'une solution de greffage contenant un mélange d'acide undécylénique et de PEG 550.

5.2.2 Greffage mixte $C_{10}H_{19}COOH$ - PEG 550

L'utilisation de ces deux produits disponibles commercialement permet d'utiliser exactement le même protocole de greffage que celui décrit dans la section 5.2.1, en remplaçant l'acide undécylénique par un mélange $C_{10}H_{19}COOH$ - PEG 550. Pour ce qui est du rinçage après greffage, des études précédentes ont montré l'importance du

rinçage à l'acide acétique chaud pour empêcher la formation d'une bicouche d'acide avec l'accrochage par liaison hydrogène d'acide undécylénique sur les acides greffées [63]. Cette bicouche non seulement présenterait en surface une chaîne alkyle où les protéines s'adsorberait non spécifiquement, mais aussi empêcherait l'activation ultérieure des acides greffés. Cependant, nous avons aussi vu dans le chapitre précédent l'importance du rinçage après greffage dans la capacité finale de la surface à résister à l'adsorption non spécifique de protéines. Nous avons donc choisi de tester séparément les rinçages à l'acide acétique propres aux surfaces acides et les rinçages éthanol-dichlorométhane propres aux surfaces PEG 550.

Caractérisation infrarouge

La figure 5.3 montre les spectres infrarouge de surfaces greffées dans une solution mixte $C_{10}H_{19}COOH$ - PEG 550 (20/80 v) (a) et (50/50 v) (b) puis rincées dans l'acide acétique selon le protocole de la section 5.2.1, ainsi que le spectre d'une surface greffée dans une solution mixte $C_{10}H_{19}COOH$ - PEG 550 (50/50 v) et rincée dans l'éthanol et le dichlorométhane selon le protocole de la section 1.3.2 (c). Les spectres d'une surface acide pure, présentée dans la section 5.2.1 (d), et d'une surface greffée par du PEG550 pur présentée dans le chapitre 1 (e) sont aussi ajoutés à titre de comparaison.

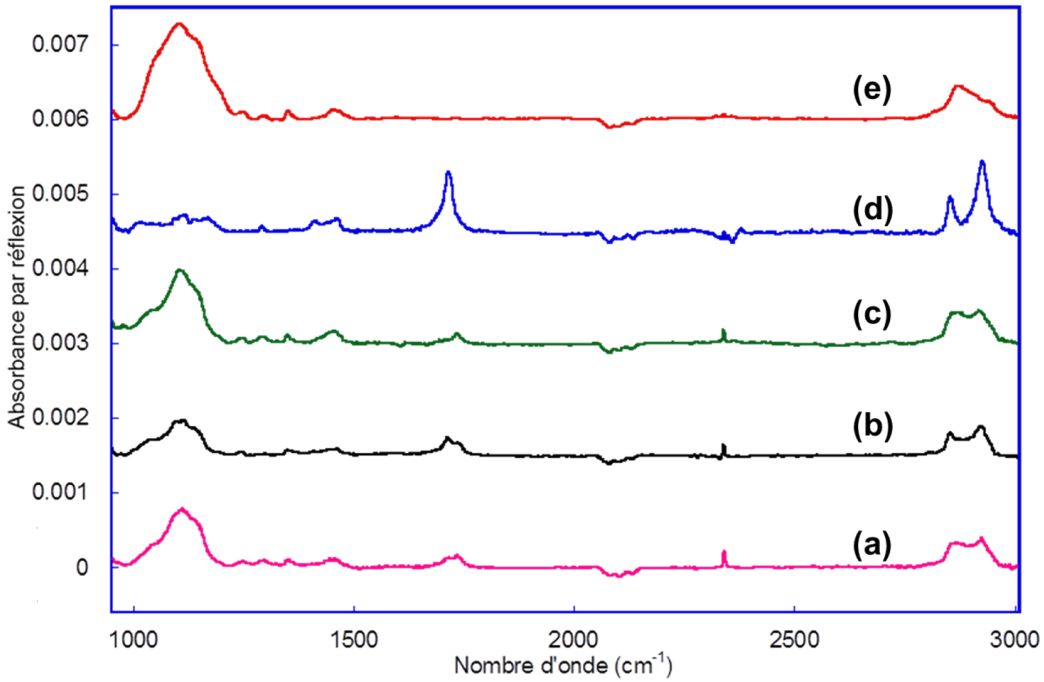

FIGURE 5.3 – Spectres infrarouge de surfaces mixtes acide-PEG avec un taux d'acide dans la solution de greffage de 20% (a) et 50% (b) et après rinçage dans l'acide acétique et d'une surface greffée dans une solution mixte $C_{10}H_{19}COOH$ - PEG 550 (50/50 v) et après rinçage dans l'éthanol et le dichlorométhane (c). On retrouve sur ces deux spectres les pics obtenus sur les surfaces acides pures (d) et les surface PEG pures (e).

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, la présence de PEG à la surface induit

dans le spectre infrarouge une bande asymétrique large dont le maximum est à 2870 cm^{-1} et un pic large associé aux liaisons C-O-C vers 1110 cm^{-1} (voir spectre (e)). La présence d'acide est révélée par la présence d'un pic associé aux groupements carboxyles vers 1715 cm^{-1} et celle de la chaîne alkyle par des vibrations C-H sous la forme d'un doublet bien marqué à 2850 et 2920 cm^{-1} (voir spectre (d)). On retrouve toutes ces caractéristiques dans les spectres (a-c) obtenus après greffage dans les solutions mixtes. Un examen attentif révèle néanmoins un certain nombre d'anomalies par rapport à ce qu'on aurait pu attendre. Lorsque l'on compare les spectres (b) et (c), l'allure des bandes C-H et l'amplitude du pic C-O-C suggèrent qu'il y a moins de PEG sur la surface après rinçage dans l'acide acétique. De façon plus intrigante, le pic caractéristique de l'élongation de la liaison C=O apparaît dédoublé avec une composante centrée en 1715 cm^{-1} (caractéristique d'une surface acide pure) et une composante centrée en 1730 cm^{-1}. Ce pic à 1730 cm^{-1} est d'intensité relative plus importante, par rapport à elui en 1715 cm^{-1} lorsque la proportion de PEG 550 augmente (spectres (a) et (c) par rapport à (b)). Deux hypothèses sont possibles pour expliquer ce dédoublement. Soit la fréquence de vibration de l'élongation des C=O change à proximité d'unités PEG et les deux pics peuvent s'expliquer par la présence de zones où seuls les acides se sont greffés (pic à 1715 cm^{-1}) et de zones où ils sont mélangés avec les PEG (pic à 1730 cm^{-1}), soit il y a présence à la surface de groupement ester provenant de la réaction entre l'acide undécylénique et la fonction alcool du PEG 550.

Afin de déterminer quelle hypothèse est la bonne, la solution de greffage a été analysée par RMN. La figure 5.4 montre les spectres RMN d'une solution de greffage à 50% d'acide undécylénique et 50% de PEG 550 avant et après greffage photochimique. Il n'apparaît aucune différence entre les deux spectres, ce qui implique qu'il n'y a pas eu formation d'ester en solution.

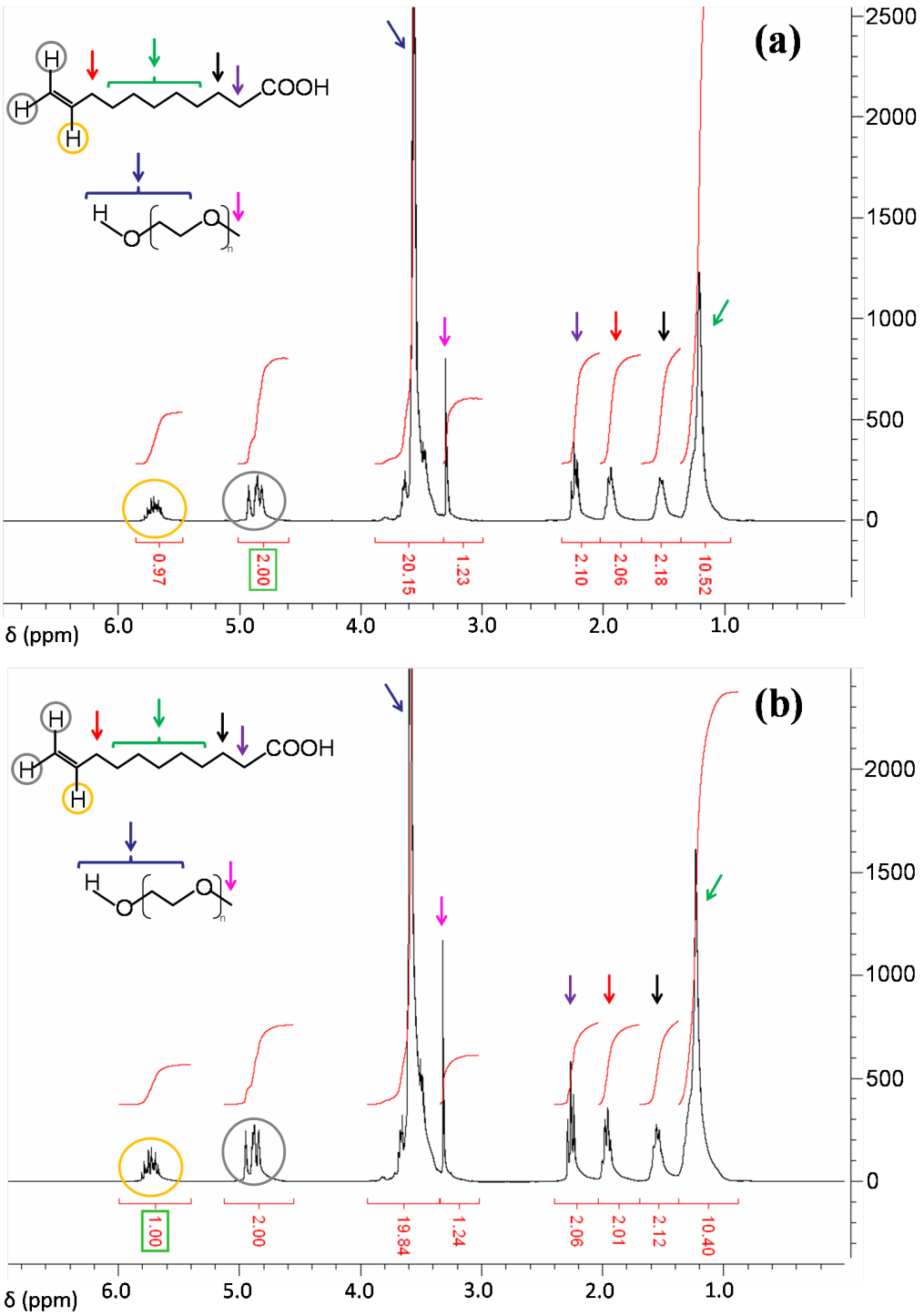

FIGURE 5.4 – Spectres RMN du proton de la solution $C_{10}H_{19}COOH$ - PEG 550 (50/50 v) avant (a) et après (b) greffage.

A titre de comparaison et afin de montrer que cette formation d'ester est possible entre ces molécules, la figure 5.5 montre le spectre RMN d'une même solution après chauffage à 180°C, ce qui correspond aux conditions de nos greffages thermiques. On peut voir apparaître un triplet correspondant aux protons liés au carbone initialement en α de l'alcool du PEG 550 et qui est maintenant voisin du groupement ester . Il y a donc bien eu formation d'un ester entre l'acide carboxylique et l'alcool lorsque le mélange est chauffé à suffisamment haute température.

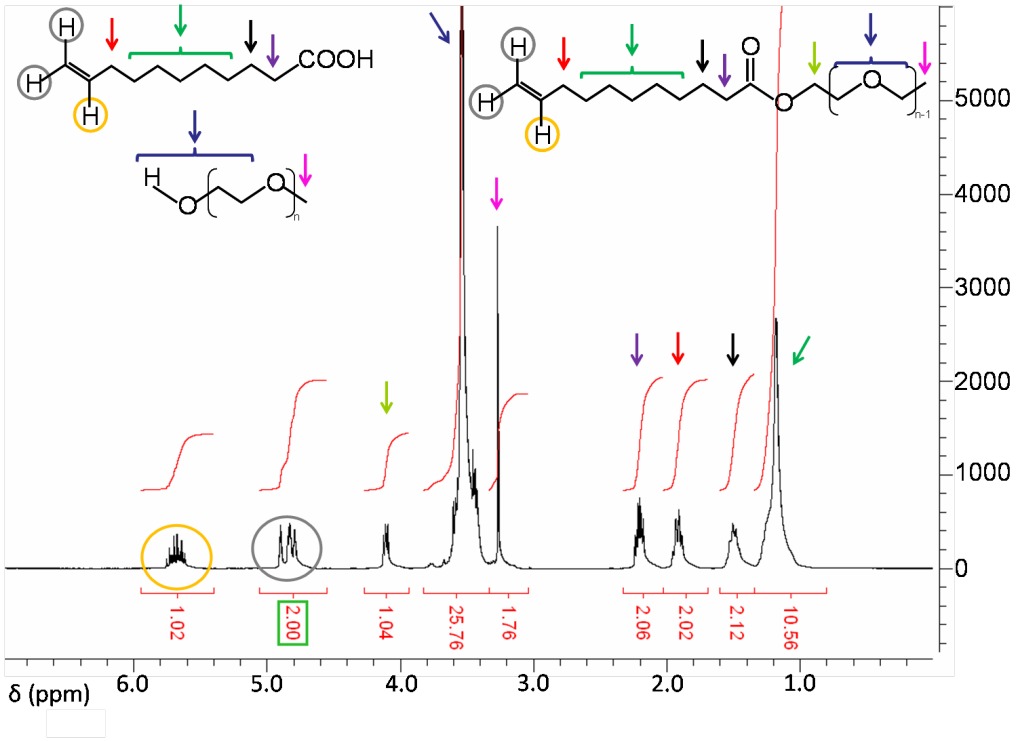

FIGURE 5.5 – Spectre RMN du proton de la solution $C_{10}H_{19}COOH$ - PEG 550 (50/50 v) après chauffage à 180°C. On voit l'apparition du groupement ester à 4,1 ppm.

Cette analyse RMN indique que les conditions des greffages photochimiques employés dans cette étude ne permettent par la réaction entre l'acide et l'alcool.

Afin de vérifier que le dédoublement du pic d'élongation des liaisons C=O est bien dû à la présence d'unités PEG à proximité des groupements acides, nous avons mesuré le spectre infrarouge en transmission d'un mélange acide undécylénique - tetra(éthylène glycol) diméthyl éther (50/50 v). Ce dernier composé posséde des groupements méthyles à ses deux extrémités et ne peut en aucun cas réagir avec l'acide.

La figure 5.6 montre le spectre infrarouge de ce mélange. Outre les pics connus des PEG purs et des acides purs, on retrouve le pic à 1730 cm^{-1}. Comme il ne peut y avoir d'ester dans la solution, il est clair que le pic acide se dédouble en présence des PEG.

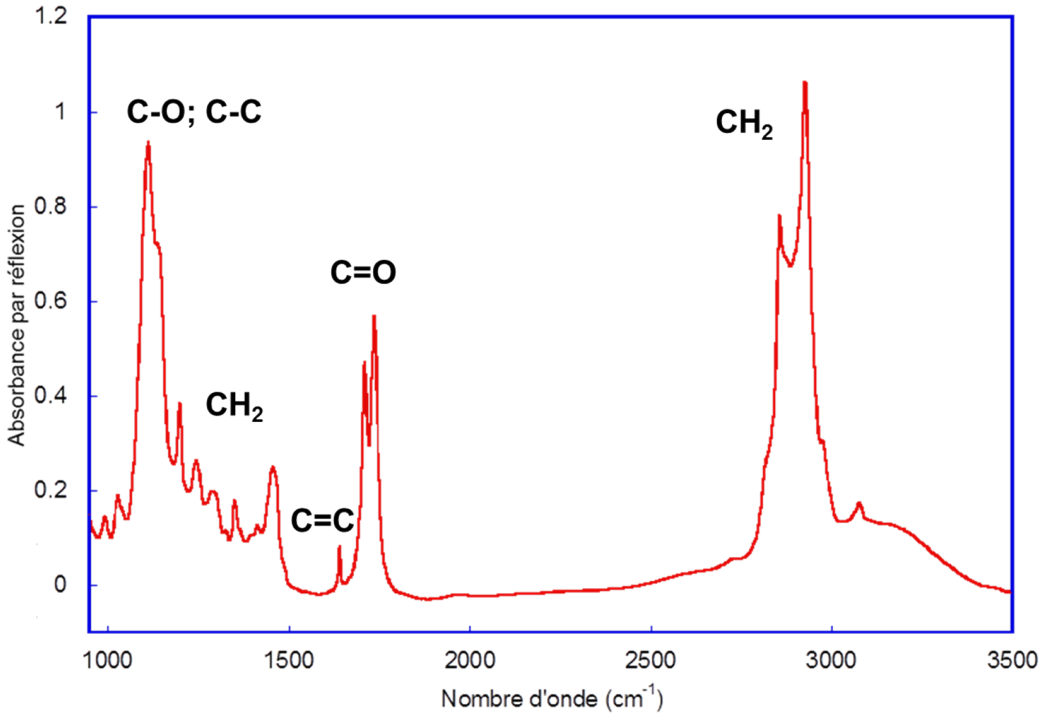

FIGURE 5.6 – Spectre infrarouge en transmission d'un mélange acide undécylénique - tetra(éthylène glycol) diméthyl éther. On y voit apparaître les deux pics à 1715 et 1730 cm^{-1}.

Ces deux tests ont permis de s'assurer que le double pic observé sur les spectres infrarouges peut bien être attribué à l'élongation des liaisons C=O qui vibrent à 1715 ou 1730 cm^{-1} selon leur environnement. Ceci nous indique qu'il semble exister des zones de ségrégation où seuls les acides sont greffés et des zones où acides et PEG sont mélangés. L'augmentation relative du pic à 1730 cm^{-1} lorsque la surface contient proportionnellement plus de PEG 550 est cohérente avec cette image.

On peut tenter d'évaluer la densité de molécules greffées à la fois pour les acides et les PEG. La densité d'acide est obtenue en ajustant les pics d'élongation des C=O. En première approche, on considère l'absorption intégrée correspondant aux deux pics à 1715 et 1730 cm^{-1}, c'est à dire que l'on néglige les éventuels changements de section efficace d'absorption des groupements C=O dans des environnements différents. Les équations de calibration de Faucheux et al. [63] permettent d'obtenir, à partir de l'ajustement des pics d'élongation des C=O, la densité de groupes carboxydécyles sur la surface et de calculer la contribution de ce nombre de groupes carboxydécyles à l'absorption des liaisons C-H dans la zone 2800-3000 cm^{-1}. A partir des spectres, on mesure l'intensité intégrée dans cette zone, on retire la contribution des groupes carboxydécyles calculée et on suppose qu'il ne reste qu'une contribution due aux élongations des groupements CH_2 des PEG 550. On peut ainsi déduire la densité de PEG 550 grâce aux équations 1.18 et 1.19 du chapitre 1. Ces valeurs sont consignées dans le tableau 5.1.

Greffage	Densité d'acide undécylénique	Densité de PEG 550
50% acide (rinçage EtOH/CH_2Cl_2)	6,30.10^{13} (8.1%)	1,32.10^{14} (16.9%)
50% acide (rinçage acide acétique)	1,07.10^{14} (13.7%)	7,42.10^{13} (9.5%)
20% acide (rinçage acide acétique)	6,82.10^{13} (8.7%)	8,28.10^{13} (10.6%)

TABLE 5.1 – Valeurs calculées de la densité d'acide undécylénique et de PEG 550 sur différentes surfaces mixtes.

Ces valeurs sont données à titre indicatif et ne sont que des valeurs grossièrement estimées. En effet, Faucheux et al. ont effectué la calibration de l'absorption des groupes acides que lorsque la vibration C=O ne donne naissance qu'à un pic à 1715 cm^{-1} et les incertitudes introduites par le dédoublement du pic d'élongation des groupements C=O sont difficilement quantifiables. Cependant, il apparaît que le rinçage EtOH/CH_2Cl_2 est plus favorable aux PEG 550 que le rinçage acide acétique. Cette tendance peut être associée à une certaine vulnérabilité des liaisons Si-O-C au rinçage prolongé à l'acide acétique chaud. On peut aussi remarquer pour la surface rincée par EtOH/CH_2Cl_2, que la densité de PEG550 et significativement supérieure à celle de l'acide undécylénique. L'attaque nucléophile des alcools est donc favorisée par rapport à l'hydrosilylation des alcènes, ce qui pourrait expliquer les densités de greffage inférieures trouvées pour les couches moléculaire de $C_p(EG)_nOMe$, par rapport à celles obtenues pour les $H(EG)_nOMe$.

Il est intéressant maintenant d'évaluer la capacité de ces surfaces à résister à l'adsorption non spécifique de protéines et de voir dans quelle mesure les densités relatives des deux espèces et les rinçages après greffage influencent cette capacité.

Tests d'adsorption non spécifique

Pour cela, les différentes surfaces sont immergées pendant 1 heure dans une solution de BSA (1 $mg.mL^{-1}$ dans du PBS 1X) avant d'être rincées dans le PBS et l'eau ultra pure. Ce rinçage n'est pas celui permettant de retirer le maximum de protéines sur la surface, mais il ne s'agit pas ici d'obtenir la couche la plus biorésistante, mais de déterminer des tendances quant à la proportion d'acide et aux rinçages utilisés après le greffage.

La figure 5.7 montre les spectres, après immersion dans la solution de protéines, des trois surfaces mixtes étudiées ainsi que ceux des surfaces, décyles, acides et PEG 500 à titre de comparaison. Le tableau 5.2 résume les valeurs obtenues pour la quantité de BSA adsorbée.

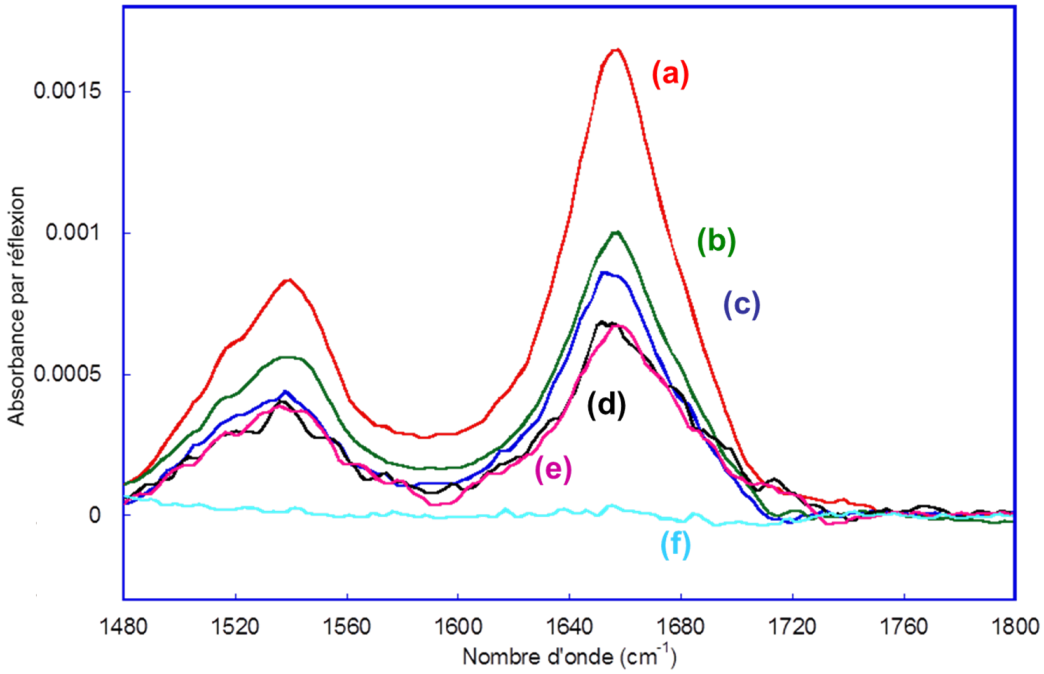

FIGURE 5.7 – Spectres infrarouge après immersion dans une solution de BSA (1 mg.mL^{-1}) de surfaces mixtes acide-PEG avec un taux d'acide dans la solution de greffage de 50% (c) et 20% (d) et rincé dans l'acide acétique et d'une surface greffée dans une solution mixte $C_{10}H_{19}COOH$ - PEG 550 (50/50 v) et rincée dans l'éthanol et le dichlorométhane (e). Les quantités de protéines s'adsorbant sur ces surfaces mixtes sont intermédiaires entre celles s'adsorbant sur les surfaces acides pures (b) et les surface PEG pures (f). Le spectre de la surface décyle (a) après immersion dans la solution de BSA est ajouté à titre de comparaison.

Solution de greffage	acide	(50% acide)	(20% acide)	(50% acide)	PEG 550
Rinçage	Acide acétique			EtOH/CH_2Cl_2	
Quantité de BSA adsorbée	0.75	0.65	0.45	0.4	0.04

TABLE 5.2 – Quantité de BSA adsorbée sur différentes surfaces normalisée par la quantité adsorbée sur une surface décylée.

La comparaison des tableaux 5.1 et 5.2 suggère que l'élément essentiel pour résister à l'adsorption non spécifique est la concentration superficielle de chaînes PEG dans la couche moléculaire. De ce point de vue, le rinçage à l'acide acétique, qui tend à diminuer la quantité de chaînes PEG au sein de la couche greffée apparaît pénalisant.

Cependant, aucune de ces couches moléculaires mixtes n'est parfaitement résistante à l'adsorption non spécifique de protéines et ces tests préliminaires n'ont fait que prouver que des couches mixtes acides-PEG permettaient de réduire cette adsorption non spécifique. Nous avons vu que les PEG 550 ne sont pas les candidats idéaux pour cela à cause de la faible stabilité dans le temps des couches moléculaires formées à partir de liaisons Si-O-C. La stratégie consistant à disperser des groupes carboxydécyles au sein d'une couche PEG à partir d'un mélange par exemple d'acide

undécylénique et de molécules de type $C_5(EG)_{16}OMe$ paraît peu prometteuse. En effet, les résultats précédents avec le PEG 550 montrent qu'il est assez probable que la couche moléculaire ainsi obtenue soit constituée de zones séparées en domaines "acides" et "PEG". Une telle configuration est de façon évidente peu favorable à la limitation de l'adsorption non spécifique, et n'offre pas la possibilité d'ajuster de façon satisfaisante la concentration superficielle en points d'ancrage pour les sondes sur la surface. Si malgré tout la couche obtenue est bien une dispersion homogène de groupes carboxydécyles au sein d'une couche PEG, la longueur bien inférieure des groupes carboxydécyles $C_{10}H_{19}COOH$ par rapport aux chaînes $C_5(EG)_{16}OMe$ risque de rendre inaccessible le groupement acide pour les réactions d'activation et d'amidation nécessaires à l'immobilisation des sondes. Toutes ces observations nous ont amené à considérer des molécules de type $C_p(EG)_nCOOH$, combinant la résistance à l'adsorption non spécifique des PEG et la fonction acide nécessaire à l'immobilisation des sondes, et plus facilement mélangeables aux molécules $C_p(EG)_nOMe$ déjà disponibles.

5.3 Synthèse de $C_p(EG)_nCOOH$: Oxydation de Jones

Comme ces molécules $C_p(EG)_nCOOH$ ne sont pas disponibles commercialement, nous avons synthétisé ces molécules avec des valeurs de p et n proches de celles des molécules $C_p(EG)_nOMe$ qui, lorsqu'elles sont greffées, empêchent l'adsorption non spécifique des protéines.

Pour cela, on peut reprendre le protocole de la synthèse des molécules $C_p(EG)_6OH$ synthétisées dans le chapitre 2 afin de synthétiser des molécules $C_p(EG)_nOH$ que l'on oxyde en $C_p(EG)_{n-1}OCH_2COOH$, par réaction de Jones. Afin de pouvoir réaliser des greffages mixtes avec la molécule formant les couches organiques les plus efficaces contre l'adsorption non spécifique (les $C_5(EG)_{16}OMe$), il faudrait partir d'un poly(éthylène glycol) de masse molaire environ 800 afin de synthétiser des $C_5(EG)_{17}OH$ par couplage avec du bromopentène selon le protocole de la section 2.2. Ce type de poly(ethylène glycol) n'étant pas disponible commercialement, nous avons choisi de synthétiser des $C_5(EG)_{13}OH$ à partir de PEG 600, avec un rendement d'environ 60%. La réaction de Jones permettra d'obtenir des $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$ qui pourront être greffés avec des $C_5(EG)_{12}OMe$, dont les capacités à limiter l'adsorption non spécifique des protéines sont efficaces (environ 5% de protéines restantes par rapport aux surfaces décylées (voir section 4.3.2)).

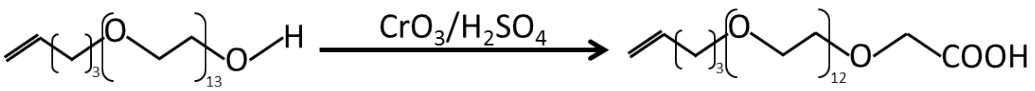

FIGURE 5.8 – Oxydation de Jones

5.3.1 Protocole expérimental

Le réactif de Jones est une solution d'oxyde de chrome (VI) (CrO_3) et d'acide sulfurique (H_2SO_4). Pour obtenir 100 mL de réactif de Jones il faut dissoudre 26,6g

de CrO_3 dans 23 mL de H_2SO_4 et 77 mL d'eau. Cette dissolution est exothermique et produit une solution rouge-orangée.

On introduit 1 équivalent de $C_5(EG)_{13}OH$ dans un bicol surmonté d'un réfrigérant, puis on ajoute de l'acétone, solvant de la réaction (environ 40 mL par gramme de $C_5(EG)_{13}OH$). On ajoute ensuite goutte à goutte 1,3 équivalent de réactif de Jones. Il se forme rapidement un précipité vert de complexe de chrome (III) ($[Cr(H_2O)_6]^{3+}$). La solution est ensuite filtrée, le solvant évaporé et le produit isolé par extractions successives au dichlorométhane. Le rendement de la réaction est d'environ 90%.

5.3.2 Caractérisation RMN

$C_5(EG)_{12}CH_2COOH$: $C_{31}H_{60}O_{15}$.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300MHz) : δ = 1,50 (m, 2H, CH_2=CH-CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2-O) ; 1,96 (m, 2H, CH_2=CH-$\underline{CH_2}$-CH_2) ; 3,37 (t, 2H, -CH_2-$\underline{CH_2}$-O-CH_2-CH_2-) ; 3,5-3,8 (m, 48H, -O-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-O) ; 4,1 (s, 2H, -O-$\underline{CH_2}$-COOH) ; 5,00 (m, 2H, $\underline{CH_2}$=CH-CH_2-) ; 5,70 (m, 1H, CH_2=$\underline{CH}$-CH_2-) ppm.

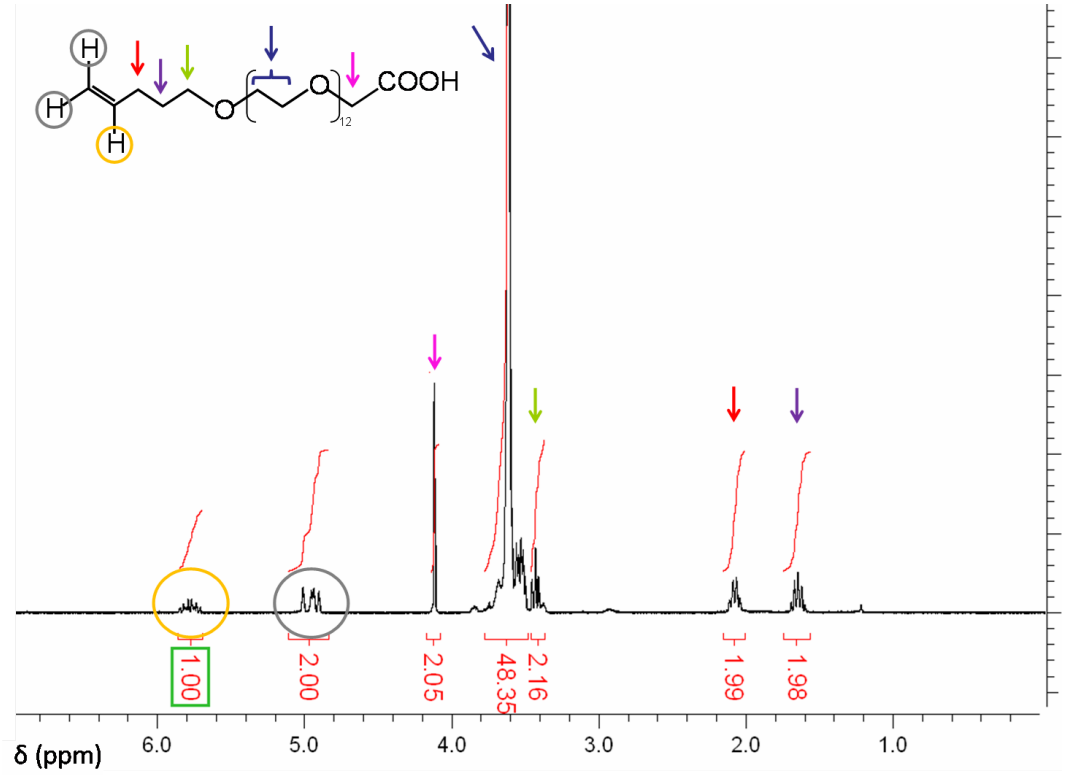

FIGURE 5.9 – RMN du proton du produit obtenu. L'intégration des pics indique que la molécule isolée est le $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$.

5.4 Surfaces $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$

Dans le cas des puces ADN, il a été montré que la dilution des fonctions acides au sein de la couche moléculaire permettait d'obtenir de meilleurs rendements d'hybridation [136; 158]. L'hypothèse avancée est qu'une trop grande densité de groupements acides en surface peut induire une gêne stérique lors de l'immobilisation des

sondes ou de la reconnaissance biologique de la cible. Ainsi, nous avons choisi d'effectuer l'étude de l'activation et de l'amidation de nos fonctions acides sur des surfaces obtenues après greffage dans une solution de toluène distillé à 0,02M de molécules $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$ et 0,08M de molécules $C_5(EG)_{12}OMe$, la concentration totale étant donc de 0,1M. Il est clair que la dilution correspondante des fonctions acides au sein de la couche moléculaire est probablement insuffisante compte tenu de l'encombrement stérique des sondes, mais cette concentration nous permet en revanche de pouvoir continuer à caractériser nos surfaces par spectroscopie infrarouge.

5.4.1 Protocole expérimental

Le greffage est réalisé par voie photochimique selon le même protocole que précédemment, à savoir que la solution de greffage est introduite dans un Schlenk et dégazée à 70°C pendant 10 minutes. On prépare une surface de silicium hydrogénée que l'on introduit dans le Schlenk refroidi à température ambiante. On continue le dégazage pendant 15 minutes avant de placer le Schlenk sous irradiation UV (λ=312 nm, 6 mW.cm^{-2}) pendant 3 heures.

Comme il a été évoqué dans la section 5.2.2, à la fois les rinçages propres aux surfaces acides et ceux propres aux surfaces PEG sont importants dans le protocole afin d'assurer que les acides pourront bien être activés et que la surface soit la plus résistante aux adsorptions non spécifiques de protéines. De plus, dans le cas présent, nous n'avons pas de raison de penser qu'un rinçage à l'acide acétique puisse affecter les liaisons Si-C et diminuer la concentration de molécules greffées à la surface. Il a donc été choisi de les incorporer tous les deux au rinçage de ces surfaces mixtes.

5.4.2 Optimisation du rinçage

Afin de déterminer l'ordre optimal des rinçages, ce qui revient à savoir à quel moment effectuer le rinçage à l'acide acétique chaud, deux protocoles ont été testés. Le premier consiste à rincer la surface à l'acide acétique immédiatement après le premier rinçage dans le toluène. Ceci a pour objectif d'éliminer immédiatement la double couche acide qui pourrait entraver le bon déroulement du rinçage propre au PEG. Le protocole est donc le suivant :

- rinçage dans le toluène : 15 min, 65°C
- rinçage dans l'acide acétique : 2 fois 15 min, 75°C
- rinçage dans l'éthanol : 2 fois 15 min, 65°C
- rinçage dans le dichlorométhane : 5 min
- rinçage dans la solution de SDS 0.1% dans du PBS 1X : 5 min
- rinçage dans le PBS 0.2X : 1 min
- rinçage dans le PBS 0.1X : 1 min
- rinçage dans l'eau ultra pure : 2 min

Le second protocole consiste à réaliser le rinçage acide acétique après ceux à l'éthanol et au dichlorométhane. En effet ces derniers sont capitaux pour éliminer la plus grande partie des PEG non greffées adsorbés sur la surface. Ce deuxième protocole peut se résumer ainsi :

– rinçage dans le toluène : 15 min, 65°C
– rinçage dans l'éthanol : 2 fois 15 min, 65°C
– rinçage dans le dichlorométhane : 5 min
– rinçage dans l'acide acétique : 2 fois 15 min, 75°C
– rinçage dans la solution de SDS 0.1% dans du PBS 1X : 5 min
– rinçage dans le PBS 0.2X : 1 min
– rinçage dans le PBS 0.1X : 1 min
– rinçage dans l'eau ultra pure : 2 min

Dans les deux protocoles, l'échantillon est ensuite séché sous azote. La figure 5.10 montre les images AFM des surfaces obtenues selon le premier protocole (a) et selon le second (b).

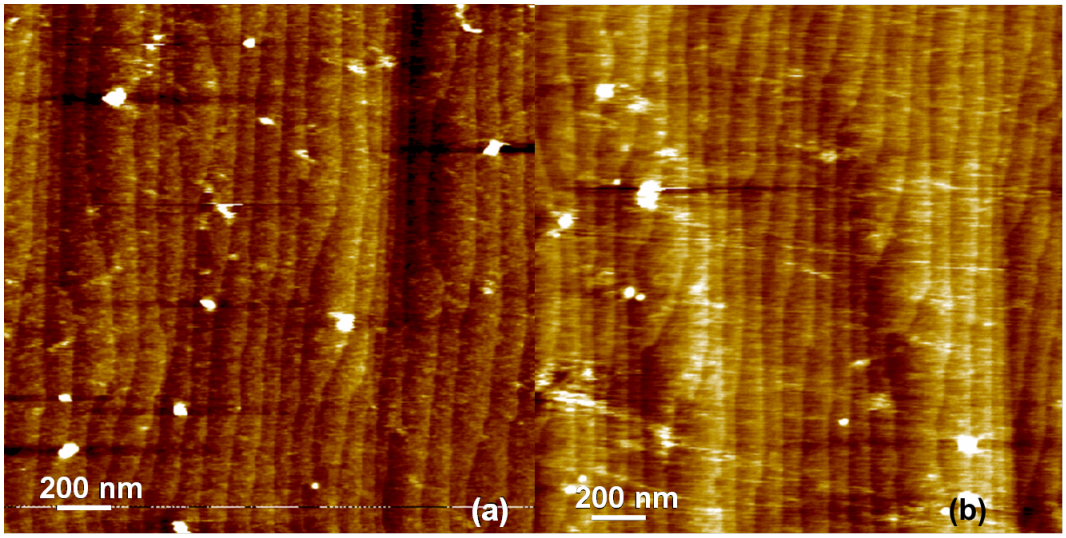

FIGURE 5.10 – Image AFM de surfaces mixtes greffées par $C_5(EG)_{12}CH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$ après rinçage selon le premier protocole (a) et selon le second (b).

Les images montrent des surfaces très similaires et aucun des protocoles ne semble plus favorable que l'autre. On peut voir la présence de résidus sur les deux images mais la structure en marche d'escaliers de la surface de silicium est aussi clairement visible. Ces rinçages ne sont donc pas optimaux mais permettent d'obtenir des surfaces assez satisfaisantes. Pour le reste de l'étude, les surfaces suivantes ont été rincées selon le premier protocole.

5.4.3 Caractérisation infrarouge

La figure 5.11 montre le spectre infrarouge d'une surface greffée par le mélange $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$.

FIGURE 5.11 – Spectre infrarouge d'une surface greffée par le mélange $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$.

On observe tous les pics caractéristiques des molécules $C_p(EG)_nOMe$ que l'on a déjà observés à plusieurs reprises, auxquels vient s'ajouter le pic de l'élongation de la liaison C=O. Celui-ci apparaît sous la forme d'un pic unique à 1730 cm^{-1}, ce qui indique que les molécules $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$ sont mélangées de façon homogène aux $C_5(EG)_{12}OMe$ au sein de la couche moléculaire.

De la même manière que dans la section 5.2.2, nous avons évalué la densité de molécules greffées. Les équations de Faucheux [63] permettent d'obtenir la quantité de groupes carboxydécyles et les équations de la section 3.6 permettent d'obtenir la quantité totale de molécules sur la surface, en considérant que les contributions d'une molécule $C_5(EG)_{12}OMe$ et d'une molécule $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$ sont identiques. Une fois encore, il convient d'être prudent avec ces chiffres car les équations de Faucheux ont été obtenues pour des surfaces purement acides où le signal de l'élongation de la liaison C=O se situe à 1715 cm^{-1}. Les valeurs obtenues sont consignées dans le tableau 5.3.

Densité de $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$	Densité totale de molécules
$5{,}24.10^{13}$ (6.7%)	$1{,}07.10^{14}$ (13.8%)

TABLE 5.3 – Valeurs calculées de la densité de $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$ et de la densité totale de molécule à la surface.

On peut observer que la densité totale de molécules greffées est similaire à celle obtenue lors du greffage du $C_5(EG)_{12}OMe$ (14.8%, voir tableau 3.1), mais aussi que bien que le $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$ ne représente que 20% de la solution de greffage, environ 50% des molécules greffées sont des chaînes $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$. Cette tendance à obtenir des couches plus riches en chaînes acides que la solution de greffage

a déjà été constatée par Faucheux [63] pour des couches mixtes obtenues par greffage dans un mélange de décène et d'acide undécylénique.

5.5 Activation

Comme il a été dit précédemment, les surfaces fonctionnalisées par des acides carboxyliques permettent l'immobilisation covalente de molécules biologiques. Pour cela, l'acide doit être transformé en ester possédant un bon groupe partant afin de faciliter la réaction. Les esters de succinimidyle (figure 5.12) sont utilisés pour réagir avec la molécule biologique comportant un groupement amine [64; 154; 159–161].

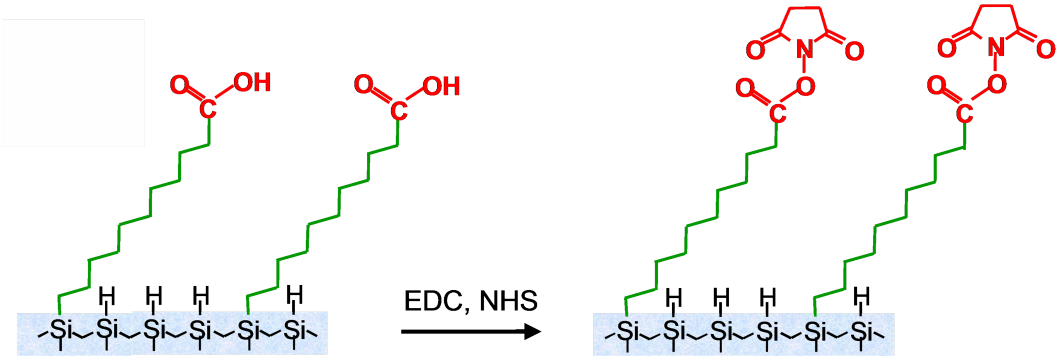

FIGURE 5.12 – Représentation schématique de la réaction d'activation sur une surface acide.

Une telle surface est obtenue par réaction de la surface acide avec un carbodiimide tel que le N-éthyl-N'-(3-(diméthylamino)propyl)carbodiimide (EDC) en présence du N-hydroxysuccinimide (NHS).

Le protocole expérimental utilisé est celui optimisé au laboratoire [162; 163]. Les réactifs EDC et NHS (98% de pureté) sont fournis par Sigma Aldrich. Des solutions sont fraîchement préparées pour chaque réaction avec de l'eau ultra pure stockée dans la glace. Dans un Schlenk préalablement dégazé sous argon pendant 5 minutes dans un bain à 15°C, un volume égal des solutions d'EDC (10^{-2} M) et de NHS (10^{-2} M) est introduit et dégazé 10 minutes pour atteindre la température du bain thermostaté. L'échantillon y est enfin introduit puis laissé pendant 90 minutes. La surface est enfin abondamment rincée à l'eau ultra pure puis séchée sous un flux d'azote.

La fonctionnalisation de la surface lors de l'activation est caractérisée par infrarouge (figure 5.13). En comparant les modes de vibration entre 1650 et 1800 cm^{-1} dus aux liaisons carbonyles C=O, on peut distinguer une surface acide d'une surface activée. Alors que, pour une surface acide, seul le pics à 1730 cm^{-1} apparaît, la surface activée par l'ester NHS se caractérise par l'apparition des deux autres pics. Ces vibrations correspondent essentiellement aux modes de vibration antisymétrique et symétrique νC=O des deux groupes carbonyles du groupement succinimide et au mode de vibration νC=O de l'ester [162].

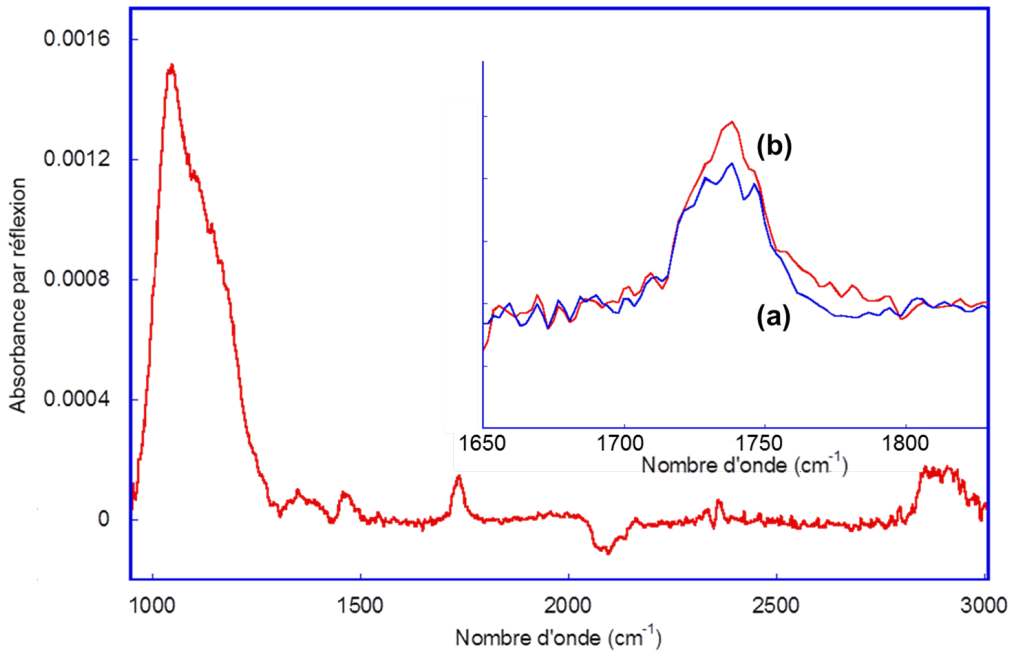

FIGURE 5.13 – Spectre infrarouge d'une surface activée. En encart, on peut voir la zone 1650-1830 cm^{-1} de la surface avant (a) et après activation (b).

La modification du spectre induite par l'activation n'est pas facile à apprécier. En particulier, on n'arrive pas à résoudre la contribution des deux petits modes à 1785 et 1820 cm^{-1}. Seule apparaît une queue dans le pic principal. De la même façon, il est difficile de distinguer l'affaiblissement du mode dû aux groupes acides à 1730 cm^{-1} de l'apparition du mode principal du groupe succinimide à 1740 cm^{-1}. Un dépouillement quantitatif du spectre en vue de déterminer un rendement d'activation paraît hors de portée dans ces conditions.

5.6 Amidation

La dernière réaction du protocole pour attacher une biomolécule de façon covalente à la surface est l'étape d'amidation. Comme le montre la figure 5.14, une (bio)molécule (R) contenant une amine primaire peut réagir avec l'ester activé pour former une liaison amide très robuste [154; 157]. Dans le cadre de cette partie de notre étude, nous avons choisi d'étudier l'amidation en utilisant de l'éthanolamine ($HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_2$).

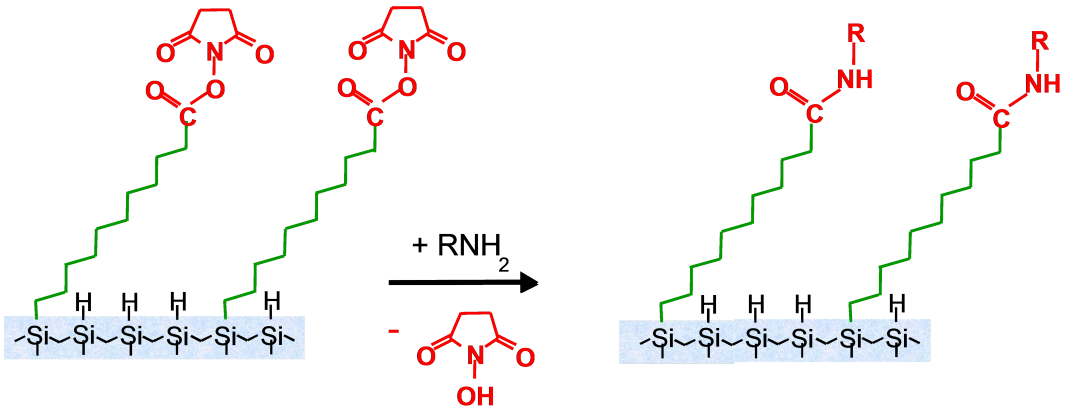

FIGURE 5.14 – Représentation schématique de la réaction d'activation sur sur une surface acide.

Le protocole de la réaction d'amidation par l'éthanolamine est tiré des travaux de Moraillon et al. et Touahir et al. [58; 157]. On laisse réagir, pendant 2 heures à température ambiante, une surface activée dans une solution d'éthanolamine à 5.10^{-2}M, préalablement introduite dans un Schlenk et dégazée. La solution est préparée dans l'eau ultra pure à partir d'éthanolamine à 99,5% fournie par Sigma-Aldrich.

La figure 5.15 montre le spectre de la surface après amidation. Les bandes caractéristiques de l'ester NHS disparaissent au bénéfice des bandes de vibration des liaisons amides I et II (1550 et 1650 cm^{-1}).

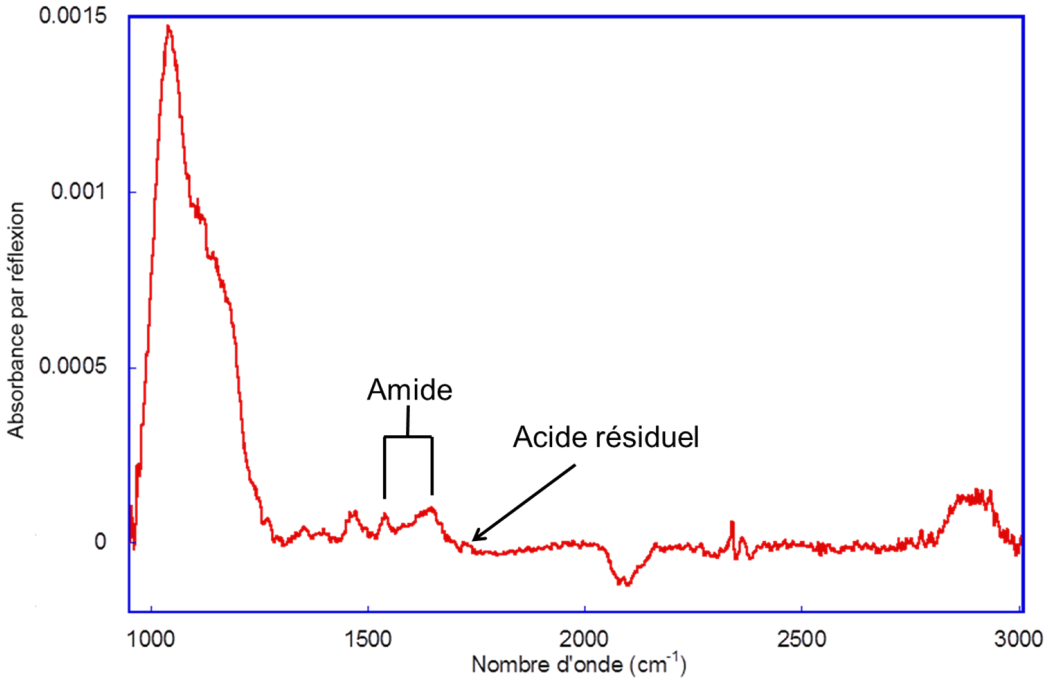

FIGURE 5.15 – Spectre infrarouge d'une surface après amidation.

Le pic résiduel à 1730 cm^{-1} nous permet de calculer un rendement global des réactions d'activation et d'amidation, en comparant l'intégrale de ce signal à celui observé après le greffage (figure 5.11). Le rendement calculé pour l'ensemble de ces deux réactions vaut 90%. Il est du niveau des meilleurs rendements observés sur des

surfaces SiHx [61; 163].

5.7 Test d'adsorption non spécifique

La surface ainsi obtenue est plongée pendant 1 heure dans la solution de BSA (1 mg.mL^{-1} dans du PBS 1X). Elle est ensuite rincée selon le protocole optimisé (5 minutes PBS 1X contenant 0.1% de SDS, 1 minute dans du PBS 0.2X, 1 minute dans du PBS 0.1X et 2 minutes dans l'eau ultrapure). La figure 5.16 montre les spectres infrarouge de la zone amide de la surface obtenue (spectre (b)), ainsi qu'à titre indicatif, le signal infrarouge de BSA adsorbée sur une surface décylée (spectre (a)) et sur une surface fonctionnalisée par $C_5(EG)_{12}OMe$ (spectre (c)). Le spectre de référence utilisé pour le spectre (b) est celui obtenu après amidation de façon à ne comptabiliser que le signal des pics amides provenant des protéines adsorbées.

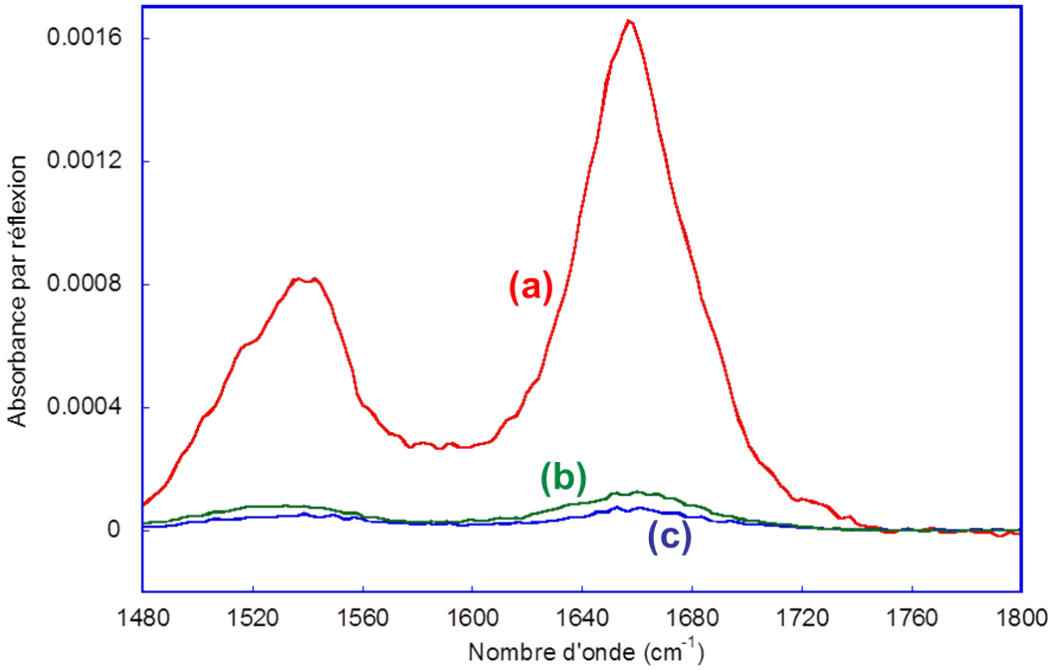

FIGURE 5.16 – Spectre infrarouge après immersion dans une solution de BSA (1 mg.mL^{-1}) de la surface mixte après amidation (b). Le spectre de la surface décyle (a) et celui de la surface $C_5(EG)_{12}OMe$ (c) après immersion dans la solution de BSA est ajouté à titre de comparaison.

Il apparait que la surface mixte $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$ activée et amidée à l'éthanolamine permet, elle aussi, de nettement diminuer l'adsorption non spécifique de la BSA. Les protéines semblent cependant s'adsorber un peu plus que sur une surface fonctionnalisées par $C_5(EG)_{12}OMe$ (8% de la quantité s'adsorbant sur surface décylée, par rapport à 5% pour les couches moléculaires $C_5(EG)_{12}OMe$). La densité totale de molécules de la couche étant sensiblement identique (autour de 1,1.10^{14} molécules.cm^{-2}), on ne peut attribuer la différence qu'à la compostion de la surface. Il est ainsi possible que la présence de l'éthanolamine et celle des acides carboxyliques résiduels entraîne cette adsorption légèrement plus importante.

5.8 Conclusion

Les surfaces acides sont le point de départ de l'accrochage covalent de biomolécules sur silicium et leur fabrication est donc nécessaire pour immobiliser les sondes de nos biopuces. Dans ce chapitre, nous avons montré qu'il est possible de réaliser des greffages mixtes acides-PEG afin de donner aux couches moléculaires en surface la capacité à immobiliser une sonde, via un séparateur porteur d'une fonction amine, tout en conservant une capacité à prévenir l'adsorption non spécifique des protéines. Il s'agit maintenant d'amider les terminaisons acides de ces couches moléculaires greffées en surface avec les sondes et de transférer ce protocole aux surfaces de silicium amorphe déposé sur lame de verre afin de pouvoir détecter la reconnaissance biologique.

Chapitre 6

Optimisation des sondes

Le chapitre précédent a détaillé un protocole permettant d'immobiliser de façon covalente des molécules biologiques terminées par une fonction amine sur les surfaces de silicium, tout en conservant une bonne limitation de l'adsorption non spécifique des protéines. Ce protocole semble donc un excellent candidat pour l'immobilisation orientée des sondes de nos puces à protéines. L'objectif de notre étude est d'utiliser des aptamères afin d'assurer que toutes les sondes présentes sur la surface de la puce présentent la même activité.

Un aptamère est une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) à simple brin qui peut se replier en une structure tridimensionnelle complexe ayant une affinité particulière avec une cible moléculaire, comme une protéine ou une partie de protéine dans le cas qui nous intéresse. Ces aptamères sont sélectionnés à partir de vastes bibliothèques pouvant contenir jusqu'à 10^{16} séquences différentes par une procédure appelée SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment), comprenant plusieurs étapes de sélection et d'amplification de séquences initialement synthétisées de manière aléatoire. Seuls les aptamères se liant le plus fortement à la cible choisie sont amplifiés à chaque étape. Ainsi, des aptamères pour plus d'une centaine de cibles ont été identifiés avec une grande spécificité et une affinité variable comprise dans une gamme allant du micromolaire au picomolaire, ce qui fait des aptamères des outils intéressants pour la reconnaissance fiable et précise de molécules [98–101].

L'utilisation d'aptamères est aussi extrêmement intéressante pour l'immobilisation d'anticorps. En effet, si un aptamère reconnaît la partie invariante d'un type d'anticorps comme l'IgG, on peut immobiliser toute une gamme d'anticorps dans une configuration laissant accessible leur épitope. Ceci doit permettre la détection d'une grande variété d'antigènes avec différents épitopes. Un tel aptamère a été identifié pour l'IgG de lapin [102], mais il s'agit d'un ARN dont la manipulation est délicate et qui n'est donc pas le meilleur candidat pour les tests préliminaires de nos biopuces. Nous avons donc choisi de travailler sur un système modèle basé sur la reconnaissance de la thrombine par divers aptamères. Ce choix peut paraître audacieux, car les couches moléculaires que nous avons développées ne permettent pas d'empêcher totalement l'adsorption non spécifique de la thrombine (contrairement aux autres protéines étudiées), mais l'existence de nombreux aptamères anti-thrombine ayant

des constantes de dissociation variant sur une large gamme et le fait que l'association thrombine-aptamère soit déjà bien décrit dans la littérature [99; 101; 164–167] permettront une étude plus complète de la reconnaissance en surface. Ainsi, nous avons choisi d'immobiliser plusieurs aptamères anti-thrombine dont les séquences et les constantes de dissociation sont regroupées dans le tableau 6.1.

Aptamère	Séquence (5'→3')	K_d
Trh1	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT	0.5 nM
Trh2	GTGAATAGGTAGGGTATGGGCTACGGT	> 1000 nM
Trh3	CTACCGTGGTAGGGAAGGTTGGAGTGTAG	30 nM

TABLE 6.1 – Séquences des différents aptamères de la thrombine utilisés.

L'aptamère appelé Trh1 a été utilisé dans plusieurs études [166; 168]. Pour la nôtre nous avons utilisé un Trh1 modifié par un espaceur hexyle et terminé par une fonction amine afin de permettre son immobilisation ([5' NH_2-$(CH_2)_6$-Trh1 3'] où Trh1 correspond à la séquence notée dans le tableau 6.1). Sa constante de dissociation K_d mesurée en solution est 0,5 nM. Nous avons aussi utilisé deux autres variations de Trh1, l'un possédant un espaceur aminododécyle ([5' NH_2-$(CH_2)_{12}$-Trh1 3'] appelé Trh1-C12) et l'autre possédant 15 thymines supplémentaires en bout de séquence ([5' NH_2-$(CH_2)_6$-TTTTTTTTTTTTTTT-Trh1 3'] appelé Trh1-T15). Deux autres aptamères ont aussi été utilisés. Trh2 ([5' NH_2-$(CH_2)_6$-Trh2) 3'] a une constante de dissociation K_d supérieure à 1000 nM et Trh3 ([5' NH_2-$(CH_2)_6$-Trh3 3']) a une constante de dissociation K_d de 30 nM. Les variations avec espaceur dodécyle et séquence T15 supplémentaire ont aussi été utilisées pour ces deux aptamères (Trh2-C12, Trh2-T15, Trh3-C12 et Trh3-T15). Nous avons décidé d'utiliser deux tailles d'espaceurs et la séquence supplémentaire de thymine afin d'observer si l'aptamère est gêné dans son repliement lorsqu'il est trop proche de la couche moléculaire. La constante de dissociation d'un aptamère avec sa cible est égale à la concentration de cibles qu'il faut avoir en solution pour avoir un nombre équivalent d'aptamères associés et d'aptamères non associés. Il est donc raisonnable de penser qu'à partir de cette concentration, on pourra détecter la reconnaissance aptamère-protéine. Cependant, les valeurs indiquées ci-dessus ont été déterminées en solution et il est probable qu'elles ne soient pas les mêmes pour des aptamères immobilisés sur une surface.

6.1 Optimisation du protocole d'immobilisation et de reconnaissance sur des lames commerciales

Ces incertitudes quant au repliement des aptamères et à leur constante de dissociation en surface nous ont amenés à vouloir optimiser le protocole d'immobilisation et de reconnaissance sur des lames commerciales avant de le tranférer sur nos lames. Pour cela, nous avons utilisé des lames "Nexterion Slide H" de la société Schott (appelées "Slide H" dans la suite de ce texte). Ces lames sont recouvertes d'un gel tridimensionnel de PEG afin de limiter l'adsorption non spécifique. Des groupements succinimides sont dispersés au sein du gel afin d'immobiliser les sondes de façon co-

valente par réaction d'amidation avec les groupements amines de l'enveloppe externe des protéines sondes. A ce titre, ces lames sont donc relativement similaires aux nôtres et sont orientées vers la détection de protéines.

6.1.1 Optimisation de la réaction d'amidation

Le gel riche en groupements succinimides des "Slide H" est prêt à recevoir les aptamères aminés qui peuvent être déposés par une technique de dépôt localisé automatisé ("spotting"). Dans un premier temps, nous avons spotté sur deux lames différentes les aptamères Trh1, Trh2 et Trh3 à 20 μM ainsi que des spots témoins d'oligomères Gab marqués à la cyanine 5 (GabCy5) et terminés à l'autre extrémité par une chaîne aminohéxyle. Ces témoins permettent de nous assurer du bon déroulement du spotting et de l'amidation. Le tampon préconisé par Schott pour le spotting d'ADN est constitué d'une solution de phosphate de sodium à 300 mM contenant 0,005% de Tween 20 et 0,001% de sarkosyl, que l'on appellera PBS-TS. Cependant, de nombreuses études ont été réalisées au laboratoire avec un tampon phosphate à 150 mM contenant 0.01% de SDS (P-S). Nous avons donc décidé de réaliser différentes lignes de spots dans ces deux tampons. Le spotting est effectué par une machine Biorobotics Microgrid II. Après le spotting, la lame 1 est introduite dans un dessiccateur à un taux d'humidité de 75% pendant 3 heures selon le protocole conseillé par Schott. La lame 2 est laissée pendant la nuit dans le spotteur. Les lames sont ensuite scannées sur le scanneur DiagArray.

La figure 6.1 montre les images obtenues à l'issue du spotting.

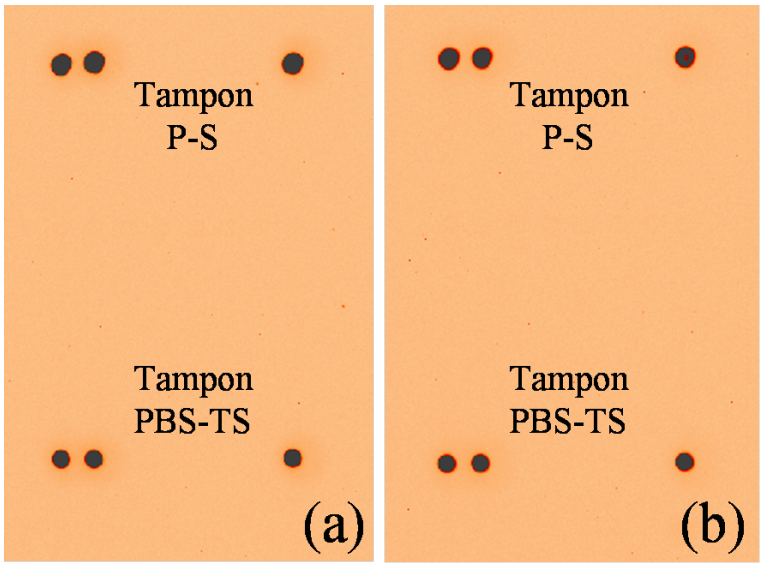

FIGURE 6.1 – Imagerie de fluorescence (Cy5) des lames "Slide H" après spotting. La lame 1 (image (a)) a été placée dans un dessiccateur à 75% d'humidité pendant 3 heures, tandis que la lame 2 (image (b)) a été laissée pendant la nuit dans le spotteur. Temps d'exposition : 1 seconde.

On peut clairement voir les spots témoins de GabCy5, et à ce stade les deux tampons donnent des résultats comparables.

Les sites actifs des lames n'ayant pas réagi sont ensuite bloqués par réaction d'amidation avec de l'éthanolamine. Pour cela, les lames sont plongées dans une solution de 50 mM d'éthanolamine dans du borate de sodium à 50 mM (solution conseillée par Schott) pendant une heure avant d'être rincées 5 minutes dans l'eau ultrapure. Les lames sont ensuite de nouveau scannées (figure 6.2).

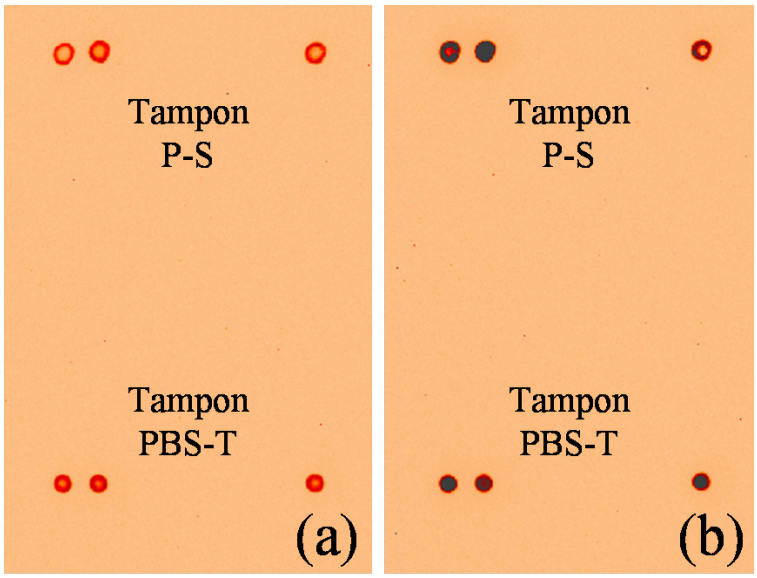

FIGURE 6.2 – Imagerie de fluorescence (Cy5) des lames "Slide H" après blocage. La lame 1 (image (a)) a été placée après spotting dans un dessiccateur à 75% d'humidité pendant 3 heures, tandis que la lame 2 (image (b)) a été laissée pendant la nuit dans le spotteur. Temps d'exposition : 1 seconde.

Bien que les spots témoins soient toujours clairement visibles, la fluorescence est beaucoup plus intense sur la lame 2, ce qui semble indiquer que l'amidation a été plus complète sur la lame laissée dans le spotteur pendant la nuit. Il est aussi visible que les spots témoins du bas de la zone spottée sont plus homogènes et moins étalés, ce qui suggère que le tampon phosphate de sodium à 300 mM contenant 0,005% de Tween 20 et 0,001% de sarkosyl préconisé par Schott est plus approprié sur ces lames.

Enfin, différentes zones spottées des lames sont mises en contact avec des solutions de PBST (PBS 1X contenant 0,005% de Tween 20) contenant différentes concentrations (10 nM, 50 nM et 3 μM) de thrombine marquée à l'Alexa Fluor 647 (voir section 4.4.3) pendant 3 heures à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées deux fois 10 minutes dans du PBST, puis 10 minutes dans du PBS 1X, avant d'être une nouvelle fois scannées (figure 6.3).

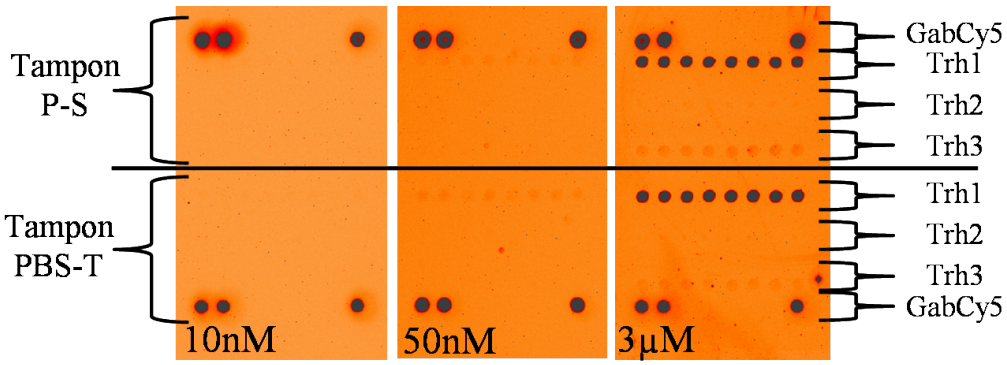

FIGURE 6.3 – Imagerie de fluorescence (Cy5) des lames "Slide H" après immersion dans la solution de thrombine marquée à différentes concentrations (10 nM, 50 nM et 3 μM). Temps d'exposition : 10 secondes.

Pour une concentration de thrombine marquée de 10 nM, il est impossible de distinguer la moindre reconnaissance entre la thrombine et les différents aptamères. Alors que ceci est normal à la vue des K_d de Trh2 ($>$ 1000 nM) et Trh3 (30 nM), on se situe à une concentration supérieure au K_d de Trh1 (0.5 nM). De même, pour une concentration de thrombine marquée de 50 nM, on n'observe pas de reconnaissance entre l'aptamère Trh3 et la thrombine, tandis que l'on commence à deviner des spots de fluorescence au niveau des aptamères Trh1. Ceci confirme que les K_d déterminés en solution ne sont pas valables pour une reconnaissance en surface. Pour une concentration de 3 μM, on peut voir que la thrombine a été reconnue par les aptamères Trh1 et Trh3, mais le K_d de Trh2 ne semble pas encore avoir été atteint. La figure 6.4 montre l'intensité de la fluorescence mesurée sur les différents spots après mise en contact avec la solution de thrombine marquée à 3 μM.

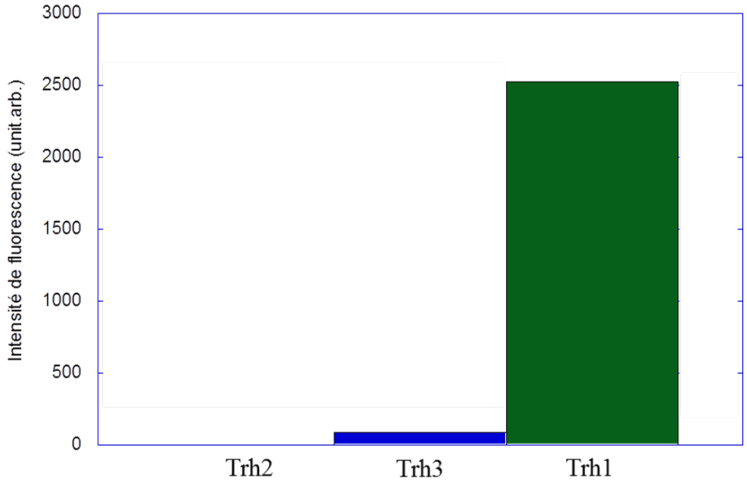

FIGURE 6.4 – Diagramme de l'intensité de fluorescence au niveau des spots des différents aptamères. L'intensité de fluorescence montrée est relative à celle du bruit de fond.

On peut observer une forte reconnaissance de la thrombine à 3 μM par l'aptamère Trh1, tandis qu'il semble que le K_d de Trh3 en surface soit proche de 3 μM

(contrairement au 30 nM annoncées en solution). Ainsi, pour la suite de l'étude, la reconnaissance se fera toujours dans des solutions à 3 μM de thrombine marquée.

6.1.2 Effet de la proximité de l'aptamère à la surface.

Afin d'évaluer l'influence de la longueur de l'espaceur sur la capacité de l'aptamère à reconnaître sa cible, nous avons spotté sur différentes lignes les aptamères Trh1, Trh1-T15, Trh2-T15, Trh3-T15 et Trh1-C12 (20 μM dans le tampon PBS-TS). La lame est laissée dans le spotteur pendant la nuit, puis les sites non amidés sont bloqués à l'éthanolamine (50 mM dans une solution à 50mM de borate de sodium) pendant une heure et la lame est rincée 5 minutes dans l'eau ultrapure. La zone spottée de la lame est ensuite mise en contact avec une solution de PBST contenant 3 μM de thrombine marquée à l'Alexa Fluor 647 pendant 3 heures à température ambiante avant d'être scannée (figure 6.5). La figure 6.6 montre l'intensité de la fluorescence mesurée sur les différents spots.

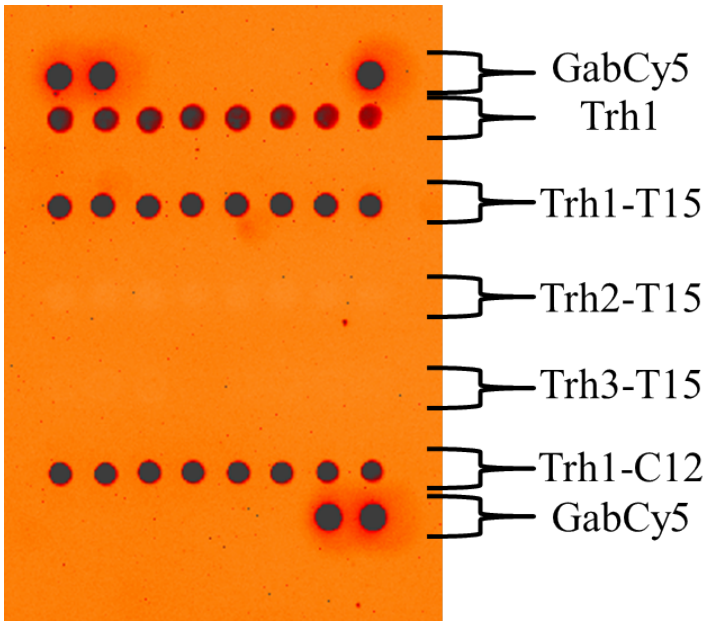

FIGURE 6.5 – Imagerie de fluorescence (Cy5) des lames "Slide H" après immersion dans la solution de thrombine marquée (3 μM). Temps d'exposition : 10 secondes.

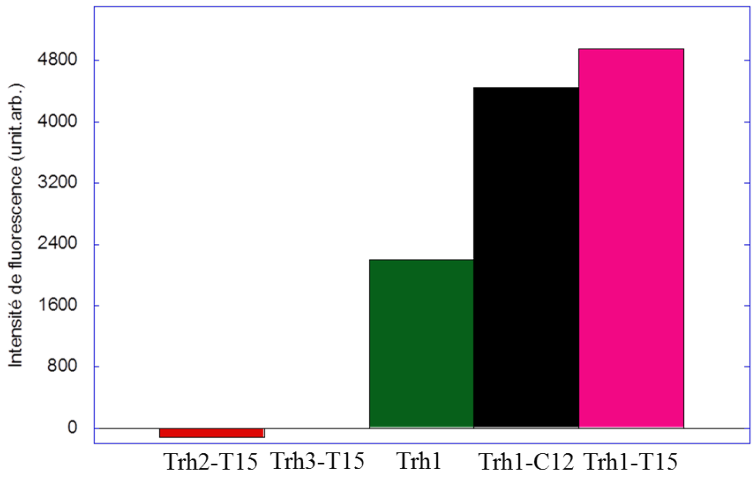

FIGURE 6.6 – Diagramme de l'intensité de fluorescence au niveau des spots des différents aptamères. L'intensité de fluorescence montrée est relative à celle du bruit de fond.

On constate que plus l'aptamère Trh1 est éloigné de la surface, plus l'intensité de fluorescence détectée est grande. Les effets optiques dus à la variation de la distance fluorophore/surface sont négligeables dans ce cas (variations de distance faibles par rapport aux longueurs d'ondes, faible reflectivité du substrat). On peut donc supposer que cette augmentation est réellement due à une meilleure reconnaissance biologique. Ceci implique que plus Trh1 est éloigné de la surface, plus il est à même de se replier dans sa conformation tridimensionnelle souhaitée.

Malgré l'allongement de l'espaceur, le fait que les aptamères soient immobilisés sur une surface conserve un effet notable. Ainsi, on ne peut pas distinguer la fluorescence au niveau des spots de Trh3-T15 de celle du reste de la lame (bruit de fond), et de même celle détectée au niveau de Trh2-T15 est même légèrement inférieure au bruit de fond. Ces espaceurs ne suffisent pas à redonner aux aptamères une constante de dissociation proche de celle mesurée en solution. Le temps nous a manqué pour savoir s'il faut interpréter ce résultat comme un déplacement de l'équilibre association/dissociation (changement de K_d), ou s'il s'agit d'un effet inhibant principalement l'association, et qu'une fois l'association faite (à forte concentration) la dissociation ne sera observée qu'à des concentrations nettement inférieures.

6.2 Protocole d'obtention d'une puce à protéine

La figure 6.7 montre l'architecture des puces à protéines que nous voulons tester.

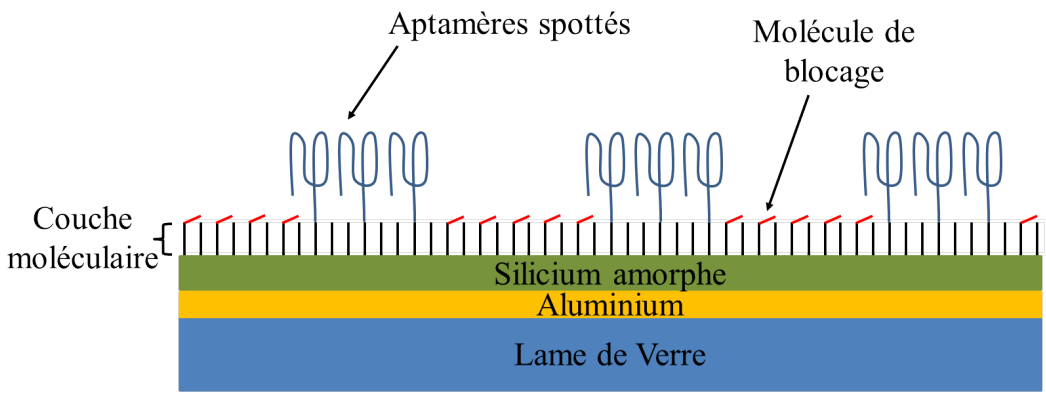

FIGURE 6.7 – Architecture de nos puces à protéines

Le protocole d'obtention d'une telle puce est le suivant :

- Nettoyage de la lame de verre au détergent puis au piranha, puis séchage sous azote
- Dépôt du réflecteur
- Dépôt du silicium amorphe
- Greffage et rinçage de la couche moléculaire
- Activation des acides en surface
- Dépôt par spotting des sondes
- Blocage des sites activés n'ayant pas réagi

6.2.1 Dépôt du réflecteur

Dans le chapitre 4, nous avons utilisé des lames Amplislide de Genewave pour les tests de limitation d'adsorption non spécifique de nos couches moléculaires. Ces lames sont optimisées pour amplifier la fluorescence émise à leur surface. Cependant, comme les épaisseurs des différentes couches au dessus du réflecteur peuvent être assez importantes, les fluorophores risquent de se retrouver dans le creux d'interférences et l'utilisation de ces lames n'apporterait alors pas nécessairement un gain significatif. C'est pourquoi nous avons décidé de déposer sur nos lames une couche d'aluminium d'épaisseur environ 70 nm qui, lorsqu'elle est recouverte d'une couche de silicium amorphe d'épaisseur bien choisie, permet une amplification sensible de la fluorescence [64]. Pour cela, les lames sont introduites dans une chambre sous vide (2.10^{-5} torr) et de l'aluminium est placé sur un filament de tungstène. On applique un courant dans le filament qui permet l'évaporation de l'aluminium par effet Joule. L'aluminium se dépose alors de façon homogène sur les lames.

6.2.2 Dépôt du silicium amorphe

De la même manière, nous avions, dans le chapitre 4, déposé une couche de silicium amorphe carboné d'épaisseur 5 nm au dessus du réflecteur. L'utilisation de silicium amorphe carboné était conseillée pour diminuer l'indice optique du substrat et ainsi augmenter la fluorescence détectée [58] (voir section 4.4.2), et la faible épaisseur déposée était pour minimiser la distance entre le fluorophore et la surface du réflecteur afin de profiter au maximum du miroir de Bragg de l'Amplislide. Cepen-

dant, il a aussi été montré que l'utilisation du silicium amorphe carboné pouvait entraîner une diminution de la densité de la couche moléculaire greffée, par rapport à une couche de silicium amorphe [59; 136; 169]. La concentration superficielle de PEG paraissant avoir un impact substantiel sur la capacité des couches à résister à l'adsorption non spécifique, nous avons donc choisi d'effectuer nos tests sur une lame de silicium amorphe pur a-Si (non carbonée). Une étude préliminaire a été réalisée en déposant sur une lame une couche de silicium amorphe d'épaisseur allant de 5 à 30 nm. Ceci a été obtenu en retirant progressivement au cours du dépôt un masque positionné au dessus de la lame et empêchant le dépôt de silicium amorphe. L'intensité de fluorescence observée au final est plus importante dans la zone aux grandes épaisseurs de silicium amorphe, soit pour une épaisseur de silicium amorphe d'environ 30 nm. Les dépôts sont effectués à 250°C sous une pression de 35 mTorr et avec un flux de silane de 2 L/h. On obtient l'épaisseur désirée de 30 nm en 90 secondes.

6.2.3 Greffage et rinçage de la couche moléculaire et activation des acides

La surface de silicium amorphe est ensuite hydrogénée par exposition à des vapeurs de HF pendant 15 secondes, puis greffée dans une solution de toluène distillé contenant 0.1M du mélange $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$ (20/80). Le rinçage est celui décrit dans la section 5.4.2, soit :

- rinçage dans le toluène : 15 min, 65°C
- rinçage dans l'acide acétique : 2 fois 15 min, 75°C
- rinçage dans l'éthanol : 2 fois 15 min, 65°C
- rinçage dans le dichlorométhane : 5 min
- rinçage dans la solution de SDS 0.1% dans du PBS 1X : 5 min
- rinçage dans le PBS 0.2X : 1 min
- rinçage dans le PBS 0.1X : 1 min
- rinçage dans l'eau ultra pure : 2 min.

La surface est ensuite activée dans une solution contenant 5 mM des réactifs EDC et NHS, selon le protocole de la section 5.5.

6.2.4 Dépôt par spotting des sondes

Les lames sont ensuite introduites dans le spotteur et les différents aptamères sont déposés à une concentration de 20 μM. Nous avons vu dans la section 6.1, que le tampon préconisé par Schott (phosphate de sodium à 300 mM contenant 0,005% de Tween 20 et 0,001% de sarkosyl) fonctionnait bien pour les lames "Slide H". Ce tampon de spotting a donc été utilisé initialement. Les lames sont laissées pendant la nuit dans le spotteur avant d'être bloquées.

6.2.5 Blocage des sites activés

Le blocage des sites activés et non amidés se déroule de la même manière que décrit dans la section 6.1, soit par immersion de la lame dans une solution de 50 mM

d'éthanolamine dans du borate de sodium à 50 mM pendant une heure et un rinçage de 5 minutes dans l'eau ultrapure.

6.2.6 Reconnaissance de thrombine

Les zones spottées avec les aptamères sont ensuite mises en contact avec une solution de PBST contenant 3 μM de thrombine marquée à l'Alexa Fluor 647 pendant 3 heures à température ambiante. La lame est ensuite rincée (2*10 minutes PBST, 10 minutes PBS 1X), puis scannée (figure 6.8).

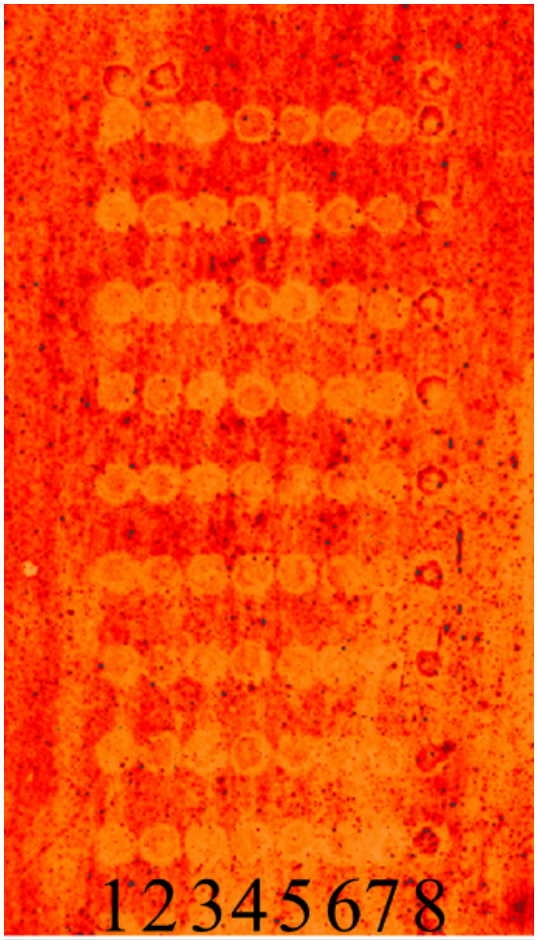

FIGURE 6.8 – Image après test de reconnaissance dans la solution à 3 μM de thrombine d'une lame PEG (sur a-Si de 30 nm) où ont été spottés des aptamères. Chaque colonne correspond à un aptamère différent (1 : Trh1, 2 : Trh1-T15, 3 : Trh1-C12, 4 : Trh2-T15, 5 : Trh2-C12, 6 : Trh3-T15, 7 : Trh3-C12). La colonne 8 correspond aux spots témoins de GabCy5. Chaque ligne correspond à un réplicat. Temps d'exposition : 5 secondes

Le résultat est extrêmement décevant. On peut constater qu'il n'y a pas de reconnaissance entre les différents aptamères et la thrombine marquée, car même si les spots sont visibles, il n'y a pas de différence significative, ni entre l'intensité de fluorescence des spots et le bruit de fond, ni entre les spots des différents aptamères

entre eux (malgré les K_d différents). On retrouve même sur les spots d'aptamères une intensité de fluorescence légèrement inférieure à celle du bruit de fond, comme cela avait déjà été observé pour Trh2 (voir figures 6.5 et 6.6). Afin de tester la cinétique de la reconnaissance, nous avons aussi procédé à la mise en contact de la lame avec la solution de thrombine marquée pendant 19 heures, sans que cela ne change le résultat final. L'hypothèse la plus probable de cette non association aptamère-thrombine est la mauvaise immobilisation des aptamères, probablement dû au fait que le tampon utilisé ne soit pas adéquat pour notre surface.

Selon le même protocole, nous avons aussi réalisé des lames fonctionnalisées par des acides undécyléniques afin de servir de référence. Ces surfaces acides ont à de nombreuses reprises été utilisées pour la reconnaissance d'ADN et l'immobilisation de sondes ADN y a été optimisé [62; 64; 136; 162; 163]. Le protocole ne diffère que par le blocage qui a lieu dans l'eau et, bien sûr, par le greffage. Celui-ci a lieu par voie photochimique dans une solution d'acide undécylénique pur et la surface est rincée 2 fois 15 minutes dans de l'acide acétique à 75°C et sous argon. La figure 6.9 montre la lame après le test de reconnaissance.

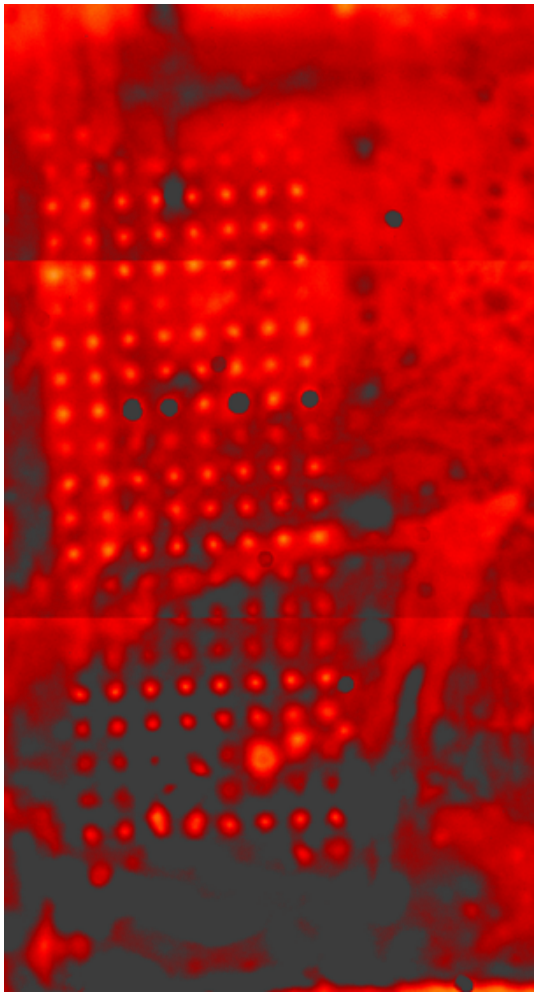

FIGURE 6.9 – Image après test de reconnaissance dans la solution à 3 μM de thrombine d'une lame acide (sur a-Si de 30 nm) où ont été spottés des aptamères et bloquée à l'éthanolamine. Temps d'exposition : 2 secondes

On peut observer que l'intensité de fluorescence est très importante et à certains endroits, sature la caméra CCD pour un temps d'exposition de seulement 2 secondes. On peut aussi remarquer que cette fluorescence est moins importante dans les zones où ont été déposés les aptamères que sur le reste de la lame, comme cela était déjà les cas sur les lames modifiées par des chaînes PEG. Bien que l'immobilisation des sondes soit en principe optimisée, on ne peut détecter de reconnaissance entre les aptamères spottées et la thrombine.

En comparant les figures 6.8 et 6.9, il est évident que la présence de poly(ethylène glycol) à la surface de nos puces limite fortement l'adsorption non spécifique des protéines. Cependant, l'efficacité de la couche moléculaire contre cette adsorption indésirable n'est pas totale et la reconnaissance des protéines n'est pas non plus observable. Les sections suivantes s'attèlent à l'optimisation du protocole afin d'essayer de résoudre ces deux problèmes.

6.2.7 Evaluation du tampon de spotting

La grande influence des interactions électrostatiques sur le repliement et la structure tridimensionnelle des aptamères signifie que leur capacité à se lier à leur cible peut être significativement affectée par de la composition du tampon de spotting [167; 170]. Nous avons vu dans la section 6.1 que le tampon pouvait aussi avoir un effet important quant à l'immobilisation des sondes. Le tampon préconisé par Schott (PBS-TS : phosphate de sodium à 300 mM contenant 0,005% de Tween 20 et 0,001% de sarkosyl) fonctionne bien pour les lames "Slide H", mais comme rien ne garantit son efficacité sur nos lames, nous avons décidé de réaliser une étude comparant l'efficacité de 6 tampons différents pour immobiliser des brins d'ADN sur nos lames :

- Tampon 1 : P-S (phosphate 150 mM, 0.01% de SDS) [58; 136]
- Tampon 2 : phosphate 150 mM, 0.005% Tween20, 0.001% sarkosyl
- Tampon 3 : PBS-TS (phosphate 300 mM, 0.005% Tween20, 0.001% sarkosyl) (préconisé par Schott pour ses Slide H)
- Tampon 4 : phosphate 150 mM, 0.01% sarkosyl
- Tampon 5 : PBSMT (PBS 1X, 5 mM $MgCl_2$, 0.1% Tween 20) [168]
- Tampon 6 : PBST (PBS 1X, 0.05% Tween 20)

Après spotting, les sites activés et non amidés sont bloqués par immersion de la lame dans une solution de 50 mM d'éthanolamine dans du borate de sodium à 50 mM pendant une heure. La lame est ensuite rincée 5 minutes dans l'eau ultrapure. La figure 6.10 montre l'image d'une lame où ont été spottés des oligomères GabCy5. Le blocage des sites activés et non amidés se déroule de la même manière que décrit dans la section 6.1, soit par immersion de la lame dans une solution de 50 mM d'éthanolamine dans du borate de sodium à 50 mM pendant une heure avant d'être rincées 5 minutes dans l'eau ultrapure.

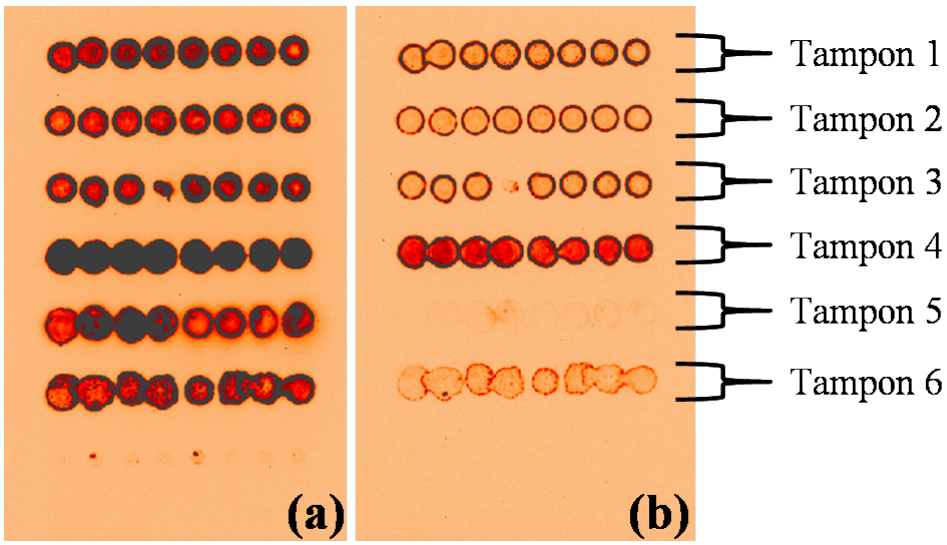

FIGURE 6.10 – Image après spotting d'une lame PEG (sur a-Si de 30 nm) où ont été déposés des GabCy5 dans différents tampons (a). Image après blocage des sites activés n'ayant pas réagi et rinçage, afin de visualiser les oligomères réellement immobilisés à la surface (b). Temps d'exposition : 1 seconde

Bien que les molécules spottées ne soient pas des aptamères et que l'intensité de fluorescence détectée ne soit pas reliée à la capacité de la molécule à se replier dans sa conformation tridimensionnelle souhaitée, on peut tout de même constater de fortes variations de l'allure des spots selon le tampon utilisé. Aucun tampon n'est suffisamment efficace pour immobiliser de manière homogène les brins d'ADN marqués. Cependant, on peut constater en particulier que le tampon 5 ne semble pas du tout adapté à l'immobilisation d'ADN sur nos surfaces et ceci bien qu'il aie déjà été utilisé pour immobiliser des aptamères de la thrombine [168]. Le PBST (tampon 6) ne semble pas non plus un choix judicieux. Les spots obtenus dans les tampons 1 à 4, offrent les meilleurs résultats, sans toutefois satisfaire entièrement. En particulier, on peut observer que l'immobilisation de ces molécules marquées sur la surface se produit préférentiellement sur les bords des spots. Il est probable que ceci soit dû à la tension de surface sur les gouttes de spotting qui repoussent les oligomères marqués aux extrêmités de la goutte déposée. Les surfactants utilisés (SDS, Tween20, sarkosyl) sont supposés diminuer cet effet, et on peut en particulier remarquer que le tampon 4, contenant 0.01% de sarkosyl permet dans une certaine mesure l'immobilisation des molécules au centre des spots. Il est intéressant de noter que malgré la similitude de nos surfaces avec les lames commerciales, le tampon préconisé par Schott (tampon 3) n'offre pas un résultat aussi satisfaisant que sur les Slide H (voir figure 6.2).

6.2.8 Effet du rinçage de la lame

Hormis l'apparente non reconnaissance de la thrombine par l'aptamère spotté sur nos lames, un autre aspect inquiétant de l'essai montré sur la figure 6.8 est le niveau relativement important de la fluorescence sur l'ensemble de la lame, signe d'une adsorption non spécifique de la thrombine. Nous avons donc décidé de poursuivre le rinçage dans le PBST pendant 2 heures (voir figure 6.11). Nous avons aussi rincé la

lame dans la solution de PBS/SDS décrite dans la section 4.3.2 (voir figure 6.12).

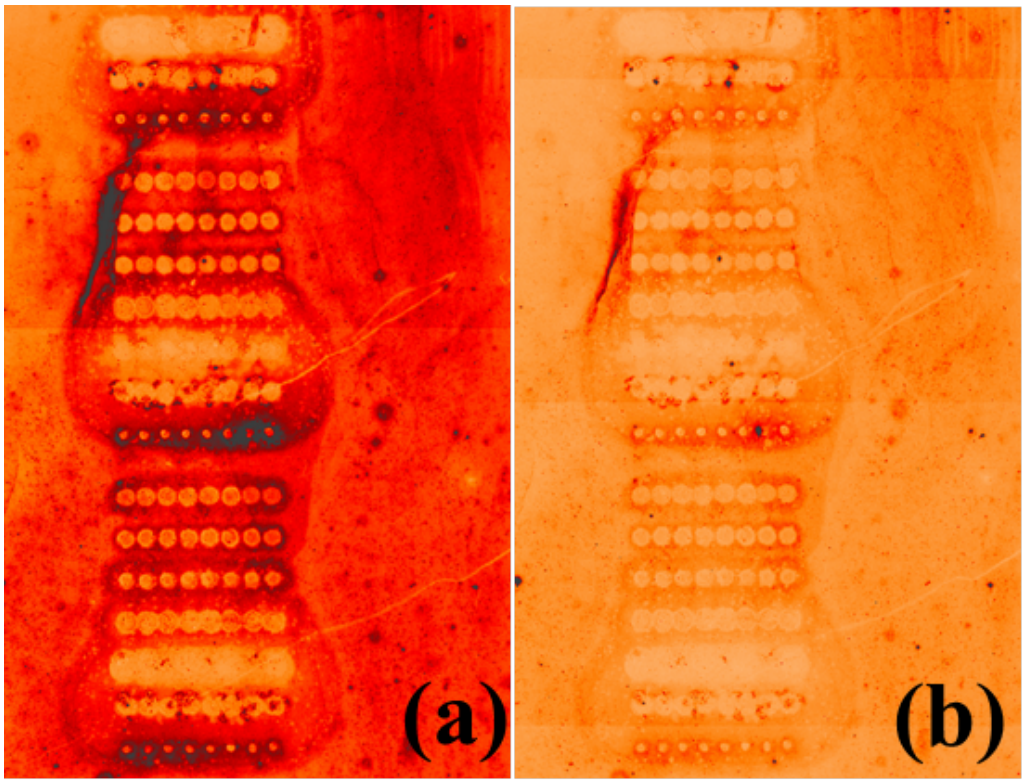

FIGURE 6.11 – Images après test de reconnaissance dans la solution à 3 μM de thrombine d'une même zone de spotting d'une lame PEG (sur a-Si de 30 nm) après rinçage selon le protocole préconisé par Schott (2*10 minutes PBST, 10 minutes PBS 1X) (a), puis après rinçage de 2 heures dans du PBST (b). Tampon de spotting : PBS-TS. Temps d'exposition : 5 secondes

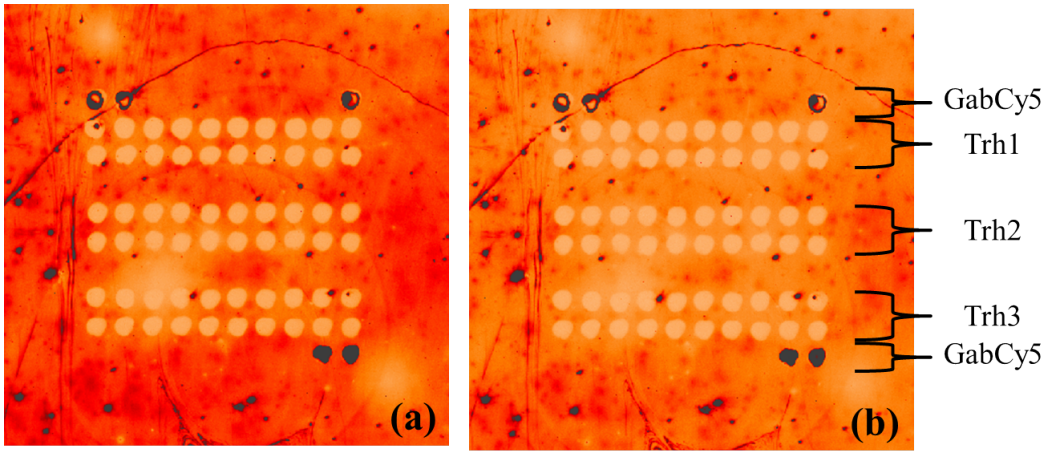

FIGURE 6.12 – Images après test de reconnaissance dans la solution à 3 μM de thrombine d'une même zone de spotting d'une lame PEG (sur a-Si de 30 nm) avant et après rinçage dans la solution de PBS/SDS. Tampon de spotting : PBS-TS. temps d'exposition : 5 secondes

Un rinçage plus long ainsi que le rinçage supplémentaire dans la solution de

PBS/SDS ont tous deux permis de diminuer significativement le bruit de fond, confirmant que la thrombine tend à s'adsorber sur notre surface. L'hypothèse la plus probable pour l'expliquer est que la densité de PEG greffés sur silicium amorphe est inférieure à celle obtenue sur silicium cristallin et que la couche moléculaire se trouve de ce fait beaucoup moins efficace.

6.2.9 Augmentation de la densité de poly(éthylène glycol) en surface

Afin de s'en assurer, nous avons modifié le protocole en effectuant un greffage photochimique de PEG550 à l'issue du greffage du mélange $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$. L'idée est de greffer les molécules PEG550, plus petites et pour lesquelles les couches sont apparemment plus denses, dans les défauts ou les interstices de la couche moléculaire obtenue à l'issue de la première étape de greffage. Le greffage du PEG 550 est obtenu selon le protocole décrit dans la section 1.3.2 (greffage photochimie pendant 3 heures dans du PEG550 pur, et rinçage à l'éthanol et au dichlorométhane). La lame a ensuite été activée, spottée et bloquée comme décrit précédemment avant d'être mise en contact avec la solution à 3 μM de thrombine marquée (figure 6.13). La figure 6.14 indique l'intensité moyenne du bruit de fond de la lame.

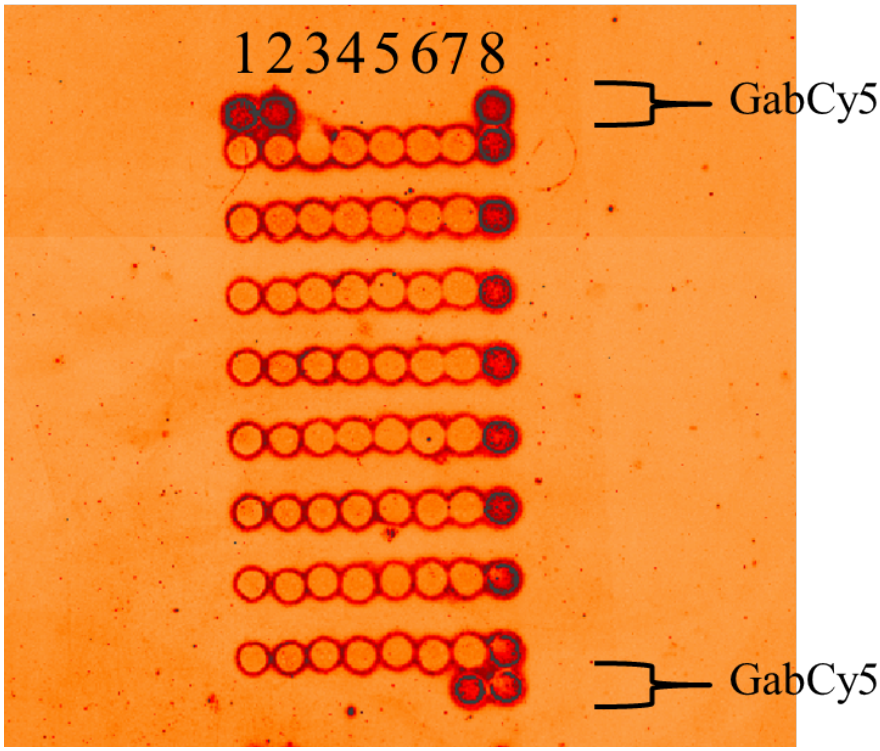

FIGURE 6.13 – Image après mise en contact avec la solution de thrombine marquée d'une lame sur laquelle a été effectué un greffage du mélange $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$, suivi d'un greffage de PEG550, et où ont ensuite été spottés des aptamères. Chaque colonne correspond à un aptamère différent (1 : Trh1, 2 : Trh1-T15, 3 : Trh1-C12, 4 : Trh2-T15, 5 : Trh2-C12, 6 : Trh3-T15, 7 : Trh3-C12). La colonne 8 correspond aux spots témoins de GabCy5. Tampon de spotting : PBS-TS. Temps d'exposition : 5 secondes.

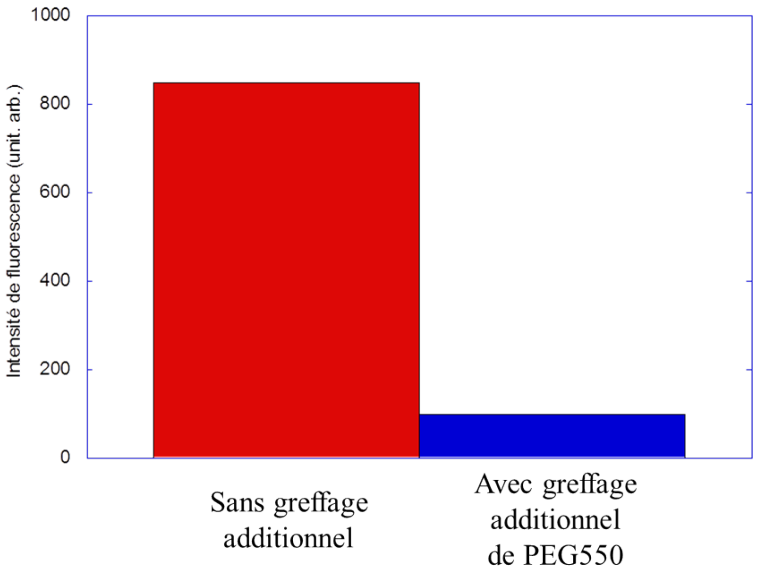

FIGURE 6.14 – Diagramme de l'intensité de fluorescence du bruit de fond entre une lame ayant subi seulement le greffage avec le mélange $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$ et une lame ayant subi le greffage de PEG550 supplémentaire. L'intensité de fluorescence montrée est relative à celle du bruit de fond de la lame avant la mise en contact avec la protéine.

La lame ayant subi le greffage additionnel dans la PEG 550 limite beaucoup plus l'adsorption non spécifique de la thrombine marquée, ce qui semble indiquer que la densité insuffisante de PEG après le premier greffage est la cause principale de l'important bruit de fond constaté précédemment. Seule demeure l'adsorption autour des spots. Il est cependant probable qu'il ne s'agisse pas d'une reconnaissance aptamère-protéine, car on ne distingue pas de différence entre les spots selon l'aptamère déposé.

6.2.10 Nouvelle stratégie

Les difficultés rencontrées pour l'identification d'un tampon de spotting adapté à l'immobilisation des différents aptamères sur les surfaces mixtes $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$, associées à la trop faible densité de cette couche pour efficacement limiter l'adsorption non spécifique de protéines, nous a amenés à considérer une autre stratégie pour obtenir une couche organique à la fois biorésistante et capable d'immobiliser les aptamères.

Les différents aptamères étant des brins d'ADN contenant environ 30 bases, leur immobilisation sur silicium amorphe a déjà été optimisée au laboratoire par l'intermédiaire des couches organiques obtenues par le greffage d'acide undécylénique [58; 136]. De plus, celui-ci étant disponible commercialement et relativement bon marché, le greffage peut être réalisé dans du produit pur, ce qui permettra l'obtention d'une couche plus dense. Après le greffage de la couche organique, les acides peuvent être activés dans le mélange EDC/NHS décrit précédemment 5.5, afin de déposer ensuite par spotting les différents aptamères.

Comme nous l'avons vu précédemment, une telle couche organique n'est pas capable de limiter l'adsorption non spécifique des protéines. Pour cela, nous avons choisi de faire réagir les sites encore activés, c'est à dire l'ensemble de la lame hormis les molécules sur lesquelles se sont accrochées les aptamères, avec des poly(éthylène glycol) terminés par une fonction amine, NH_2EG_8OMe, disponibles commercialement. L'efficacité des réactions d'activation et d'amidation constatée précédemment (rendement $\approx 90\%$) devrait permettre d'obtenir une couche de poly(éthylène glycol) dense.

Afin de tester l'influence des tampons de spotting sur la qualité de l'immobilisation des sondes, nous avons choisi d'utiliser trois tampons différents :

- Tampon 7 : phosphate 150 mM, 0.1% sarkosyl, similaire au meilleur tampon observé précédemment (tampon 4) avec une plus grande concentration de sarkosyl,
- Tampon 8 : P-S (phosphate 150 mM, 0.01% de SDS), préconisé pour ces surfaces [58],
- Tampon 9 : PBSMT (PBS 1X, 5 mM $MgCl_2$, 0.1% Tween 20).

La réaction avec les PEG a lieu dans une solution de NH_2EG_8OMe à 50 mM dans de l'eau pendant une heure, et la lame est ensuite rincée dans l'eau ultrapure pendant 5 minutes. Afin de tester l'influence de la présence de la couche PEG, seule une partie de la lame (autour de la zone spottée) est laissée à réagir avec les PEG. La zone spottée est ensuite mise en contact, d'abord avec une solution d'Anti-Gab marqué puis avec une solution de PBS 1X contenant 0.1% de Tween 20 et 5 mM de $MgCl_2$ (PBSMT) et contenant 3μM de thrombine marquée à l'Alexa Fluor 647. La figure 6.15 montre la lame après contact avec la solution de thrombine.

On peut clairement voir différentes zones sur la lame. Tout d'abord, la zone A n'a été en contact ni avec la solution de PEG ni avec la solution de thrombine marquée. Elle joue donc le rôle de référence quant à au signal de fluorescence sur une surface exempte de protéines. Les zones B et D n'ont été pas en contact avec la solution de PEG mais ont toutes deux été en contact avec la solution de thrombine marquée. Enfin la zone C a été en contact avec la solution de PEG et de thrombine marquée. L'intensité de fluorescence moyenne des zones ayant été et n'ayant pas été en contact avec la solution de PEG est représentée sont illustrées sur la figure 6.16, en prenant comme référence l'intensité moyenne de la zone A.

Alors que la zone n'ayant pas réagi avec les NH_2EG_8OMe présente une fluorescence importante (6 fois plus que la zone A), signe que de nombreuses protéines s'y sont adsorbées, la zone C présente un signal très légèrement supérieur à celui de la zone A de référence (8% de fluorescence en plus). Ceci montre bien que la couche PEG formée est très efficace pour limiter l'adsorption non spécifique. La couche moléculaire obtenue au final possède une chaîne alkyle plus longue et une chaîne éthylène glycol plus courte que la couche mixte $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$, et devrait donc être intrinsèquement moins efficace. Ceci montre encore une fois l'importance de la densité de surface de la couche.

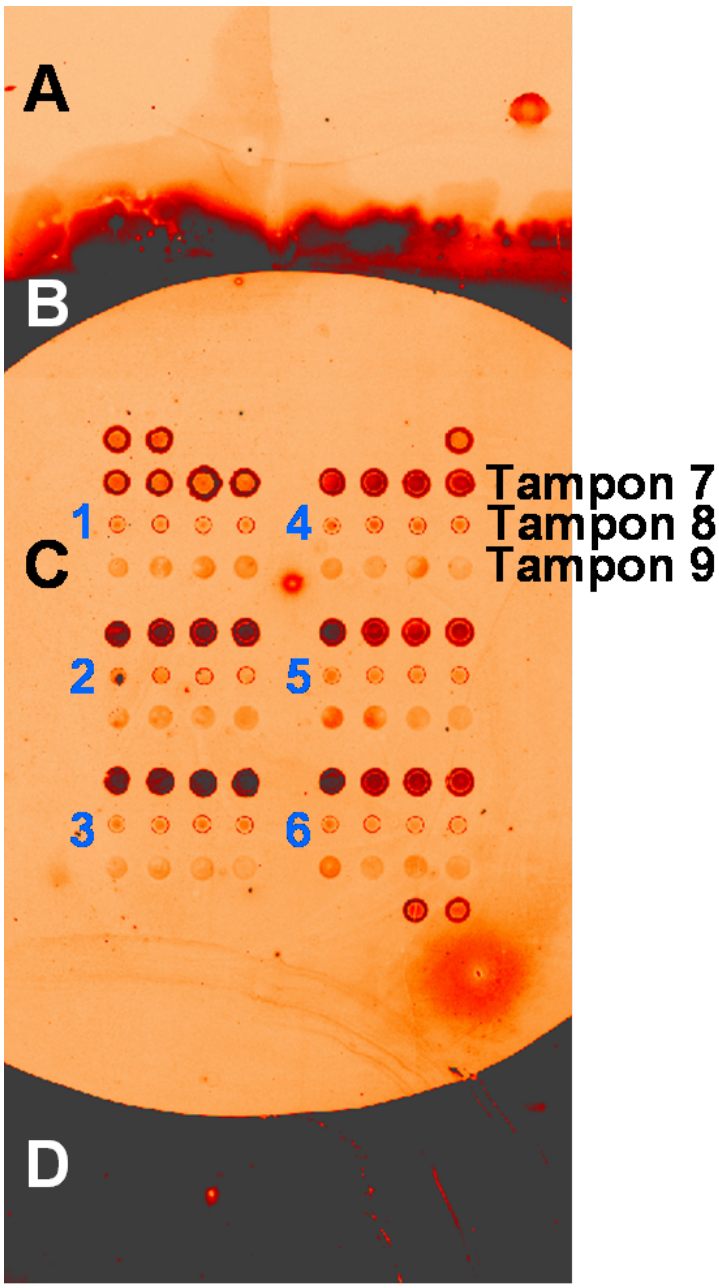

FIGURE 6.15 – Image après mise en contact avec la solution de thrombine marquée d'une lame acide ayant localement réagi avec du NH_2EG_8OMe. Chaque bloc correspond à une molécule spottée différente (1 : GabCy5, 2 : Gab, 3 : Trh1, 4 : Trh1-T15, 5 : Trh2-T15, 6 : Trh3-T15), et à l'intérieur de chaque bloc, chaque ligne correspond à un tampon de spotting différent. La lame est ensuite mise en contact avec une solution de NH_2EG_8OMe (zone C), puis avec la solution de thrombine marquée à 3μM (zones B, C, D). Temps d'exposition : 1 seconde.

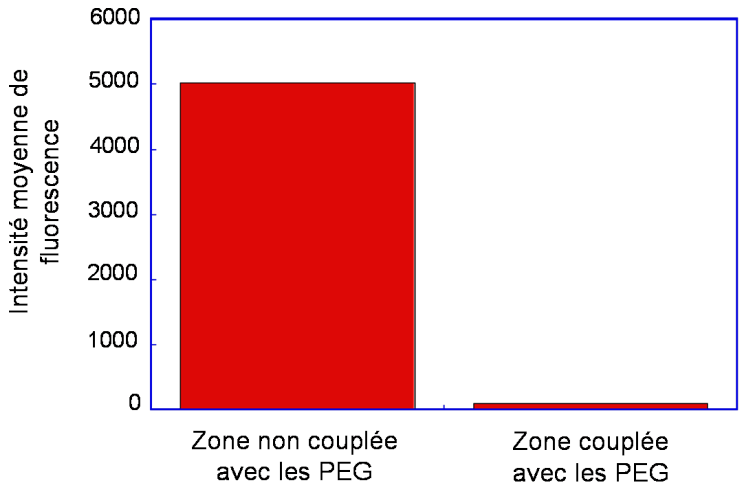

FIGURE 6.16 – Intensité de fluorescence moyenne selon que la surface a réagi ou non avec la solution de NH_2EG_8OMe.

La figure 6.15 montre la présence de spots de fluorescence attestant de la reconnaissance entre les aptamères spottés et la thrombine marquée. On peut cependant constater une grande différence selon le tampon de spotting utilisé, le tampon 7 (phosphate 150 mM, 0.1% de sarkosyl) étant clairement le plus efficace. Les autres tampons ne permettant que de détecter un très faible signal de fluorescence, on constate l'influence du tampon de spotting suivant les couches moléculaires utilisées. A la vue des K_d des différents aptamères utilisés, il peut paraître étonnant que les intensités de fluorescence des spots ne semblent pas dépendre de l'aptamère immobilisé. Cependant, ceci n'est qu'une étude de faisabilité de cette nouvelle stratégie et la concentration de thrombine marquée utilisée (3μM) est bien trop importante pour que l'influence des constantes d'association des différents aptamères puisse apparaître dans les conditions utilisées ici.

La reconnaissance observée ici sur une lame acide, confirme aussi que la non détection de la reconnaissance sur les lames greffées avec le mélange $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$ provient très certainement de la mauvaise immobilisation des sondes sur cette surface. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela :

- Tout d'abord, nous n'avons pas trouvé un tampon de spotting permettant d'obtenir des spots témoins intenses et homogènes, ce qui suggère que les spots d'aptamères ne sont pas non plus idéaux
- L'activation et l'amidation ont toutes deux été optimisées sur des surfaces fonctionnalisées par greffage d'acide undécylénique. La présence de nombreuses unités éthylène glycol sous la terminaison acide pourrait jouer un rôle quant à l'efficacité des protocoles actuellement utilisés pour ces deux réactions
- La densité de surface des molécules $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$ après greffage est peut être insuffisante.

6.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons tenté d'effectuer la détection de thrombine marquée par des aptamères immobilisés de manière covalente à la surface. Il a été mis en évidence que l'association aptamère/protéine était plus difficile à obtenir en surface qu'en solution, entraînant une augmentation significative des constantes de dissociation apparentes des différents aptamères. Nous avons aussi pu mettre en évidence que la distance de ces aptamères à la surface jouait un rôle important dans leur capacité à se replier dans la configuration tridimensionnelle permettant cette association.

La présence de PEG en concentration suffisamment importante à la surface s'avère cruciale pour limiter l'adsorption non spécifique de protéines et ainsi diminuer efficacement le bruit de fond des lames. Cette adsorption peut être encore diminuée par un rinçage efficace de la lame après mise en contact avec les protéines ou par greffage supplémentaire de PEG. Nous avons aussi pu constater que la solution tampon utilisée pour le dépôt par spotting des aptamères joue un rôle fondamental quant à leur immobilisation et leur repliement. Enfin, nous avons pu constater que les surfaces obtenues par le greffage du mélange $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$-$C_5(EG)_{12}OMe$ ne permettent pas la reconnaissance de la thrombine.

Cette reconnaissance a été cependant observée sur des lames fonctionnalisées par des acides undécyléniques et bloquées par des PEG aminés, confirmant l'hypothèse selon laquelle le facteur limitant est l'immobilisation des sondes sur les surfaces greffées avec des PEG.

Conclusion générale

Ce travail de thèse portait sur l'élaboration d'une nouvelle architecture de puces à protéines permettant à la fois le contrôle de la chimie d'immobilisation des sondes mais aussi limitant l'adsorption non spécifique des cibles, qui sont deux des plus importantes limitations dans l'obtention de puces à protéines sélectives et sensibles. Cette étude repose sur le greffage covalent d'une couche de molécules de type $C_p(EG)_n$ terminés par différents groupements sur une couche mince de silicium amorphe, afin de pouvoir utiliser des mesures de fluorescence pour détecter la présence de protéines.

L'étude réalisée sur silicium cristallin a montré, grâce à des caractérisations par spectroscopie infrarouge et par microscopie à force atomique, qu'il était possible d'empêcher l'adsorption non spécifique de protéines en greffant des molécules de type $H(EG)_nOMe$ par attaque nucléophile de l'alcool sur une surface de silicium hydrogénée, à partir de valeur de n d'autour de 12. En particulier, le greffage photochimique permet l'obtention de surfaces très peu oxydées. L'étude par spectroscopie infrarouge a aussi permis l'évaluation quantitative de la densité de molécules greffées par ajustement du signal infrarouge correspondant à l'absorption par la surface. Nous avons montré que les couches obtenues avaient des densités comparables à celles de couches alkyles ou acides. Cependant, les liaisons Si-O-C formées pendant le greffage sont sensibles à l'hydrolyse et une telle surface n'est donc pas un très bon candidat pour être utilisé comme puce à protéines, où les tests de reconnaissance ont lieu en milieu aqueux.

Nous avons donc synthétisé puis greffé des molécules de type $C_p(EG)_nOMe$ dont la chaîne alkyle est terminée par un alcène. L'hydrosilylation de ces alcènes au contact d'une surface de silicium hydrogénée a permis l'obtention de couches moléculaires, combinant le caractère biorésistant des chaînes poly(éthylène glycol) et le caractère de passivation de surface des chaînes alkyles. Cependant, les $C_p(EG)_nOMe$ ne sont pas des molécules courantes et la nécessité de les synthétiser et de les purifier au laboratoire est un frein non négligeable à leur utilisation massive. Afin de palier ce problème, nous avons dû nous résoudre à réaliser le greffage dans des solutions diluées, ce qui a diminué la compacité des couches moléculaires obtenues. Le caractère amphiphile de ces molécules a aussi nécessité d'adapter le protocole de greffage. L'utilisation du toluène distillé comme solvant de la réaction a permis la bonne solubilisation de ces molécules et l'obtention de surfaces peu oxydées. Le protocole de rinçage après greffage a, lui aussi, dû être revu afin d'éliminer tous les résidus présents en surface après un simple rinçage à l'éthanol et au dichlorométhane. L'ajout d'un rinçage dans une solution de PBS 1X contenant 0.1% de SDS a permis l'élimination

de ces résidus.

Les surfaces ainsi obtenues offrent une biorésistance dépendant fortement de la longueur des chaînes alkyles et poly(éthylène glycol). Nous avons montré en particulier qu'une chaîne alkyle trop courte ne permettait pas d'obtenir des couches très denses ce qui, à son tour, produisait des surfaces limitant peu l'adsorption non spécifique des protéines. Cependant des molécules ayant une chaîne alkyle trop longue, en particulier lorsqu'elle est couplée avec une chaîne PEG courte, permettent d'obtenir des surfaces d'une bonne densité de greffage mais ayant des propriétés intrinsèques de biorésistance plus faibles. Nous avons cependant montré que des surfaces fonctionnalisées par des molécules $C_5(EG)_{12}OMe$ et $C_5(EG)_{16}OMe$ offraient une excellente biorésistance à la plupart des protéines étudiées ainsi qu'une parfaite stabilité à l'hydrolyse. Seule la thrombine s'adsorbe de manière significative sur ces surfaces.

L'utilisation du silicium cristallin est à proscrire pour les études par fluorescence car il pénalise fortement l'efficacité de luminescence. Il est cependant possible de conserver la chimie contrôlée sur silicium cristallin en utilisant des couches minces de silicium amorphe. Ces couches peuvent être déposées sur un grand nombre de surfaces différentes en particulier sur des nanoparticules d'or ou d'argent pour une détection par résonance de plasmons de surface localisés (LSPR) ou des réflecteurs (couche d'aluminium, miroirs de Bragg) pour la détection par fluorescence, et l'exaltation de cette fluorescence peut encore être améliorée par ajout de carbone dans la couche. Ainsi, nous avons pu transférer notre chimie sur des lames de verre où a été déposée cette couche de silicium amorphe, et confirmer par fluorescence que nos couches moléculaires de poly(éthylène glycol) permettaient de fortement limiter l'adsorption non spécifique de différentes protéines. Il est toutefois important de noter que la compacité des couches moléculaires formées sur silicium amorphe est en général inférieure à celle obtenue sur silicium cristallin et que cela peut entraîner une baisse de la biorésistance de la couche.

Afin d'immobiliser les sondes, qui dans le cas des puces à protéines peuvent être d'autres protéines ou des aptamères (acides nucléiques ayant une affinité particulière avec certaines protéines), nous avons décidé d'étendre la chimie d'immobilisation, développée au laboratoire pour les puces à ADN, en greffant un mélange de molécules PEG et acide. L'utilisation d'acide undécylénique engendre une certaine ségrégation entre les molécules et entraîne la présence sur la surface de zones non fonctionnalisées par les PEG. Afin de contourner ce problème, nous avons synthétisé des molécules $C_5(EG)_{12}OCH_2COOH$ par oxydation de Jones de molécules $C_5(EG)_{13}OH$. Ces molécules se mélangent parfaitement avec les $C_5(EG)_{12}OMe$ et les surfaces résultant d'un greffage mixte offrent des couches sans ségrégation. Nous avons montré que la terminaison acide de ces nouvelles molécules pouvait être activée pour réagir avec des amines primaires, immobilisant de manière covalente ces molécules par amidation. Cette réaction est particulièrement intéressante car la synthèse d'oligonucléotides aminés est un processus commercialement mûr. Pour servir de sondes, nous avons utilisé différents aptamères de la thrombine. Nous avons montré que la reconnaissance de la thrombine par un aptamère immobilisé sur nos couches moléculaires nécessitait l'utilisation de solutions concentrées à des valeurs nettement supérieures

à la constante de dissociation mesurée en solution et que la distance de ces aptamères à la surface jouait un rôle important dans leur capacité à se replier et donc à servir efficacement de sonde.

Le greffage de la couche moléculaire de PEG permet de très fortement diminuer le bruit de fond observé sur une lame simplement fonctionnalisée avec des acides undécyléniques. Nous avons pu aussi constater, en suivant les mêmes protocoles de greffage et de rinçage, que les surfaces fonctionnalisées par des $C_p(EG)_nOMe$ sont moins biorésistantes sur silicium amorphe que sur silicium cristallin. Ceci est probablement dû à un greffage moins dense, mais nous avons montré que ce problème pouvait être contourné par un rinçage plus long après le dépôt de protéines ou par le greffage supplémentaire d'autres molécules de poly(éthylène glycol). Nous avons aussi déterminé une autre méthode permettant de diminuer l'adsorption non spécifique de protéines, à savoir le blocage par des PEG terminés par une fonction amine des sites activés n'ayant pas été amidés. Ceci a permis de détecter les protéines sur des lames fonctionnalisées avec des acides undécyléniques, avec un bruit de fond satisfaisant.

Cependant, dans l'état actuel de l'étude, ces couches moléculaires ne sont pas encore à même de réaliser la détection de la thrombine. L'hypothèse la plus probable mise en avant est que les protocoles d'immobilisation des sondes et d'association aptamère-thrombine ne sont pas encore au point.

En ce qui concerne l'immobilisation de l'aptamère, l'un des facteurs les plus limitants est la mise au point d'un tampon de spotting des sondes approprié à la fois à la sonde et à la surface. En effet, celui-ci joue un rôle crucial quant à l'immobilisation de l'aptamère et l'identification d'un tampon de spotting capable de correctement assurer l'immobilisation des sondes est évidemment de la première importance. Pour ce faire, il semble intéressant d'augmenter la quantité de sarkosyl puisque le tampon ayant fourni les meilleurs résultats est celui avec la plus grande quantité de ce surfactant. Comme nous avons beaucoup d'expérience dans l'immobilisation d'ADN sur des surfaces fonctionnalisées par des acides undécyléniques, une autre méthode pour assurer l'immobilisation serait d'utiliser un mélange de $C_5(EG)_{16}OMe$ et des acides possédant une chaîne alkyle plus longue afin que la fonction acide soit accessible pour l'activation. Ces sites activés n'ayant pas réagi devront probablement être bloqués par des PEG aminés afin de réduire l'adsorption non spécifique. Il faudra toutefois s'assurer de l'absence de ségrégation des acides et des PEG dans ces conditions modifiées, comme celle constatée entre les acides undécyléniques et les PEG550.

Bien que l'association aptamère-thrombine ait été observée sur les lames "Slide H" et les lames acides bloquées par des PEG aminés, l'intensité de fluorescence détectée est assez faible et la concentration de la solution de thrombine très élevée. Il est donc probable que le protocole mis en place pour la reconnaissance aptamère-protéine ne soit pas optimal. En particulier, la pH et la concentration en sels de la solution d'association peuvent jouer un rôle important dans le repliement de l'aptamère et donc dans la reconnaissance de la cible. Plusieurs études ont montré l'importance de la présence de cations monovalents ou divalents (K^+, Rb^+, Ba^{2+}, Sr^{2+}, Mg^{2+}) pour stabiliser la structure tridimensionnelle de l'aptamère et ainsi favoriser la reconnaissance [168; 171–174].

Toute cette mise au point sur l'immobilisation de l'aptamère et sur les conditions de l'association avec la thrombine, couplée avec l'adsorption non spécifique résiduelle de cette dernière sur nos surfaces, nous amène à quelque peu reconsidérer le complexe aptamère-thrombine comme modèle. Deux autres protéines courantes dont un aptamère ADN est connu sont le lysozyme [175] et la streptavidine [176]. La streptavidine ne n'adsorbant pas sur nos surfaces, son utilisation peut être particulièrement intéressante pour optimiser les conditions d'immobilisation et de reconnaissance. Cependant, les aptamères anti-streptavidine est un oligonucléotide assez long (environ 60 bases) tandis que celui du lysozyme est un oligonucléotide de 30 bases, ce qui est plus proche de ceux dont nous maîtrisons l'immobilisation.

Afin de diminuer encore plus l'adsorption non spécifique des cibles, il pourrait aussi être intéressant de greffer des molécules de poly(éthylène glycol) plus longues (PEG2000, PEG5000). Ceci pourrait apporter un gain appréciable pour limiter l'adsorption des protéines qui, comme la thrombine, s'adsorbe encore sur les couches obtenues dans cette étude. En revanche, des chaînes PEG trop longues seraient susceptibles de se replier. Il faudra alors s'assurer que les fonctions acides terminales, nécessaires à la chimie d'immobilisation, soient bien accessibles. Une autre méthode pour améliorer la biorésistance de la surface serait d'obtenir une couche moléculaire plus dense. Pour cela, on peut envisager un procédé de greffage sans solvant entre lame et lamelle ou purifier plus drastiquement les précurseurs afin de pouvoir entreprendre des greffages thermiques, potentiellement plus efficaces, sans trop oxyder la surface.

On peut aussi considérer l'obtention de la couche moléculaire en deux étapes. L'expérience acquise au laboratoire sur les surfaces acides a permis d'obtenir l'immobilisation de l'aptamère et l'amidation des sites restants avec des PEG aminés. Cette procédure a significativement réduit le bruit de fond, de sorte que l'association aptamère-thrombine a pu être observée. Ce procédé à l'avantage de ne pas nécessiter de synthèse organique et pourrait être utilisé pour optimiser les protocoles d'immobilisation des sondes et d'association avec les cibles.

Annexe A

Techniques utilisées pour la synthèse des précurseurs et leur caractérisation

De nombreux procédés classiques en synthèse organique sont utilisés dans les protocoles décrits dans ce chapitre. Certaines techniques d'extraction ou de purification sont employées à plusieurs reprises. Ces techniques sont décrites dans cette section afin d'éviter les répétitions par la suite.

A.1 Chromatographie sur couche mince : CCM

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une méthode simple et rapide qui permet de suivre l'évolution d'une réaction ou de tester la pureté de composés organiques. L'échantillon (quelques microlitres du produit réactionnel à tester) est solubilisé dans un solvant volatil (typiquement du dichlorométhane dans notre étude) et la solution est déposée ponctuellement, à l'aide d'une pipette capillaire, sur une couche mince de gel de silice ou d'alumine formée à la surface d'une plaque de plastique. La plaque portant le gel, aussi appelée phase stationnaire, est placée dans une cuve saturée en vapeur de solvant d'élution (éluant ou phase mobile). On fait tremper un bord de cette plaque dans un fond d'éluant en prenant soin d'éviter tout contact entre le dépôt ponctuel de l'échantillon et l'éluant. Ce dernier migre alors par capillarité vers le haut de la plaque. La distance de migration des produits dépend de leur affinité avec la phase stationnaire et la phase mobile. Dans l'exemple d'une phase stationnaire polaire (ex : le gel de silice) et une phase mobile apolaire (ex : hexane), les produits polaires auront tendance à peu migrer, voire pas du tout alors que les produits apolaires migreront davantage car entraînés par l'éluant. On obtient alors dans le cas idéal autant de taches que de constituants sur le trajet de migration du solvant. Les constituants peuvent alors être identifiés par comparaison à l'élution simultanée de témoins comme les réactifs de la réaction.

En dehors du cas particulier où les composés sont colorés, il existe 2 manières de visualiser les taches.

– L'utilisation de plaques contenant un matériau fluorescent visualisable sous

éclairage ultraviolet. Les constituants de l'échantillon désactivent la fluorescence du matériau de sorte que la plaque est fluorescente partout sauf aux endroits où se trouvent les constituants. Certaines plaques de CCM contiennent un indicateur fluorescent absorbant dans l'UV proche (366 nm) ou lointain (254 nm). L'indicateur UV254 est un silicate de zinc activé au manganèse, dont le maximum d'absorption est à 254 nm. Il présente une fluorescence verte. Il est sensible aux acides (sa fluorescence est éteinte par des solvants acides). L'indicateur UV366 est également un pigment minéral avec un maximum d'absorption à 366 nm. Il présente une fluorescence bleue.

– L'utilisation d'un réactif spécifique de coloration. Il est souvent nécessaire d'oxyder, avec de l'iode par exemple, les composés organiques incolores. C'est le cas pour tous les produits obtenus à l'issue de nos étapes de synthèse.

Le paramètre le plus utilisé pour l'analyse qualitative est le facteur de rétention R_f. La valeur de R_f est définie par le rapport de la distance parcourue par la substance sur la distance parcourue par le front de solvant. La valeur de R_f est donc comprise entre 0 et 1. Pour obtenir des R_f reproductibles, il est nécessaire d'opérer dans des conditions identiques : composition identique d'éluant, température constante,... Si les témoins placés à côté de l'échantillon ont été bien choisis, les taches ayant parcouru la même distance sont vraisemblablement de même nature que les constituants de l'échantillon. Il est aussi possible d'obtenir une information quantitative sur la composition de l'échantillon à l'aide d'un spectromètre.

Dans notre étude la plupart des synthèses se déroulent avec l'un des produits en déficit. L'avancement de la réaction est mesuré par la disparition de la tache correspondant à ce produit. Les plaques de gel de silice 60A-15μm et d'alumine 60A-15μm utilisées proviennent de SDS. Les éluants utilisés sont l'acétate d'éthyle (AcOEt), l'éthanol (EtOH) et le tétrahydrofurane (THF) et sont fournis par Carlo-Erba avec des puretés supérieures à 99%.

A.2 Traitement post réactionnel

A.2.1 Extraction liquide-liquide

Les extractions sont parmi les méthodes les plus utilisées en chimie organique pour séparer les mélanges. L'extraction liquide-liquide repose sur la différence d'affinité d'un soluté entre deux phases liquides non-miscibles typiquement une phase aqueuse et une phase organique. L'extraction sera d'autant plus efficace que le coefficient de partage $K_p = [A_{org}]/[A_{aq}]$ est grand. L'extraction sera bien sûr plus efficace avec l'augmentation du volume des solvants.

Pour réaliser l'extraction, on introduit la solution à laver et le solvant dans une ampoule à décanter que l'on agite énergiquement plusieurs fois afin d'atteindre l'équilibre de partage, puis qu'on laisse reposer jusqu'à séparation complète des deux phases. Il faut prendre soin de dégazer entre chaque agitation pour éviter une surpression dans l'ampoule. En effet, l'équilibre de mélange peut être exothermique et entraîner une légère augmentation de température dans l'ampoule. Cela provoque

une vaporisation du solvant le plus volatil qui met l'ampoule sous pression. On récupère ensuite les deux phases séparément.

Afin d'augmenter le rendement de la séparation et ainsi récupérer plus de produit, on procède à plusieurs extractions successives. A volume de solvant constant, ce procédé est plus efficace qu'une seule extraction.

Dans notre étude, nous avons utilisé une phase aqueuse et une phase organique composée de dichlorométhane (il est parfois nécessaire de rajouter du sel afin de correctement séparer les deux phases). Les poly(éthylène glycol) sont hydrophiles tandis que les chaînes alkyles sont hydrophobes. Les différentes molécules synthétisées possèdent ces deux fonctions mais ont une plus grande affinité avec le dichlorométhane qu'avec l'eau, c'est pourquoi on retient toujours les phases organiques.

Ces phases organiques sont regroupées et lavées à l'eau. Il s'agit de l'extraction inverse où l'eau est le solvant et les phases organiques la solution à extraire. L'objectif est alors de permettre d'éliminer au maximum les composants qui ont une plus grande affinité avec l'eau mais qui s'étaient retrouvés dans la phase organique lors de la première extraction. Ceci diminue le rendement final mais permet l'obtention d'un produit plus pur, en particulier pour les synthèses pour lesquelles une chromatographie sur colonne n'est pas nécessaire.

A.2.2 Séchage sur sulfate de magnésium

Après lavage, la phase organique récupérée contient toujours des traces d'eau qui seront difficiles à éliminer. Pour ce faire, on introduit dans la solution de dichlorométhane du sulfate de magnésium $MgSO_4$ anhydre (RP Normapur, 98%). Celui-ci va s'hydrater avec les traces d'eau présentes et former des agrégats. Il faut rajouter du sel jusqu'à ce qu'il en reste en suspension. On laisse ensuite la solution reposer pendant une vingtaine de minutes puis on la filtre sur papier.

A.2.3 Evaporation du solvant

Pendant les synthèses ou les greffages, nos précurseurs sont souvent en solution. Pour les recycler, il convient de retirer ce solvant. Il est pour cela évaporé sous pression réduite. Le dichlorométhane étant très volatil, le procédé est assez rapide. Cependant si on maintient une pression réduite et que l'on chauffe la solution, on peut aussi éliminer certains composants indésirables et encore en solution comme le bromopentène qui est l'un des réactifs de nos synthèses. Afin de parfaire l'isolation du ou des composants qui se trouvaient dans la phase organique et/ou se débarrasser de l'eau atmosphérique qui peut venir charger nos produits en eau après une période de stockage, on sèche le produit sous vide pendant plusieurs heures. Le produit obtenu est ainsi prêt à être réutilisé ou, dans le cas de nos synthèses, totalement purifié par chromatographie sur colonne.

A.3 Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est basée sur le même principe que celle sur couche mince (CCM) et, en utilisant les mêmes conditions d'éluant et de phase stationnaire, permet de séparer de la même manière les différents composants présents dans notre échantillon. C'est pour cela qu'avant toute chromatographie sur colonne la séparation des produits est optimisée sur couches minces, en jouant sur l'éluant et la phase stationnaire. La réalisation d'une colonne impose de respecter certaines règles qui permettront une séparation efficace. On place tout d'abord un morceau de coton au fond de la colonne que l'on recouvre d'éluant, afin d'y éliminer l'air emprisonné. On rajoute environ un demi-centimètre de sable au-dessus du coton, afin que la phase stationnaire ne puisse pas s'échapper de la colonne. Enfin, on remplit la colonne avec la phase stationnaire (gel de silice ou alumine) et on rajoute un demi-centimètre de sable en tête de colonne. Cette couche permet de réaliser les dépôts de l'échantillon à séparer et d'ajouter l'éluant sans perturber la surface de la phase stationnaire, ce qui empêcherait une bonne séparation. Il est important que toutes les interfaces soient horizontales. On ajoute ensuite l'éluant en faisant attention à ne pas détériorer la planéité de ces interfaces. Une fois la colonne remplie d'éluant, il est important de s'assurer ne pas assécher la phase stationnaire en vérifiant qu'il reste toujours de l'éluant au niveau du sable. On fait passer l'éluant à travers la colonne plusieurs fois afin qu'elle soit totalement mouillée. On amène ensuite le niveau de l'éluant à hauteur du sable en tête de colonne. Le volume d'éluant dans la colonne est appelé volume mort car il ne participe pas à la séparation proprement dite.

On dépose le mélange à séparer en tête de colonne avec une pipette Pasteur. On ouvre le robinet de la colonne pour faire descendre le mélange au niveau de la phase stationnaire. On peut ensuite rajouter l'éluant. Une chromatographie sur colonne est dite "flash" lorsque la colonne est maintenue sous pression d'azote. Ceci permet une séparation plus rapide mais nécessite une phase stationnaire plus fine. Après avoir récupéré le volume mort qui ne contient aucun composant du mélange, on commence à récupérer les fractions dans des tubes à essai. Le composant qui a la plus grande affinité avec l'éluant sort en premier et les autres suivent dans le même ordre que celui obtenu sur une CCM avec la même phase stationnaire et le même éluant. On peut ainsi séparer les différents produits et récupérer ceux qui nous intéressent en regroupant les fractions les contenant. Le produit ainsi purifié, on peut l'isoler en évaporant l'éluant. Dans notre étude le gel de silice utilisé (60A CC 35-70μm) provient de SDS.

A.4 Purification de solvants

Certaines étapes de synthèses nécessitent des solvants particulièrement purs et cela nécessite de les purifier avant utilisation. C'est aussi les cas du solvant utilisé lors des greffages. Différentes méthodes peuvent être utilisées et nous allons décrire les deux que nous avons utilisées lors de notre étude, le séchage sur colonne d'alumine activée et la distillation sur sodium-benzophénone.

Le séchage sur colonne d'alumine activée est utile pour rendre anhydre un solvant

qui a pu se charger en eau. Il consiste simplement à faire passer le solvant à travers une colonne remplie d'alumine activée qui va capter l'eau permettant de le récupérer anhydre et prêt à être utilisée. Cette procédure a en particulier été utilisée pour la purification de l'heptane et de l'hexane (Sigma, 95%) utilisés comme solvants de greffage de nos précurseurs.

Certains solvants comme le tétrahydrofurane (THF) ou le toluène sont d'excellents candidats à la purification par distillation sodium-benzophénone. Il s'agit simplement de réaliser un montage de distillation et d'introduire dans le ballon du sodium métallique (Sigma) et de la benzophénone (Sigma, 99%) en plus du solvant à distiller. En vieillissant, le THF forme des peroxydes et finissent par se charger en eau. Avant toute distillation il faut impérativement éliminer ces peroxydes qui pourraient se greffer sur nos surfaces. Dans le cas de la distillation sur Na-benzophénone, le sodium réduit les peroxydes en alcoolates et transforme l'eau en soude et hydrogène. C'est la raison pour laquelle il faut absolument être sous atmosphère inerte. La benzophénone sert ici d'indicateur coloré. Le changement de couleur du jaune au bleu vif (dû à la formation du radical de la benzophénone) indique que le solvant est anhydre. On peut alors l'évaporer et le faire se recondenser pour le récupérer.

A.5 Spectroscopie RMN

La résonance magnétique nucléaire (RMN) désigne une propriété de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire (par exemple ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, ^{31}P, ^{129}Xe,...), placés dans un champ magnétique. Lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement électromagnétique dans les radiofréquences, les noyaux atomiques peuvent absorber l'énergie du rayonnement puis la relâcher lors de la relaxation. L'énergie mise en jeu lors de ce phénomène de résonance correspond à une fréquence très précise, dépendant du champ magnétique et d'autres facteurs moléculaires.

Quand une molécule est placée dans le champ magnétique B_0, des courants d'électrons sont induits dans les diverses orbitales moléculaires. Des moments magnétiques sont induits par cette circulation des électrons, lesquels vont s'opposer proportionnellement à l'action du champ magnétique B_0. Le champ réellement ressenti localement par les noyaux n'est donc pas exactement le champ appliqué, mais se trouve réduit. De sorte que les électrons forment en définitive un écran pour les noyaux. L'environnement électronique de chaque noyau est alors caractérisé par une constante d'écran σ dont dépendra la fréquence de résonance de ces noyaux ν_L,

$$\nu_L = \nu_0(1 - \sigma) \tag{A.1}$$

Les différences de fréquence δ, exprimées en ppm, induites par les différents environnements électroniques sont appelées déplacements chimiques et sont définies par rapport à une référence (généralement le tétraméthylsilane (TMS) pour le ^{1}H et le ^{13}C) selon l'équation A.2,

$$\delta = \frac{\nu_L - \nu_{ref}}{\nu_0} * 10^6 \tag{A.2}$$

Lorsqu'une liaison covalente existe entre les atomes, leurs spins sont couplés via les électrons formant cette liaison (couplage indirect). Ce couplage engendre des déplacements chimiques supplémentaires et un dédoublement du pic d'absorption observé. Ce couplage peut non seulement se produire entre deux noyaux voisins, mais également entre deux noyaux plus éloignés, comme par exemple deux protons liés à deux atomes de carbone voisins. Dans une molécule, un noyau peut être soumis à de nombreux couplages entrainant une multiplication des pics observés. Dans le cas de la RMN du proton, on obtient 2n+1 pics où n est le nombre de voisins. En effet chaque H voisin aura 2 populations différentes (m=1/2 et m=-1/2). S'il y a un 2ème noyau H, il va séparer encore les niveaux par 2 dont un qui sera en commun car il aura la même constante de couplage. On aura donc 3 écrans différents donc 3 pics. Les intensités des pics vont suivre le triangle de Pascal (figure A.1).

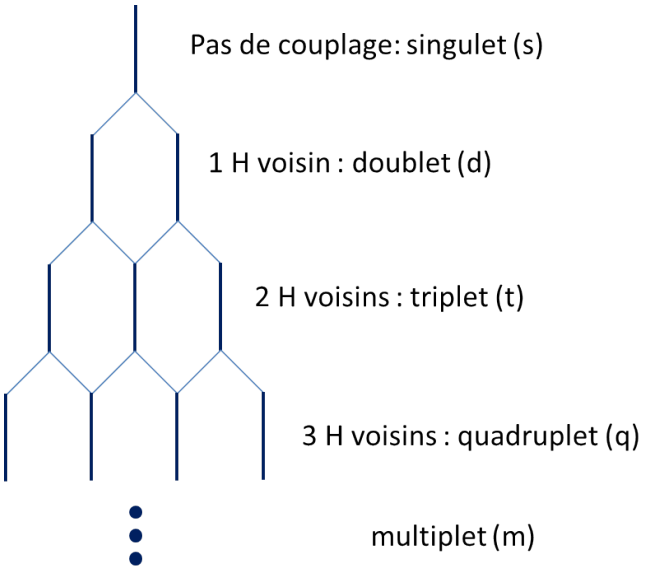

FIGURE A.1 – Représentation des effets du couplage indirect

L'acquisition d'un spectre RMN permet, à partir du champ magnétique ressentit par les différents noyaux, de déterminer l'environnement chimique de ces noyaux. Dans notre étude, les produits de synthèse isolés ont ainsi pu être identifiés à partir des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C.

Annexe B

Microscopie à Force Atomique

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique de caractérisation structurale des surfaces. Le principe de l'AFM est de mesurer les différentes forces d'interaction entre une pointe fixée à l'extrémité d'un bras de levier et les atomes de la surface d'un matériau (forces de répulsion ionique, forces de Van des Waals, forces électrostatiques, forces de friction, forces magnétiques,...). La courbure du levier est suivie en positionnant un faisceau laser sur la face supérieure de celui-ci, le faisceau est réfléchi sur un miroir puis arrive sur des photodétecteurs qui enregistrent le signal lumineux (figure B.1). Les déplacements x, y et z se font grâce à une céramique piézo-électrique. Le balayage en x, y peut aller de quelques nanomètres à plusieurs microns. La sensibilité en z atteint la fraction de nanomètre. Elle permet de mettre en évidence la planéité ou la rugosité de surfaces cristallines et dans certains cas, comme pour le silicium orienté (111), la présence d'une organisation en marches et terrasses. Elle permet aussi de visualiser des résidus éventuels sur les surfaces comme les protéines adsorbées sur la surface.

Le microscope utilisé est un AFM Nanoscope avec des pointes en nitrure de silicium Si_3N_4 ayant un rayon de courbure de 10 nm et une constate de raideur de 0.12 $N.m^{-1}$. Les surfaces sont imagées en mode topographique, ou "force constante". Une boucle d'asservissement, ou contre-réaction, agit sur le céramique piézo-électrique en z pour maintenir la force entre la pointe et la surface constante. L'analyse de l'évolution de la contre-réaction permet de connaître la topographie de la surface.

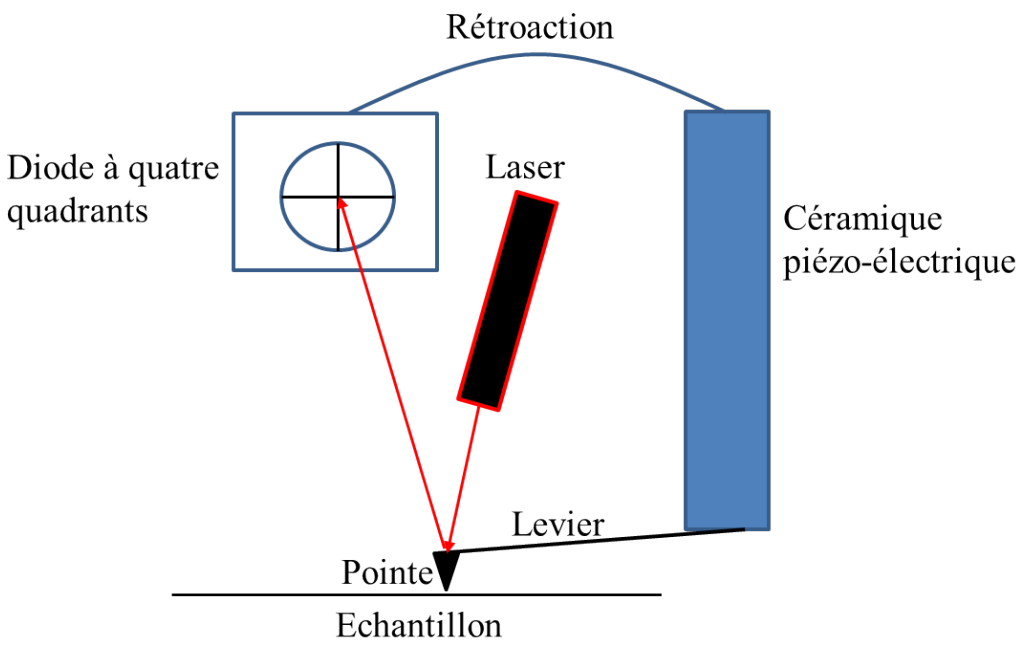

FIGURE B.1 – Schéma général de fonctionnement d'un microscope à force atomique

D'un point de vue expérimental, après l'éventuel remplacement de la pointe AFM, la première étape consiste à placer, hors contact entre la pointe et la surface, le laser au niveau du levier utilisé pour l'imagerie, de façon à lire un signal maximum sur le détecteur. Après positionnement de l'échantillon, le détecteur est déplacé à l'aide de vis afin d'avoir le spot réfléchi du laser le plus au centre possible de la diode à quatre quadrants. L'approche de la pointe peut alors commencer, celle-ci étant programmée pour s'arrêter quand le contact semble établi.

Le contrôle de la réussite de cette étape est effectuée par l'étude de la courbe de force (la pointe est descendue puis remontée rapidement afin de localiser verticalement la surface) obtenue une fois le contact supposé. Le bon fonctionnement de l'appareillage est assuré lorsque la courbe expérimentale est identique à la courbe théorique (figure B.2).

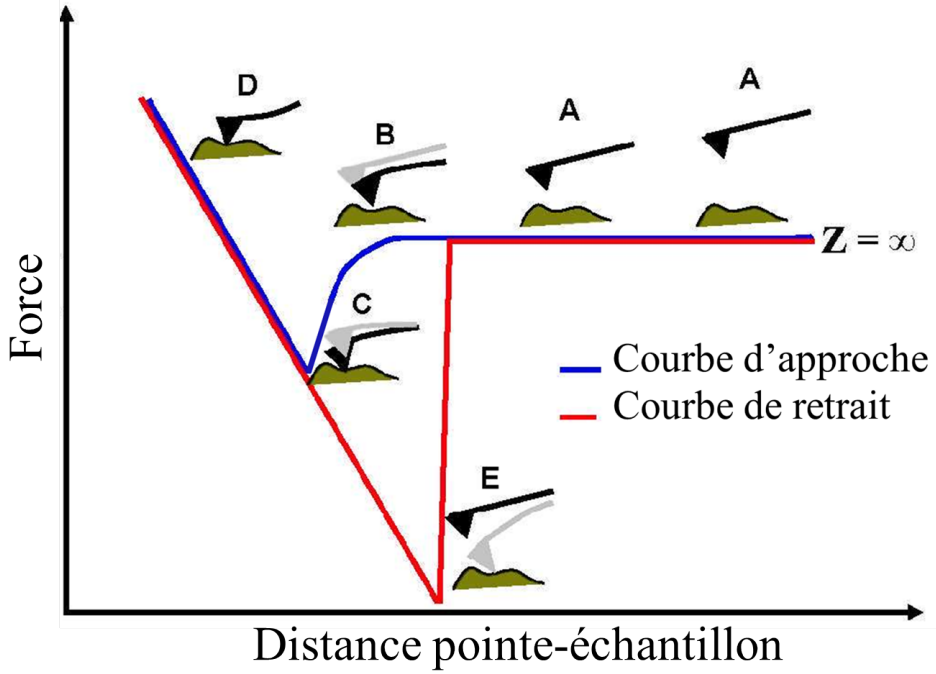

FIGURE B.2 – Principe de le courbe de force

Une zone carrée de la surface est alors balayée ligne par ligne, en maintenant la déflexion du levier à la valeur de consigne. La vitesse de balayage est de 1 Hz (une ligne par seconde). On obtient ainsi la topographie de la surface, dont la résolution dépend du rayon de courbure de la pointe utilisée (typiquement 10-50 nm) et de la taille du carré balayé.

Annexe C

Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) en mode ATR (Attenuated Total Reflection)

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR pour Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy) est une méthode permettant de caractériser la nature chimique d'un matériau par la connaissance des liaisons chimiques présentes au sein de celui-ci. En effet, le principe de la spectroscopie infrarouge vibrationnelle repose sur l'excitation, par une onde électromagnétique polychromatique dans le domaine infrarouge (900-4000 cm^{-1}), des modes de vibration et de rotation des liaisons chimiques des molécules de l'échantillon. Chaque type de liaisons possède une fréquence de vibration propre. Lorsqu'une des longueurs d'onde apportées par le faisceau lumineux est proche de l'énergie de vibration des liaisons chimiques, ces dernières vont absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise à cette longueur d'onde.

Les spectres d'absorption sont obtenus à partir d'interférogrammes (enregistrement du signal en fonction de la différence de marche produite par l'interféromètre). Une opération mathématique, la transformée de Fourier de l'interférogramme, permet de restituer le spectre d'absorption infrarouge. A partir d'un spectre classique de transmission pour un échantillon volumique, l'absorbance, ou densité optique a, est reliée à la concentration des vibrateurs, les groupements chimiques, par la loi de Beer-Lambert $a = \epsilon.l.C$ où ϵ est le coefficient d'extinction molaire caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, l l'épaisseur traversée en cm et C la concentration en $mol.L^{-1}$. Elle est déduite de l'intensité I du spectre étudié et de l'intensité I_0 d'un spectre référence par la relation $a = \ln(I_0/I)$. Les changements d'absorption observés permettent de connaître l'évolution (disparition ou apparition) des différents groupements chimiques présents.

La spectroscopie de surface exige une sensibilité bien plus grande que la spectroscopie conventionnelle car le nombre de groupements chimiques est beaucoup plus faible sur 1 cm^2 de surface qu'au sein d'1 cm^3 de solution. La spectroscopie en mode

ATR est une méthode permettant de réaliser des spectres infrarouge de molécules greffées en surface d'un matériau transparent à l'infrarouge avec une bonne sensibilité grâce à une amplification du signal associé aux réflexions multiples au sein de l'échantillon étudié. A cette fin, celui-ci doit avoir une forme particulière : celle d'un prisme (figure C.1). Cela permet en effet au faisceau infrarouge de réaliser un grand nombre de réflexions dans le cristal, lui permettant de visiter plusieurs fois l'interface et d'augmenter le signal utile.

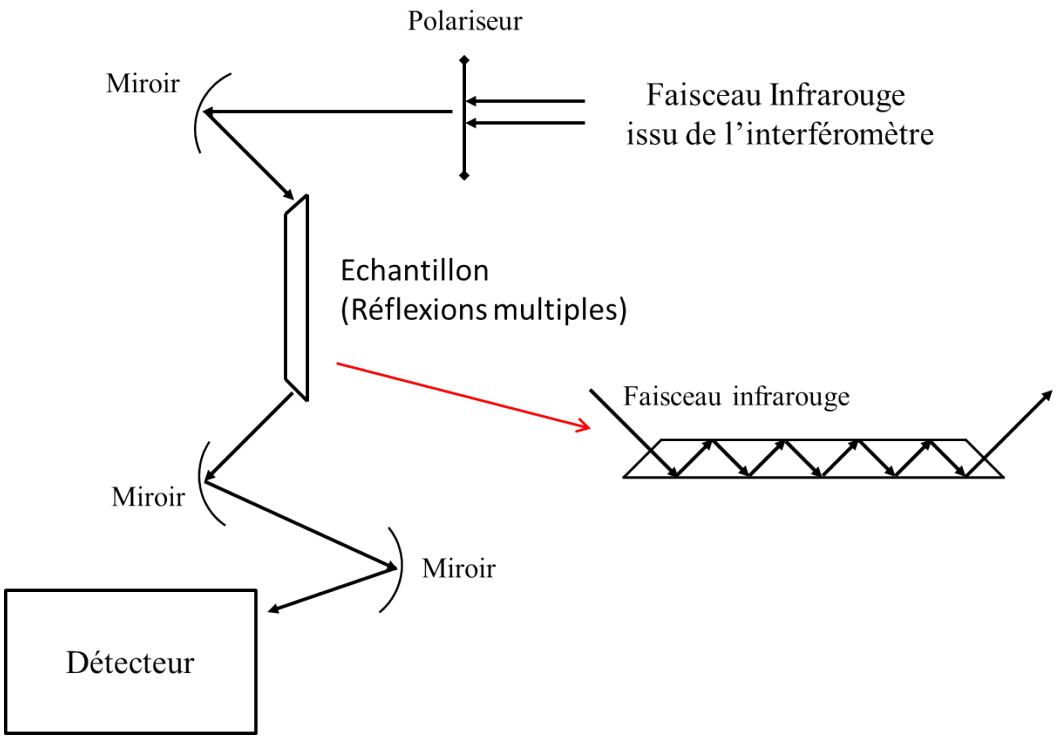

FIGURE C.1 – Principe de fonctionnement du spectromètre IR en mode ATR (vues de dessus)

Le détecteur du spectromètre infrarouge utilisé requiert une attention particulière. Etant un semi-conducteur (jonction p-n) de très petit gap (absorption dans la zone des grandes longueurs d'onde), il est conducteur à température ambiante, et doit être refroidi à chaque utilisation à l'azote liquide (l'énergie thermique à l'ambiante étant suffisante pour franchir le gap). Lors d'une mesure, le compartiment où se trouve l'échantillon est purgé sous atmosphère d'azote afin de faire disparaître les traces d'eau et de CO_2 présents dans l'atmosphère ambiante et ainsi diminuer l'intensité des signaux parasites de ces molécules.

Le nombre de réflexions N à l'intérieur du prisme dépend de la longueur l et de l'épaisseur e de l'échantillon ainsi que l'angle de réflexion interne θ, et est déterminé par la relation $N = L/(e.tan(\theta))$. Cette donnée permet de connaître l'absorbance de l'interface pour chaque réflexion, qui est indépendante du prisme utilisé. Ceci, combiné aux expériences de calibrations décrites dans le rapport, permet la détermination de la quantité de molécules greffées.

Annexe D

Mesure d'angles de contact

La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. Elle permet de mesurer l'énergie de surface du liquide ou du solide. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide. On peut ainsi, en utilisant une goutte d'eau, déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface.

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact θ.

Le type de mesure d'angle de contact le plus classique, et celui utilisé dans cette étude, est la mesure d'angle de contact statique (figure D.1), mais d'autres méthodes peuvent être utilisées pour obtenir les angles dits à l'avancée et au retrait (figure D.2) dont la différence peut permettre de caractériser la topologie de surface ou son éventuelle contamination.

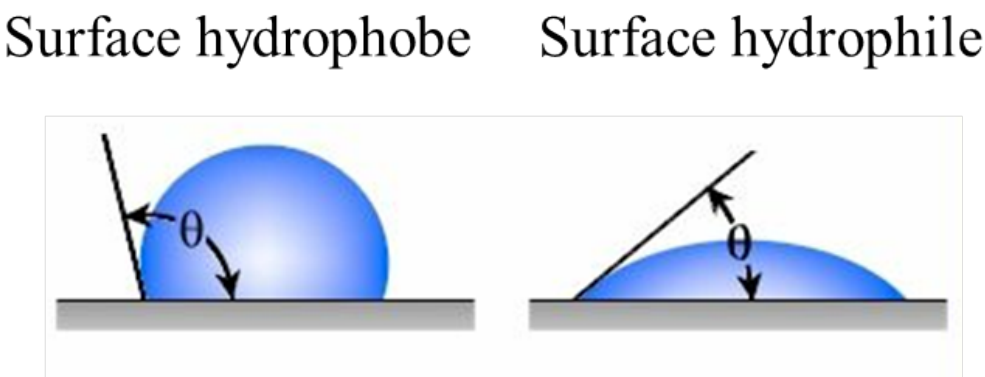

FIGURE D.1 – La mesure d'angle de contact statique δ permet la détermination de l'hydrophobicité d'une surface.

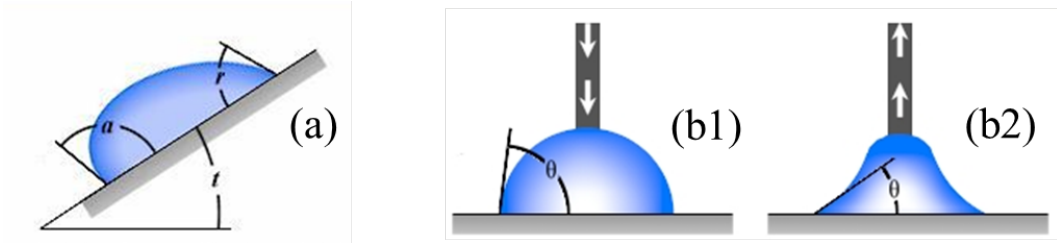

FIGURE D.2 – Deux méthodes d'obtention des angles à l'avancée et au retrait : sur plan incliné (a) et par ajout pour l'angle à l'avancée (b1) et retrait de volume pour l'angle au retrait (b2)

Annexe E

Mesure de fluorescence

La fluorescence est un processus de luminescence permettant à une molécule (appelée fluorophore) de passer d'un état électronique excité à un état d'énergie plus basse, par émission de lumière.

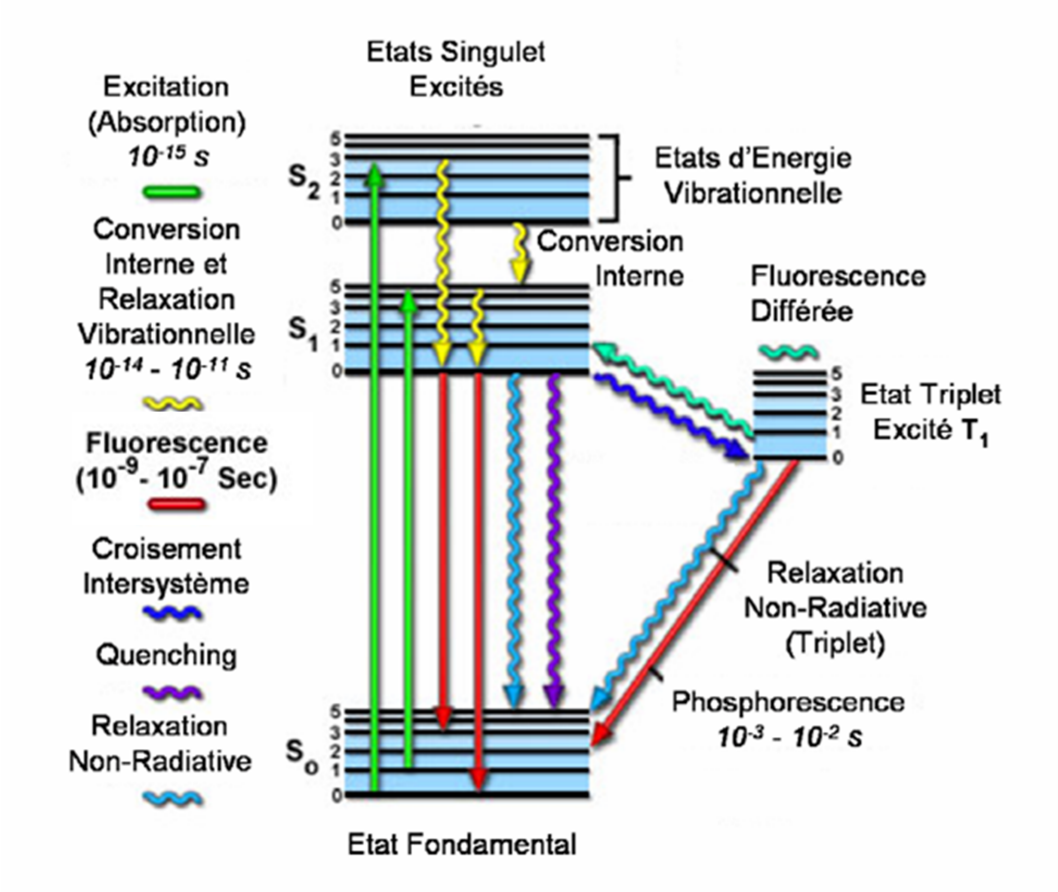

FIGURE E.1 – Diagramme de Jablonski.

Le processus de fluorescence peut être décrit à partir du diagramme de Jablonski (figure E.1). Pour une molécule donnée, il existe différents états électroniques (état fondamental et états excités) notés S_0, S_1 et S_2 sur le diagramme de Jablonski. Chaque niveau d'énergie d'une molécule est subdivisé en niveaux correspondant aux différentes excitations vibrationnelles et rotationnelles. L'état électronique est dit singulet lorsque le spin total est nul ou triplet lorsque le spin est égal à 1. Dans la

très grande majorité des cas, les molécules susceptibles de fluorescer dans le visible possèdent un système d'électrons appariés dans un état singulet où seul l'état vibrationnel v_0 est peuplé. Lors de l'absorption d'un photon suffisamment énergétique (dans la bande d'absorption des molécules), les électrons accèdent alors à un niveau d'énergie plus élevé : la molécule se trouve dans un état "excité". Les niveaux excités atteints sont par nature instables et la durée de vie de l'état excité est souvent de l'ordre de quelques nanosecondes.

Deux types de processus photophysiques permettent à la molécule excitée de dissiper son énergie excédentaire : les processus de désactivation non radiative et les processus de désactivation radiative ou luminescence. Si l'émission radiative se produit entre deux états singulets, le phénomène est appelé fluorescence. Le spectre d'émission de fluorescence est en général décalé vers des longueurs d'onde plus grandes que la longueur d'onde d'excitation (les photons émis par fluorescence ayant une énergie plus faible que celle des photons absorbés).

Il est possible d'exciter une molécule fluorescente revenue à l'état fondamental plusieurs fois, ainsi un fluorophore peut émettre des milliers de photons. Il faut cependant éviter d'exposer le fluorophore à une excitation trop longue ou trop intense pour éviter le photoblanchiment, souvent associé à une réaction de l'oxygène avec la molécule dans l'état excité et qui aboutit à une diminution de la fluorescence. La fluorescence peut aussi être affectée par des processus d'extinction lorsque de nouveaux canaux de recombinaison deviennent efficaces, par exemple au voisinage de métaux ou dans certaines configurations où les fluorophores forment des dimères.

Bibliographie

[1] P. O. Brown and D. Botstein. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics*, 21 :33–37, 1999.

[2] R. J. Lipshutz, S. P. A. Fodor, T. R. Gingeras, and D. J. Lockhart. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*, 21 :20–24, 1999.

[3] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown. Quantitative monitoring of gene expression on a genomic scale. *Science*, 270 :467–470, 1995.

[4] M. Schena, R. A. Heller, T. P. Theriault, K. Konrad, E. Lachenmeier, and R. W. Davis. Microarrays : biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends in Biotechnology*, 16 :301–306, 1998.

[5] E. Souteyrand, J. P. Cloarec, J. R. Martin, C. Wilson, I. Lawrence, S. Mikkelsen, and M. F. Lawrence. Direct detection of the hybridization of synthetic homo-oligomer DNA sequences by field effect. *Journal of Physical Chemistry B*, 101 :2980–2985, 1997.

[6] E. Souteyrand, J. P. Cloarec, J. R. Martin, M. Cabrera, M. Bras, J. P. Chauvet, V. Dugas, and F. Bessueille. Use of microtechnology for DNA chips implementation. *Applied Surface Science*, 164 :246–251, 2000.

[7] M. J. Heller. DNA microarray technology : Devices, systems, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4 :129–153, 2002.

[8] D. J. Cahill. Protein and antibody arrays and their medical applications. *Journal of Immunological Methods*, 250 :81–91, 2001.

[9] M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer, and T. O. Joos. Protein microarray technology. *Trends in Biotechnology*, 20 :160–166, 2002.

[10] V. Sakanyan and M.-C. Arnaud. Puces à protéines et perspectives d'applications médicales. *IRBM*, 28 :187–193, 2007.

[11] J. J. Gooding. Biosensor technology for detecting biological warfare agents : Recent progress and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 559 :137–151, 2006.

[12] N. O. Fischer, T. M. Tarasow, and J. B.-H. Tok. Aptasensors for biosecurity applications. *Current opinion in chemical biology*, 11 :316–328, 2007.

[13] P. Arenkov, A. Kukhtin, A. Gemmel, S. Voloshchuk, V. Chupeeva, and A. Mirzabekov. Protein microchips : use for immunoassay and enzymatic reactions. *Analytical Biochemistry*, 278 :123–131, 2000.

[14] K. B. Lee, S. J. Park, C. A. Mirkin, J. C. Smith, and M. Mrksich. Hprotein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. *Science*, 295 :1702–1705, 2002.

[15] B. B. Haab, M. J. Dunham, and P. O. Brown. Protein microarrays for highly parallel detection and quantification of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biology*, 4 :116–123, 2001.

[16] T. O. Joos, M. Schrenk, P. Hopfl, K. Kroger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schorner, M. Durr, K. Herick, and S. Rupp. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis*, 21 :2641–2650, 2000.

[17] A. Sreekumar, M. K. Nyati, S. Varambally, T. R. Barrette, D. Ghosh, T. S. Lawrence, and A.M. Chinnaiyan. Profiling of cancer cells using protein microarrays : discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Research*, 61 :7585–7593, 2001.

[18] B. Schweitzer and S. F. Kingsmore. Measuring proteins on microarrays. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 :14–19, 2002.

[19] W. C. Chan and S. Nie. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281 :2016–2018, 1998.

[20] G. Y. Liu and N. A. Amro. Positionning protein molecules on surfaces : a nanoengineering approach to supramolecular chemistry. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 99 :5165–5170, 2002.

[21] G. MacBeath and S. L. Schreiber. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 289 :1760–1763, 2000.

[22] H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, and T. Houfek. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, 293 :2101–2105, 2001.

[23] H.-Y. Zhu, V. Boiadjiev, J. A. Mulder, R. P. Hsung, and R. C. Major. Molecular assemblies on silicon surfaces via Si-O linkages. *Langmuir*, 16 :6766–6772, 2000.

[24] G. MacBeath, A. N. Koehler, and S. L. Schreiber. Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interactions en masse. *Journal of the American Chemical Society*, 121 :7967–7968, 1999.

[25] S. Heyse, H. Vogel, M. Sanger, and H. Sigrist. Covalent attachment of functionalized lipid bilayers to planar waveguides for measuring protein binding to biomimetic membranes. *Protein Science*, 4 :2532–2544, 1995.

[26] B. T. Houseman, J. H. Huh, S. J. Kron, and M. Mrksich. Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nature Biotechnology*, 20 :270–274, 2002.

[27] C. Bieri, O. P. Ernst, S. Heyse, K. P. Hofmann, and H. Vogel. Micropatterned immobilization of a G protein-coupled receptor and direct detection of G protein activation. *Nature Biotechnology*, 17 :8105–8110, 1999.

[28] E. Phizicky, P. I. Bastiaens, H. Zhu, M. Snyder, and S. Fields. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature*, 422 :208–215, 2003.

[29] M. L. Lesaicherre, R. Y. Lue, G. Y. Chen, Q. Zhu, and S. Q. Yao. Intein-mediated biotinylation of proteins and its application in a protein microarray. *Journal of the American Chemical Society*, 124 :8768–8769, 2002.

[30] M. L. Lesaicherre, M. Uttamchandani, G. Y. Chen, and S. Q. Yao. Developing site-specific immobilization strategies of peptides in a microarray. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 12 :2079–2083, 2002.

[31] J. B. Delehanty and F. S. Ligler. A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria. *Analytical Chemistry*, 74 :5681–5687, 2002.

[32] V. L. Marin, T. H. Bayburt, S. G. Sligar, and M. Mrksich. Functional assays of membrane-bound proteins with SAMDI-TOF mass spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition*, 46 :8796–8798, 2007.

[33] M. Cinier, M. Petit, M. N. Williams, R. M. Fabre, F. Pecorari, D. R. Talham, B. Bujoli, and C. Tellier. Bisphosphate adaptors for specific protein binding on zirconium phosphate-based microarrays. *Bioconjugate Chemistry*, 20 :2270–2277, 2009.

[34] J. Ptacek, G. Devgan, G. Michaud, H. Zhu, X. Zhu, J. Fasolo, H. Guo, G. Jona, A. Breitkreutz, R. Sopko, R. R. McCartney, M. C. Schmidt, N. Rachidi, S.-J. Lee, A. S. Mah, L.Meng, M. J. R. Stark, D. F. Stern, C. De Virgilio, M. Tyers, B. Andrews, M. Gerstein, B. Schweitzer, P. F. Predki, and M. Snyder. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*, 438 :679–684, 2005.

[35] Y. Kawahashi, N. Doi, H. Takashima, C. Tsuda, Y. Oishi, R. Oyama, M. Yonezawa, E. Miyamoto-Sato, and H. Yanagawa. In vitro protein microarrays for detecting protein-protein interactions : application of a new method for fluorescence labeling of proteins. *Proteomics*, 3 :1236–1243, 2003.

[36] J. Quinn, P. Patel, B. Fitzpatrick, B. Manning, P. Dillon, S. Daly, R. O'Kennedy, M. Alcocer, H. Lee, M. Morgan, and K. Lang. The use of regenerable, affinity ligand-based surfaces for immunosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 14 :587–595, 1999.

[37] B. K. Oh, Y. K. Kim, W. Lee, Y. M. Bae, W. H. Lee, and J. W. Choi. Immunosensor for detection of Legionella pneumophila using surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 18 :605–611, 2003.

[38] C. F. Becker, R. Wacker, W. Bouschen, R. Seidel, B. Kolaric, P. Lang, H. Schroeder, O. Müller, C. M. Niemeyer, B. Spengler, R. S. Goody, and M. Engelhard. Direct readout of protein-protein interactions by mass spectrometry from protein-DNA microarrays. *Angewwandte Chemie International Edition*, 44 :7635–7639, 2005.

[39] C. M. Niemeyer. Semisynthetic DNA-protein conjugates for biosensing and nanofabrication. *Angewandte Chemie International Edition*, 49 :1200–1216, 2010.

[40] G. MacBeath and S. L. Schreiber. Protein microarrays and proteomics. *Nature Genetics Supplements*, 32 :526–532, 2002.

[41] K. Y. Lee and D. J. Mooney. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews*, 101 :1869–1879, 2001.

[42] J. A. Camarero. Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports. *Biopolymers Peptide Science*, 90 :450–458, 2008.

[43] Y.-H. Woo and J. A. Camarero. Interfacing 'hard' and 'soft' matter with exquisite chemical control. *Current Nanoscience*, 2 :93–103, 2006.

[44] J. A. Camarero. New developments for the site-specific attachmentof protein to surface. *Biophysical Reviews and Letters*, 1 :1–28, 2006.

[45] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schroder, C. M. Niemeyer, and H. Waldmann. Chemical strategies for generating protein biochips. *Angewandte Chemie International Edition*, 47 :9618–9647, 2008.

[46] P. C. Lin, D. Weinrich, and H. Waldmann. Protein biochips : oriented surface immobilization of proteins. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211 :136–144, 2010.

[47] S. Chen, T. Laroche, D. Hamelinck, D. Bergsma, D. Brenner, D. Simeone, R. E. Brand, and B. B. Haab. Multiplexed analysis of glycan variation on native proteins captured by antibody microarrays. *Nature Methods*, 4 :437–444, 2007.

[48] W. Kusnezow, V. Banzon, C. Schroder, R. Schaal, J. D. Hoheisel, S. Rüffer, P. Luft, A. Duschl, and Y. V. Syagailo. Antibody microarray-based profiling of complex specimens : systematic evaluation of labelling strategies. *Proteomics*, 7 :1786–1799, 2007.

[49] I. M. Ghobrial, D. J. McCormick, S. H. Kaufmann, A. A. Leontovich, D. A. Loegering, N. T. Dai, K. L. Krajnik, M. J. Stenson, M. F. Melhem, A. J. Novak, S. M. Ansell, and T. E. Witzig. Proteomic analysis of mantle-cell lymphona by protein microarray. *Blood*, 105 :3722–3730, 2005.

[50] D. Hamelinck, H. Zhou, L. Li, C. Verweij, D. Dillon, Z. Feng, J. Costa, and B. B. Haab. Optimized normalization for antibody microarrays and application to serum-protein profiling. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4 :773–784, 2005.

[51] M. Sanchez-Carbayo, N. D. Socci, J. J. Lozano, B. B. Haab, and C. Cordon-Cardo. Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays. *American Journal of Pathology*, 168 :93–103, 2006.

[52] L. Chen, S. Fatima, J. Peng, and X. Leng. SELDI protein chip technology for the detection of serum biomarkers for liver disease. *Protein and Peptide Letters*, 16 :467–472, 2009.

[53] S. O. Jung, H. S. Ro, B. H. Kho, Y. B. Shin, M. G. Kim, and B. H. Chung. Surface plasmon resonance imaging-based protein arrays for high-throughput screening of protein-protein interaction inhibitors. *Proteomics*, 5 :4427–4431, 2005.

[54] C. T. Campbell and G. Kim. SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics. *Biomaterials*, 28 :2380–2392, 2007.

[55] B. H. Schneider, E. L. Dickinson, M. D. Vach, J. V. Hoijer, and L. V. Howard. Highly sensitive optical chip immunoassays in human serum. *Biosensors and Bioelectronics*, 15 :13–22, 2000.

[56] S. Ciampi, J. B. Harper, and J. J. Gooding. Wet chemical routes to the assembly of organic monolayers on silicon surfaces via the formation of Si-C bonds : surface preparation, passivation and functionalization. *Chemical Society Reviews*, 39 :2158–2183, 2010.

[57] D. Bélanger and J. Pinson. Electrografting : a powerful method for surface modification. *Chemical society Reviews*, 40 :3995–4048, 2011.

[58] L. Touahir, A. Moraillon, P. Allongue, J.-N. Chazalviel, C. H. de Villeneuve, F. Ozanam, I. Solomon, and A. C. Gouget-Laemmel. Highly sensitive and reusable fluorescence microarrays based on hydrogenated amorphous silicon-carbon alloys. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 :952–955, 2009.

[59] L. Touahir, J. Niedziolka-Jönsson, E. Galopin, R. Boukherroub, A. C. Gouget-Laemmel, I. Solomon, M.Petukhov, J.-N. Chazalviel, F. Ozanam, and S. Szunerits. Surface plasmon resonance on gold and silver films coated with thin layers of amorphous silicon-carbon alloys. *Langmuir*, 26 :6058–6065, 2010.

[60] M. Stutzmann, J. A. Garrido, M. Eickhoff, and M. S. Brandt. Direct biofunctionalization of semiconductors : A survey. *Physica Status Solidi a*, 203 :3424–3437, 2006.

[61] J.-N. Chazalviel, P. Allongue, A. C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, and F. Ozanam. Covalent functionalizations of silicon surfaces and their application to biosensors. *Science of Advanced Materials*, 3 :332–353, 2011.

[62] L. Touahir, E. Galopin, R. Boukherroub, A. C. Gouget-Laemmel, J.-N. Chazalviel, F. Ozanam, and S. Szunerits. Localized surface plasmon-enhanced

fluorescence spectroscopy for highly-sensitive real-time detection of DNA hybridation. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 :2579–2585, 2010.

[63] A. Faucheux, A. C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, R. Boukherroub, F. Ozanam, P. Allongue, and J.-N. Chazalviel. Well-defined carboxyl-terminated alkyl monolayers grafted onto H-Si(111) : Packing density from a combined AFM and quantitative IR study. *Langmuir*, 22 :153–162, 2006.

[64] L. Touahir, P. Allongue, D. Aureau, R. Boukherroub, J.-N. Chazalviel, E. Galopin, A. C. Gouget-Laemmel, C. H. de Villeneuve, A. Moraillon, J. Niedziolka-Jönsson, F. Ozanam, J. Salvador Andresa, S. Sam, I. Solomon, and S. Szunerits. Molecular monolayers on silicon as substrates for biosensors. *Bioelectrochemistry*, 80 :17–25, 2010.

[65] I. Banerjee, R. C. Pangule, and R. S. Kane. Antifouling coatings : Recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Advanced Materials*, 23 :690–718, 2011.

[66] C. Siegers, M. Biesalski, and R. Haag. Self-assembled monolayers of dendritic polyglycerol derivatives on gold that resist the adsorption of proteins. *Chemistry - A European Journal*, 10 :2831–2838, 2004.

[67] S. F. Chen, J. Zheng, L. Y. Li, and S. Y. Liang. Strong resistance of phosphorylcholine self-assembled monolayers to protein adsorption : Insights into nonfouling properties of zwitterionic materials. *Journal of American Chemical Society*, 127 :14473–14478, 2005.

[68] S. F. Chen, L. Y. Liu, and S. Y. Liang. Strong resistance of oligo(phosphorylcholine) self-assembled monolayers to protein adsorption. *Langmuir*, 22 :2418–2421, 2006.

[69] V. A. Tegoulia, W. S. Rao, A. T. Kalambur, J. R. Rabolt, and S. L. Cooper. Surface properties, fibrinogen adsorption, and cellular interactions of a novel phosphorylcholine-containing self-assembled monolayer on gold. *Langmuir*, 17 :4396–4404, 2001.

[70] Y. Y. Luk, M. Kato, and M. Mrksich. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Langmuir*, 105 :1103–1169, 2005.

[71] R. Chelmowski, S. D. Koster, A. Kerstan, A. Prekelt, C. Grunwald, T. Winkler, N. Metzler-Nolte, A. Terfort, and C. Woll. Peptide-based SAMs that resist the adsorption of proteins. *Journal of American Chemical Society*, 130 :14952–14953, 2008.

[72] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, and G. M. Whitesides. A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *Langmuir*, 17 :5605–5620, 2001.

[73] R. G. Chapman, E. Ostuni, S. Takayama, R. E. Holmlin, L. Yan, and G. M. Whitesides. Surveying for surfaces that resist the adsorption of proteins. *Journal of American Chemical Society*, 122 :8303–8304, 2000.

[74] K.L. Prime and G. M. Whitesides. Self-assembled organic monolayers : model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science*, 252 :1164–1167, 1991.

[75] C. Pale-Grosdemange, E. S. Simon, K. L. Prime, and G. M. Whitesides. Formation of self-assembled monolayers by chemisorption of derivatives of oligo (ethylene glycol) of structure HS-$(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_m$OH on gold. *Journal of the American Chemical Society*, 113 :12–20, 1991.

[76] K. L. Prime and G. M. Whitesides. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide) : a model system using self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society*, 115 :10714–10721, 1993.

[77] M. Mrksich, G. B. Sigal, and G. M. Whitesides. Surface plasmon resonance permits in situ measurement of protein adsorption on self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Langmuir*, 11 :4383–4385, 1995.

[78] G. B. Sigal, M. Mrksich, and G. M. Whitesides. Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents. *Journal of the American Chemical Society*, 120 :3464–3473, 1998.

[79] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, and G. M. Whitesides. Self-assembled monolayers of alkanethiolates presenting mannitol groups are inert to protein adsorption and cell attachment. *Chemical Reviews*, 16 :9604–6908, 2000.

[80] P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G.M. Whitesides, and P.E. Laibinis. Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. *Journal of Physical Chemistry B*, 102 :426–436, 1998.

[81] S. Herrwerth, W. Eck, S. Reinhardt, and M. Grunze. Factors that determine the protein resistance of oligoether self-assembled monolayers - internal hydrophilicity, terminal hydrophilicity, and lateral packing density. *Journal of the American Chemical Society*, 125 :9359–9366, 2003.

[82] S. W. Lee and P. E. Laibinis. Protein-resistant coatings for glass and metal oxide surfaces derived from oligo (ethylene glycol)-terminated alkyltrichlorosilanes. *Biomaterials*, 19 :1669–1675, 1998.

[83] N. Faucheux, R. Schweiss, K. Lutzow, C. Werner, and T. Groth. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion. *Biomaterials*, 25 :2721–2730, 2004.

[84] S. Sharma, R.W. Johnson, and T. A. Desai. Evaluation of the stability of nonfouling ultrathin poly (ethylene glycol) films for silicon-based microdevices. *Langmuir*, 20 :348–356, 2004.

[85] C. M. Yam, J. Gu, S. Li, and C. Cai. Comparison of resistance to protein adsorption and stability of thin films derived from α-hepta-(ethylene glycol) methyl ω-undecenyl ether on H-Si(111) and H-Si(100) surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 285 :711–718, 2005.

[86] T. L. Lasseter, B. H. Clare, N. L. Abbott, and R. J. Hamers. Covalently modified silicon and diamond surfaces : Resistance to nonspecific protein adsorption and optimization for biosensing. *Journal of the American Chemical Society*, 126 :10220–10221, 2004.

[87] T. L. Clare, B. H. Clare, B. M. Nichols, N. L. Abbott, and R. J. Hamers. Functional monolayers for improved resistance to protein adsorption : Oligo(ethylene glycol)-modified silicon and diamond surfaces. *Langmuir*, 21 :6344–6355, 2005.

[88] T. Böcking, K. A. Kilian, T. Hanley, S. Ilyas, K. Gaus, M. Gal, and J. J. Gooding. Formation of tetra(ethylene oxide) terminated Si-C linked monolayers and their derivatization with glycine : An example of a generic strategy for the immobilization of biomolecules on silicon. *Langmuir*, 21 :10522–10529, 2005.

[89] S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, and P. G. De Gennes. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. simplified theory. *Journal of Colloid and Interface Science*, 142 :149–166, 1991.

[90] S. I. Jeon and J. D. Andrade. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. II. effect of protein size. *Journal of Colloid and Interface Science*, 142 :149–166, 1991.

[91] I. Szleifer. Polymers and proteins : interactions at interfaces. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2 :337–344, 1997.

[92] R. L. C. Wang, H. J. Kreuzer, and M. Grunze. Molecular conformation and solvation of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers and their resistance to protein adsorption. *Journal of Physical Chemistry B*, 101 :9767–9773, 1997.

[93] K. Feldman, G. Hahner, N. D. Spencer, P. Harder, and M. Grunze. Probing resistance to protein adsorption of oligo (ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers by scanning force microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 121 :10134–10141, 1999.

[94] R. L. C. Wang, H. J. Kreuzer, M. Grunze, and A. J. Pertsin. The effect of electrostatic fields on an oligo(ethylene glycol) molecule : dipole moments, polarizabilities and field dissociation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2 :1721–1727, 2000.

[95] A. J. Pertsin and M. Grunze. Computer simulation of water near the surface of oligo(ethylene glycol)-terminated alkanethiol self-assembled monolayers. *Langmuir*, 16 :8829–8841, 2000.

[96] J. Zheng, L. Y. Li, S. F. Chen, and S. Y. Jiang. Molecular simulation study of water interactions with oligo (ethylene glycol)-terminated alkanethiol self-assembled monolayers. *Langmuir*, 20 :8931–8938, 2004.

[97] J. Zheng, L. Y. Li, H. K. Tsao, Y. J. Sheng, S. F. Chen, and S. Y. Jiang. Strong repulsive forces between protein and oligo (ethylene glycol) self-assembled monolayers : A molecular simulation study. *Biophysical Journal*, 89 :158–166, 2005.

[98] D. W. Drolet, L. Moon-McDermott, and T. S. Romig. An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nature Biotechnology*, 14 :1021–1025, 1996.

[99] R. A. Potyrailo, R. C. Conrad, A. D. Ellington, and G. M. Hieftje. Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors. *Analitical Biochemistry*, 70 :3419–3425, 1998.

[100] T. G. McCauley, N. Hamaguchi, and M. Stanton. Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules. *Analytical Biochemistry*, 319 :244–250, 2003.

[101] M. Lee and D. R. Walt. A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors. *Analytical Biochemistry*, 282 :142–146, 2000.

[102] Y. Yoshida, N. Sakai, H. Masuda, M. Furuichi, F. Nishikawa, S. Nishikawa, H. Mizuno, and I. Waga. Rabbit antibody detection with RNA aptamers. *Analytical Biochemistry*, 375 :217–222, 2008.

[103] X.-Y. Zhu, Y. Jun, D. R. Staarup, R. C. Major, S. Danielson, V. Boiadjiev, W. L. Gladfelter, B. C. Bunker, and A. Guo. Grafting of high-density poly(ethylene glycol) monolayers on Si(111). *Langmuir*, 17 :7798–7803, 2001.

[104] F. Cecchet, B. De Meersman, S. Demoustier-Champagne, B. Nysten, and A. M. Jonas. One step growth of protein antifouling surfaces : Monolayers of poly(ethylne oxide)(PEO) on oxidized and hydrogen-passivated silicon surfaces. *Langmuir*, 22 :1173–1181, 2006.

[105] G. S. Higashi, Y. J. Chabal, G.W. Trucks, and R. Krishnan. Ideal hydrogen termination of the Si(111) surface. *Applied Physics Letter*, 56 :656–658, 1990.

[106] M. R. Linford, P. Fenter, P. M. Eisenberger, and C. E. D. Chidsey. Alkyl monolayers on silicon prepared from 1-alkenes and hydrogen-terminated silicon. *Journal of the American Chemical Society*, 117 :3145–3155, 1995.

[107] J. M. Buriak. Organometallic chemistry on silicon and germanium surfaces. *Chemical Reviews*, 102 :1271–1308, 2002.

[108] A. B. Sieval, V. Vleeming, H. Zuilhof, and E. J. R. Sudhölter. An improved method for the preparation of organic monolayers of 1-alkenes on hydrogen-terminated silicon surfaces. *Langmuir*, 15 :8288–8291, 1999.

[109] A. B. Sieval, R. Linke, H. Zuilhof, and E. J. R. Sudhölter. High-quality alkyl monolayers on silicon surfaces. *Advanced Materials*, 12 :1457–1460, 2000.

[110] D. D. M. Wayner and R. A. Wolkow. Organic modification of hydrogen terminated silicon surfaces. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 2 :23–34, 2002.

[111] R. Boukherroub. Chemical reactivity of hydrogen-terminated crystalline silicon surfaces. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 9 :66–72, 2005.

[112] H. Ubara, T. Imura, and A. Hiraki. Formation of Si-H bonds on the surface of microcrystalline silicon covered with SiO_x by HF treatment. *Solid State Communications*, 50 :673–675, 1984.

[113] P. Jakob and Y. L. Chabal. Chemical etching of vicinal Si(111) : Dependence of the surface structure and the hydrogen termination of the pH of the etching solutions. *Journal of Chemical Physics*, 95 :2897–2909, 1991.

[114] P. Jakob, Y. L. Chabal, R. Krishnan, P. Dumas, and S. B. Christman. Imperfections on the chemically prepared, ideally H-terminated Si(111)-(1x1) surfaces. *Surface Science*, 275 :407–413, 1992.

[115] G. W. Trucks, K. Raghavachari, G. S. Higashi, and Y. J. Chabal. Mechanism of HF etching of silicon surfaces : A theoretical understanding of hydrogen passivation. *Physical Review Letters*, 65 :504–507, 1990.

[116] P. Allongue, V. Kieling, and H. Gerischer. Etching mechanism and atomic structure of H-Si(111) surfaces prepared in NH_4F. *Electrochimica Acta*, 40 :1353–1360, 1995.

[117] H. Fukidome and M. Matsumura. Electrochemical study of atomically flattening process of silicon surface in 40% NH_4F solution. *Applied Surface Science*, 130 :146–150, 1998.

[118] R. L. Cicero, M. R. Linford, and C. E. D. Chidsey. Photoreactivity of unsaturated compounds with hydrogen-terminated silicon (111). *Langmuir*, 16 :5688–5695, 2000.

[119] L. C. P. M. de Smet, A. V. Pukin, Q.-Y. Sun, B. J. Eves, G. P. Lopinski, G. M. Visser, H. Zuilhof, and E. J. R. Sudhölter. Visible-light attachment of Si-C linked functionalized organic monolayers on silicon surfaces. *Applied Surface Science*, 252 :24–30, 2005.

[120] Q.-Y. Sun, L. C. P. M. de Smet, B. van Lagen, M. Giesbers, P. C. Thüne, J. van Engelenburg, F. A. de Wolf, H Zuilhof, and E. J. R. Sudhölter. Covalently attached monolayers on crystalline hydrogen-terminated silicon : Extremely mild attachment by visible light. *Journal of American Chemical Society*, 127 :2514–2523, 2005.

[121] M. R. Linford and C. E. D. Chidsey. Alkyl monolayers covalently bonded to silicon surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 115 :12631–12632, 1993.

[122] J. E. Bateman, R. D. Eagling, B.R. Horrocks, and A. Houlton. A deuterium labeling, FTIR, and ab initio inverstigation of the solution-phase thermalreactions of alcohols and alkenes with hydrogen-terminated silicon surfaces. *Journal of Physical Chemistry B*, 104 :5557–5565, 2000.

[123] B. J. Eves, Q.-Y. Sun, G. P. Lopinsky, and H. Zuilhof. Photochemical attachment of organic monolayers onto H-terminated Si(111) : Radical chain propagation observed via STM studies. *Journal of the American Chemical Society*, 126 :14318–14319, 2004.

[124] A. B. Sieval, A. L. Demirel, J. W. M. Nissink, M. R. Linford, J.H. Van der Mass, W.H. de Jeu, H. Zuilhof, and E. J. R. Sudhölter. Highly stable Si-C linked functionalized monolayers on the silicon (100) surface. *Langmuir*, 14 :1759–1768, 1998.

[125] R. Boukherroub, S. Morin, P. Sharpe, D. D. M. Wayner, and P. Allongue. Insights into the formation mechanisms of Si-OR monolayers from the thermal reactions of alcohols and aldehydes with Si(111)-H. *Langmuir*, 16 :7429–7434, 2000.

[126] G. Cleland, B. R. Horrocks, and A. Houlton. Direct functionalization of silicon via the self-assembly of alcohols. *Journal of the Chemical Society , Faraday Transactions*, 91 :4001–4003, 1995.

[127] J. M. Buriak and M. J. Allen. Lewis acid mediated functionalization of porous silicon with substitued alknenes and alkynes. *Journal of American Chemical Society*, 120 :1339–1340, 1998.

[128] C. A. Hacker, K. A. Anderson, L. J. Richter, and C. A. Richter. Comparison of Si-O-C interfacial bonding of alcohols and aldehydes on Si(111) formed from dilute solution with ultraviolet irradiation. *Langmuir*, 21 :882–889, 2005.

[129] Y. Takahashi and H. Tadokoro. Structural studies of polyethers,(-$(CH_2)_m$O-$)_n$. x. crystal structure of poly (ethylene oxide). *Macromolecules*, 6 :672–675, 1973.

[130] H. Matsuda and T. Miyazawa. Vibrational analysis of molten poly(ethylene glycol). *J. Polym. Sci.*, 7 :1735–1744, 1969.

[131] A. B. Sieval, B. Van Den Hout, H. Zuilhof, and E. J. R. Sudhölter. Molecular modeling of alkyl monolayers on the Si (111) surface. *Langmuir*, 16 :2987–2990, 2000.

[132] A. B. Sieval, B. Van Den Hout, H. Zuilhof, and E. J. R. Sudhölter. Molecular modeling of covalently attached alkyl monolayers on the hydrogen-terminated Si(111) surface. *Langmuir*, 17 :2172–2181, 2007.

[133] Y. J. Chabal. Surface infrared spectroscopy. *Surface Science Reports*, 8 :211–357, 1988.

[134] N. J. Harrick. Electric field strengths at totally reflecting interfaces. *Journal of the Optical Society of America*, 55 :851–856, 1965.

[135] Anne Faucheux. *Nouvelles fonctionnalités de l'interface silicium/diélectrique pour la microélectronique*. PhD thesis, Ecole Polytechnique, 2005.

[136] Larbi Touahir. *Nouvelles architectures de biopuces à base de silicium amorphe*. PhD thesis, Ecole Polytechnique, 2010.

[137] Y. L. Jeyachandran, E. Mielczarski, B. Rai, and J. A. Mielczarski. Quantitative and qualitative evaluation of adsotption/desorption of bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir*, 25 :11614–11620, 2009.

[138] P. Gorostiza, C. Henry de Villeneuve, Q.Y. Sun, F. Sanz, X. Wallart, R. Boukherroub, and P. Allongue. Water exclusion at the nanometer scale provides long-term passivation of silicon (111) grafted with alkyl monolayers. *Journal of Physical Chemistry B*, 110 :5576–5585, 2006.

[139] K. A. Kilian, T. Böcking, K. Gaus, M. Gal, and J. J. Gooding. Si-C linked oligo(ethylene glycol) layers in silicon-based photonic crystals : Optimization for implantable optical materials. *Biomaterials*, 28 :3055–3062, 2007.

[140] T. Gibson. Phase-transfer synthesis of monoalkyl ethers of oligoethylene glycols. *Journal of Organic Chemistry*, 45 :1095–1098, 1980.

[141] E. M. D. Keegstra, J. W. Zwikker, M. R. Roest, and L. W. Jenneskens. A highly selective synthesis of monodisperse oligo(ethylene glycols). *Journal of Organic Chemistry*, 57 :6678–6680, 1992.

[142] C. M. Yam, Z. Xiao, J. Gu, S. Boulet, and C. Cai. Modification of silicon AFM cantilever tips with an oligo(ethylene glycol) derivative for resisting proteins and maintaining a small tip size for high-resolution imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 125 :7498–7499, 2003.

[143] C. M. Yam, J. M. Lopez-Romero, J. Gu, and C. Cai. Protein-resistant monolayers prepared by hydrosilylation of α-oligo(ethylene glycol)-ω-alkenes on hydrogen-terminated silicon (111) surfaces. *Chemical Communications*, 21 :2510–2511, 2004.

[144] T. Böcking, M. Gal, K. Gaus, and J. J. Gooding. Evidence for why tri(ethylene glycol) functionalized Si-C linked monolayers on Si(111) have inferior protein antifouling properties relative to the equivalent alkanethiol monolayers assembled on gold. *Australian Journal of Chemistry*, 58 :660–663, 2005.

[145] A. Lehner, G. Steinhoff, M. S. Brandt, M. Eickhoff, and M. Stutzmann. Hydrosilylation of crystalline silicon (111) and hydrogenated amorphous silicon surfaces : A comparative x-ray photoelectron spectroscopy study. *Journal of Applied Physics*, 94 :2289–2294, 2003.

[146] H. Choumane, N. Ha, C. Nelep, A. Chardon, G. O. Reymond, C. Goutel, G. Cerovic, F. Vallet, and C. Weisbuch nad H. Benisty. Double interference fluorescence enhancement from reflective slides : Application to bicolor microarrays. *Applied Physics Letters*, 87 :3, 2005.

[147] B. Fouqué, B. Schaack, P. Obeid, S. Combe, S. Getin, P. Barritault, P. Chaton, and F. Chatelain. Multiple wavelength fluorescence enhancement on glass substrates for biochip and cell analyses. *Biosensors and Bioelectronics*, 20 :2335–2340, 2005.

[148] B. Fouqué, A. G. Brachet, S. Getin, P. Pegon, P. Obeid, G. Delapierre, and F. Chatelain. Improvement of yeast biochip sensitivity using multilayer inorganic sol-gel substrates. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 :2151–2157, 2007.

[149] M. Born and E. Wolf. *Principles of Optics*. Pitman Press, 1970.

[150] I. Solomon, M. P. Schmidt, and H. Tran-Quoc. Selective low-power plasma decomposition of silane-methane mixtures for the preparation of methylated amorphous silicon. *Physical Review B*, 38 :9895–9901, 1988.

[151] T. S. Tsapikouni and Y. F. Missirlis. pH and ionic strength effect on single fibrinogen molecule adsorption on mica studied with AFM. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 57 :89–96, 2007.

[152] C. A. Rowe, L. M. Tender, M. J. Feldstein, J. P. Golden, S. B. Scruggs, B. D. MacCraith, J. J. Cras, and F. S. Ligler. Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral, and protein analytes. *Analytical Chemistry*, 71 :3846–3852, 1999.

[153] E. Briand, M. Salmain, C. Compère, and C.-M. Pradier. Immobilization of protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 53 :215–225, 2006.

[154] R. Voicu, R. Boukherroub, V. Bartzoka, T. Ward, J. T. C. Wojtyk, and D. D. M. Wayner. Formation, characterization, and chemistry of undecanoic acid-terminated silicon surfaces : patterning and immobilization of DNA. *Langmuir*, 20 :11713–11720, 2004.

[155] Y. J. Li, R. Tero, T. Nagasawa, T. Nagata, and T. Urisi. Deposition of 10-undecenoic acid self-assembled layers on H-Si(111) surfaces studied with AFM and FT-IR. *Applied Surface Science*, 238 :238–241, 2004.

[156] H. Asanuma, G. P. Lopinski, and H. Z. Yu. Kinetic control of the photochemical reactivity of hydrogen-terminated silicon with bifunctional molecules. *Langmuir*, 21 :5013–5018, 2005.

[157] A. Moraillon, A. C. Gouget-Laemmel, F. Ozanam, and J.-N. Chazalviel. Amidation of monolayers on silicon in physiological buffers : A quantitative IR study. *Journal of Physical Chemistry C*, 112 :7158–7167, 2008.

[158] L. Touahir, A. T. A. Jenkins, R. Boukherroub, A. C. Gouget-Laemmel, J.-N. Chazalviel, J. Peretti, F. Ozanam, and S. Szunerits. Surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy on silver based SPR substrates. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114 :22582–22589, 2010.

[159] G.T. Hermanson. *Bioconjugation techniques.* Academic Press, 2008.

[160] T. Strother, W. Cai, X. S. Zhao, R. J. Hamers, and L. M. Smith. Synthesis and characterization of DNA-modified silicon (111) surfaces. *Journal of American Chemical Society*, 122 :1205–1209, 2000.

[161] E. Valeur and M. Bradley. Amide bond formation : beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*, 38 :606–631, 2009.

[162] S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J.-N. Chazalviel, A. C. Gouget-Laemmel, C. H. de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, N. Gabouze, and S. Djebbar. Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. *Langmuir*, 26 :809–814, 2010.

[163] L. Touahir, J.-N. Chazalviel, S. Sam, A. Moraillon, C. H. de Villeneuve, P. Allongue, F. Ozanam, and A. C. Gouget-Laemmel. Kinetics of activation of carboxyls to succinimidyl ester groups in monolayers grafted on silicon : an real-time infrared spectroscopy study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115 :6782–6787, 2011.

[164] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, and J. J. Toole. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 355 :564–566, 1992.

[165] K. Padmanabhan, K. P. Padmanabhan, J. D. Ferrara, J. E. Sadler, and A. Tulinsky. The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. *Journal of Biological Chemistry*, 268 :17651–17654, 1993.

[166] D. M. Tasset, M. F. Kubik, and W. Steiner. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *Journal of Molecular Biology*, 272 :688–698, 1997.

[167] E. Baldrich, A. Restrepo, and C. K. O'Sullivan. Aptasensor development : Elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance. *Analytical Chemistry*, 76 :7053–7063, 2004.

[168] E. J. Cho, J. R. Collett, A. E. Szafranska, and A. D. Ellington. Optimization of aptamer microarray technology for multiple protein targets. *Analytica Chimica Acta*, 564 :82–90, 2006.

[169] E. Galopin, L. Touahir, J. Niedziolka-Jönsson, R. Boukherroub, A. C. Gouget-Laemmel, J.-N. Chazalviel, F. Ozanam, and S. Szunerits. Amorphous silicon-carbon alloys for efficient localized surface plasmon resonance sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 :1199–1203, 2010.

[170] G. M. Stovall, J. C. Cox, and A. D. Ellington. Automated optimization of aptamer selection buffer conditions. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 9 :117, 2004.

[171] M. Vairamani and M. L. Gross. G-quadruplex formation of thrombin-binding aptamer detected by electrospray ionization mass spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 125 :42–43, 2003.

[172] B. I. Kankia and L. A. Marky. Folding of the thrombin aptamer into a g-quadruplex with sr^{2+} : stability, heat and hydration. *Journal of the American Chemical Society*, 123 :10799–10804, 2001.

[173] Marie Girardot. *Aptamères et électrophorèse capillaire : caractérisation physico-chimique d'aptamères libres en solution ou greffés sur des nanoparticules, et étude de leur affinité avec une cible protéique en vue de leur emploi pour des méthodes sensibles de diagnostic.* PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie, 2010.

[174] L. Li, H. Zhao, Z. Chen, X. Mu, and L. Guo. Aptamer-based electrochemical approach to the detection of thrombin by modification of gold nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398 :563–570, 2010.

[175] J. C. Cox and A. D. Ellington. Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9 :2525–2531, 2001.

[176] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz. Flumag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383 :83–91, 2005.

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au laboratoire de Physique de la Matière Condensée de l'Ecole Polytechnique, grâce à une bourse de la Délégation Générale de l'Armement, que je remercie donc pour la confiance accordée.

Je souhaite tout d'abord exprimer toute ma gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse. En premier lieu, je tiens à remercier les rapporteurs, Rabah Boukherroub et Benoit Limoges qui ont dû lire l'ensemble de ce manuscrit avec beaucoup d'attention. Merci aussi à Thierry Livache pour être venu de Grenoble pour présider ce jury, et à Xavier Morel de la DGA pour nous avoir laissé toute l'autonomie nécessaire à la réalisation d'une étude rigoureuse. Merci à tous pour vos questions lors de la soutenance. Je garde un très bon souvenir des discussions que j'ai pu avoir avec vous à cette occasion.

Je tiens aussi à témoigner ma sincère reconnaissance à François Ozanam, à la fois en tant que directeur de thèse mais aussi en tant que directeur du laboratoire. Malgré son emploi du temps extrêmement chargé il a toujours su trouver du temps pour que l'on puisse discuter de l'avancé des travaux. J'ai aussi beaucoup apprécier son esprit critique et je le remercie pour m'avoir fait profiter de son immense compétence scientifique. Je tiens tout particulièrement à le remercier de m'avoir, à de nombreuses reprises, laissé le champ libre quant aux manips à effectuer. Cela a probablement ralenti l'arrivée des résultats significatifs mais aura permis de développer mon autonomie et de prendre pleinement conscience que ce projet était le mien. Ce n'est pas non plus un hasard s'il a été élu directeur du laboratoire PMC, car il est la force tranquille, à l'écoute de tous et d'humeur égale.

Merci aussi à mon autre directeur de thèse, Anne Chantal. C'est plus particulièrement avec elle que je discutais des détails des expériences au jour le jour et qui me remettait sur le droit chemin à chaque fois que je m'égarais. C'est grâce à elle que j'ai pu réaliser mon travail de thèse dans d'excellentes conditions et que j'en garderais un très bon souvenir. Je tiens aussi à la remercier, elle et François pour avoir lu et relu ce manuscrit afin de le rendre plus clair et compréhensible.

Mais François et Anne Chantal ne sont pas les seules personnes qui m'ont encadré pendant ces travaux. Je tiens à remercier Khalid Lahlil, pour toute son aide en matière de chimie organique et pour sa bonne humeur permanente. Je tiens aussi à le remercier d'avoir si efficacement encadré une grande partie des stagiaires et élèves de l'Ecole qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ses travaux.

Je tiens aussi à remercier Anne Moraillon, dont la bonne humeur et la simplicité en font une personne à qui il est très facile et agréable d'aller parler. Elle a parfaite-

ment tenu son rôle de phare biologiste au milieu de physiciens et de chimistes et sans son aide, je n'aurais eu aucune idée de comment outrepasser les difficultés propres à la biologie que j'eu pu rencontrer lors de cette étude.

Je voulais aussi à remercier Jean-Noël Chazalviel, qui a été mon premier encadrant au laboratoire, lors de mon stage de M2, pour sa disponibilité et sa motivation permanente. Ce fut un plaisir que de côtoyer une personne aussi cultivée et ingénieuse et qui a su garder une simplicité remarquable. J'ai toujours été étonné de voir que peu importait l'idée tordue je pouvais avoir envie d'essayer, soit Jean-Noël avait déjà fait le montage, soit il pouvait le faire en un temps record et en pensant à tous les détails.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble du groupe d'Electrochimie et Couches Minces, pour les bons moments passés en salle de manips et pour tous leurs conseils que ce soit sur la manière d'obtenir des résultats ou sur comment les présenter. Un remerciement particulier à Philippe Allongue pour mon initiation à l'AFM et à Fouad Maroun pour tous ses bons conseils.

Je souhaite aussi remercier tous les stagiaires et élèves qui ont participé à mon travail : Nicolas, Vanessa, Lionel, Cyrille, Rafa ainsi que mes élèves PSC Jeanne, Denna et Benoit. Sans vos contributions à tous, ce travail aurait été beaucoup moins complet. Je leur suis très reconnaissant du temps qu'ils ont passé et de leur implication dans le sujet.

Merci à tous les thésards et les post-docs que j'ai eu le bonheur de côtoyer pendant ces quatre ans, pour l'ambiance, les repas au Magnan ou au bord du lac, l'organisation et la gestion des barbecues et des repas de Noël et pour tous les bons moments passés ensemble. Je tiens à remercier en particulier ceux et celles avec qui j'ai pu lier de véritables liens d'amitié : Aurélie et Martin, Morgane et Jérémy, Nayely, Joëlle C. et Pierrick, Joëlle E., Amélie, Magalie, Larbi, Hugo et Juliana, Audrey, Rodolphe, avec qui j'ai partagé quelques-uns des meilleurs moments des ces dernières années, que ce soit chez les uns, chez les autres, au restaurant, au ski et même au labo.

Merci aussi à l'ensemble des membres du laboratoire PMC, qu'ils soient permanents ou temporaires, scientifiques, techniques ou administrateurs, pour la bonne ambiance qui se dégage dans les couloirs, la salle de conférence ou la salle café, et plus particulièrement Patrice et Julien pour leur enthousiasme et leur bonne humeur communicative. Un remerciement tout particulier à Jean-Pierre Boilot, qui a partagé son bureau avec moi. L'atmosphère détendue mais studieuse qui y régnait a vraiment été très agréable. Je tiens aussi à particulièrement remercier tous les membres de l'équipe de foot du labo pour tous les bons moments passés sur le terrain.

Merci à mes amis en général et à Bertrand en particulier, avec qui j'ai passé de super moments et en passerai encore de nombreux. Son amitié depuis ces quinze dernières années est un plaisir de tous les jours.

Merci à ma famille, à mes parents Marie-Ange et Emile pour tout le soutien qu'il ont su m'apporter tout au long de mes études qui se terminent enfin, à ma soeur Laetitia et à tous mes oncles, tantes, cousins, cousines et grands-parents, que je ne

vois pas assez souvent mais que je garde toujours dans mon coeur. Merci aussi à ma belle-famille, à Cécile et Bruno, pour avoir fait de chez eux un chez moi, à ma "petite soeur" Marie, elle aussi en bonne voie pour devenir docteur, et à qui je me revois encore enseigner les nombres complexes, à toute la famille Thomas-Dubouchet pour votre accueil chaleureux.

Enfin, je tiens tout particulièrement à remercier celle qui partage ma vie depuis plus de huit ans, Claire, et qui a connu les hauts et les bas de ces années de thèse autant que moi. Je la remercie en particulier pour sa patience et sa compréhension vis à vis des soirs et des week-ends que j'ai pu passé au laboratoire ou derrière mon ordinateur à rédiger ce manuscrit.