HAL
open science

Détection d'acides nucléiques avec des réseaux de transistors à effet de champs à base de graphène

Kokoura Mensah

To cite this version:

Kokoura Mensah. Détection d'acides nucléiques avec des réseaux de transistors à effet de champs à base de graphène. Biophysique. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLET010 . tel-02631689

HAL Id: tel-02631689

https://pastel.hal.science/tel-02631689v1

Submitted on 27 May 2020

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.

PSL UNIVERSITÉ PARIS

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris (ESPCI)

Détection d'acides nucléiques avec un réseau de transistors à effet de champ à base de graphène

Soutenue par
Kokoura MENSAH
Le 13 septembre 2019

Ecole doctorale n° 564
Physique en Ile de France

Spécialité
Physique

Composition du jury :

Annick, LOISEAU Directrice de recherche, Onéra	*Présidente du jury*
Vincent, BOUCHIAT Directeur de recherche, Institut Néel	*Rapporteur*
Carlotta, GUIDICCI Professeur associé, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne	*Examinatrice*
Bernard, PLACAIS Directeur de recherche, ENS-Paris	*Examinateur*
Ulrich, BOCKELMANN Directeur de recherche, ESPCI-Paris	*Directeur de thèse*

ESPCI PARIS | PSL

« Ce monde est pénétré des applications de la mesure; toute connaissance, non mesurable, est frappée d'un jugement de dépréciation. Le nom de « science » se refuse de plus en plus à tout savoir intraduisible en chiffre. »

Paul Valéry , *1871-1945*

Résumé

L'objectif de cette thèse est la détection électronique de l'hybridation de l'ADN par un réseau de transistors à effet de champ à base de graphène.

Dans une première partie, nous avons utilisé la technique de détection par fluorescence pour étudier l'influence de certains facteurs comme la température, la force ionique du milieu réactionnel, la concentration des sondes et des cibles et la durée de l'hybridation sur la réaction d'hybridation. Cette étude nous a permis de trouver des conditions optimales pour la réaction d'hybridation des oligonucléotides étudiés.

La deuxième partie est consacrée à la fabrication des puces. Des techniques originales de transfert du graphène Cu-CVD et de photolithographie ont été développées pour fabriquer des puces assez homogènes à faible niveau de dopage du graphène. Des études comparatives des matériaux pour les électrodes de contact ont permis de faire des recuits si besoin, afin de réduire le dopage et améliorer la mobilité des transistors sans dégrader les contacts. Nous avons étudié différents types et épaisseurs de couches de passivation pour trouver un compromis entre la stabilisation des caractéristiques et leur sensibilité aux biomolécules.

La troisième partie est dédiée aux applications de détection. Les molécules sondes (ssDNA) sont immobilisées sur la puce par l'intermédiaire de la polylysine (PLL), un polymère chargé positivement. L'adsorption de ce polymère induit un décalage du point de Dirac vers le sens positif des tensions de grille alors que la fixation des oligonucléotides sondes chargés négativement produit un décalage dans le sens opposé. Nous avons pu détecter la réaction d'hybridation entre les sondes et leurs cibles complémentaires (cDNA) par des mesures différentielles et des mesures en temps réel in situ.

> "This world is penetrated by the applications of measurement; all knowledge, which cannot be measured, is subject to a judgment of depreciation. The name "science" refuses more and more all knowledge untranslatable in numbers."
>
> Paul Valéry , *1871-1945*

Abstract

This work focuses on using graphene field effect transistors (GFETs) arrays for electronic detection of DNA hybridization.
In the first part, we employ fluorescence based detection to study some parameters that influence DNA hybridization, such as temperature, buffer ionic strength, probe and target concentrations and hybridization duration. Conditions for DNA hybridization have been optimized by this technique.

The second part of the manuscript is devoted to device fabrication. Original methods have been developed for the transfer of graphene grown by CVD on copper foil to Si/SiO_2 substrates, as well as for the patterning of the graphene sheet into GFET arrays. Device performance is improved after annealing in vacuum at 280°C for 24 hours if needed. Passivation layers are used for time stability of the transistor characteristics and the sensitivity.

In the third section, we describe the electronic detection of DNA hybridization by the GFET array device. Single stranded DNA (ssDNA) is immobilized on a poly-L-lysine (PLL) coated chip surface. The adsorption of a positively charged PLL polymer induces a right shift of the Dirac point whereas adsorption of negatively charged DNA probes triggers a left shift. Differential and real time in situ measurements are performed to characterize DNA hybridization.

Remerciements

Si on devrait juger tous les ingrats, à qui pardonnera-t-on ? Dans la vie, il y a forcément quelqu'un à qui on doit un petit merci, une petite reconnaissance ou une attention particulière mais qu'on a volontairement ou involontairement négligé. Que tous ceux qui ne trouvent pas leur nom dans cette partie de remerciement mais qui le méritent reçoivent mes excuses…… !

Cette thèse a été réalisée en collaboration avec plusieurs équipes. Du laboratoire Nanobiophysique à l'ESPCI au laboratoire MPQ à l'Université Paris 7 en passant par le laboratoire Pierre Aigrain à l'ENS, j'ai interagi avec beaucoup de personnes à qui je dois une sincère reconnaissance.

Je me rappelle encore de ces débuts de salle blanche avec Pascal Morfin. Quand il me parlait de masque optique, lithographie ou transfert de graphène, je comprenais pas grande chose. Mais avec une patience inouïe et son sens d'humour il m'a transmis beaucoup de notions de base en nanotechnologie. Que les autres ingénieurs de la salle blanche, Aurélie Pierret, José Palomo, et Michael Rosticher trouvent ici mes profondes reconnaissances. Leurs collègues Stéphan Suffit et Pascal Filloux de la salle blanche de Paris 7 ne sont pas du reste.

Le mot « merci » me paraît insuffisant pour témoigner de ma gratitude au professeur Jean-François Joanny. Depuis notre premier contact au Sénégal, tu as accepté sans hésitation de superviser mon mémoire de master 2. Un travail au cours duquel j'ai énormément appris. A la fin de l'année, tu as fait les mains et les pieds pour me faire venir à Paris pour faire le master AIV en me mettant en contact avec un de tes anciens étudiants, Andrew Callan-Jones qui sera l'encadreur du premier des 3 stages que j'ai effectués. Pour moi c'est deux personnalités sont plus que des chercheurs. Vous m'avez pris comme vos propres enfants ! Je vous en remercie du fond de mon cœur.

Même si Bernard Plaçais n'apparait pas comme co-encadreur de ma thèse sur les papiers officiels à cause des contraintes administratives, il a pleinement joué ce rôle. Nos réunions de mardi matin avec Aurélie ont été très instructives et pleines d'humour.

Je tiens à remercier Ulrich Bockelmann d'avoir été toujours présent lorsque j'ai besoin de ses conseils comme encadreur de thèse. Les choses deviennent relativement simples quand ton encadreur a totalement confiance en toi, te laisse faire, te soutient, te corrige et te propose de nouvelles idées.

Mes remerciements vont particulièrement à tous les membres du laboratoire NBP Laurent Geffroy, Lena Melkonyan, Thierry Bizebard et Ismaïl Cissé.

Je n'oublie pas les membres de jury : Annick Loiseau, Vincent Bouchiat et Carlotta Guidicci qui ont pris le temps de lire mon manuscrit. Vos retours ainsi que les multiples questions après mon exposé ont été très instructifs et m'ont permis de voir certaines choses sous un autre angle.

Un adieu est très déchirant mais un au revoir est plein d'espoir ! Je pense que j'aurai la chance de vous retrouver tous tôt ou tard.

Table des matières

I Chapitre 1: Introduction générale 15
II Chapitre 2 : Acides nucléiques, hybridation et fluorescence 17
II.1 Les acides nucléiques 17
II.1.1 L'acide phosphorique 17
II.1.2 Les pentoses 17
II.1.3 Les bases 17
II.2 Propriétés physico-chimiques de l'ADN 19
II.2.1 Solubilité 19
II.2.2 Absorption UV 19
II.2.3 Dénaturation thermique 20
II.2.4 Le polymorphisme de l'ADN 20
II.3 Hybridation des acides nucléiques : Idées générales 20
II.3.1 Puce à ADN 20
II.3.1.1 Fabrication de la puce. 20
II.3.1.2 Préparation des cibles 20
II.3.1.3 Hybridation des cibles avec les sondes 21
II.3.1.4 Lecture brute des données 21
II.3.1.5 Analyse des données 21
II.4 Technique de détection par fluorescence 22
II.4.1 Liste des matériels utilisés dans ce travail 22
II.4.2 Fixation des sondes 24
II.4.3 Préparation des lames 24
II.4.4 Macrodépôts 24
II.4.5 Microdépôt 25
II.5 Paramètres influençant l'hybridation 26
II.5.1 Effet de la température 26
II.5.1.1 Expérience 27
II.5.1.2 Observation 27
II.5.1.3 Conclusion 27
II.5.2 Effet de la concentration en sels 27
II.5.2.1 Expérience 28
II.5.2.2 Observation 28
II.5.2.3 Conclusion 28

II.5.3 Durée d'hybridation 28
II.5.3.1 Expérience 29
II.5.3.2 Observations expérimentales 29
II.5.3.3 Conclusion 29
II.6 Hybridation en compétition 29
II.6.1 Expérience 29
II.6.2 Observations 30
II.6.3 Conclusion 30
II.7 Hybridation des produits THRCA 30
II.7.1 Expérience 30
II.7.2 Observations 30
II.7.3 Conclusion 31
II.8 Conclusion du chapitre 31
III Chapitre 3 : Le graphène 33
III.1 L'élément carbone 33
III.2 Le graphène 34
III.2.1 Structures 34
III.2.1.1 Structure cristallographique 34
III.2.1.2 Structure atomique 35
III.2.1.3 Structure de la bande d' énergie 35
III.2.2 Transport électronique dans le graphène 36
III.2.2.1 L'effet de champ 37
III.2.2.2 La mobilité du graphène 38
III.2.3 Autres propriétés du graphène 38
III.3 Technique de fabrication du graphène 39
III.3.1 L'exfoliation mécanique 39
III.3.2 L'exfoliation chimique 39
III.3.3 La sublimation du SiC 40
III.3.4 Le dépôt chimique en phase vapeur CVD 40
III.4 Caractérisation Raman du graphène 42
III.4.1 La Spectroscopie Raman 42
III.4.1.1 Principe 42
III.4.1.2 Spectre Raman du graphène 43
III.4.1.3 Qualité du graphène 43
III.4.1.4 Nombre de couches 44
III.4.1.5 Niveau de dopage 44

III.5 Conclusion du chapitre 44
IV Chapitre 4 : Graphène et ses applications 45
IV.1 Le graphène, matériau du futur 45
IV.1.1 Biocompatibilité du graphène 46
IV.2 Les biocapteurs à base du graphène 46
IV.2.1 Introduction aux biocapteurs 46
IV.2.1.1 Classification des biocapteurs 47
IV.2.1.2 Evaluation de la performance d'un biocapteur 48
IV.2.2 Détection avec le graphène 49
IV.2.2.1 Graphène FET pour détecter le glucose 49
IV.2.2.2 Graphène FET comme détecteur de gaz 50
IV.2.2.3 Graphène FET comme détecteur de pH et de protéines 51
IV.2.2.4 Graphène FET comme détecteur d'acides nucléiques 51
IV.3 Conclusion du chapitre 55
V Chapitre 5 : Nanofabrication et caractérisation des réseaux de GFETs 57
V.1 Transfert du graphène 57
V.1.1 Dégazage de l'eau 57
V.1.2 Support mécanique 57
V.1.3 Retrait du graphène de la deuxième face 58
V.1.4 Dissolution de la feuille de cuivre 58
V.1.5 Retrait de la feuille de cuivre 58
V.1.6 Nettoyage du substrat 59
V.1.7 Protection du graphène 60
V.2 Les différentes étapes de lithographie 60
V.2.1 La lithographie 60
V.2.1.1 Première lithographie 61
V.2.1.2 Deuxième lithographie 62
V.2.1.3 Troisième lithographie 62
V.2.2 Métallisation 63
V.2.3 Passivation 64
V.2.3.1 Dépôt de Al_2O_3 par ALD 64
V.2.3.2 Dépôt de SiO_x par PECVD 65
V.2.3.3 Découpe de la couche de passivation 66
V.3 Mesure électrique 66
V.3.1 Types de dopage 67
V.3.2 Le réseau 67

V.3.2.1 Stabilisation des caractéristiques 68
V.3.2.2 Transport électronique dans le graphène 69
V.3.2.3 Mobilité 69
V.3.2.4 Mesure d'hystérèse 70
V.4 Effet du recuit 71
V.4.1 Effet du recuit sur les contacts : contact Cr/Au et contact Ti/Au 73
V.5 Bonding manuelle de la puce 74
V.6 Conclusion du chapitre 75
VI Chapitre 6 : Détections électroniques avec des réseaux de GFETs 77
VI.1 Description du dispositif expérimental 78
VI.1.1 Allure des caractéristiques courant-tension d'un transistor à base de graphène 79
VI.1.2 Dérives temporelles dans le réseau 80
VI.1.3 Formation de la double couche 81
VI.1.4 Analogue électrique de la double couche 82
VI.2 Concentration de l'électrolyte 82
VI.2.1 Expérience 82
VI.2.2 Observation 83
VI.2.3 Conclusion 83
VI.3 Nature des ions dans l'électrolyte 83
VI.3.1 Expérience 83
VI.3.2 Observation 83
VI.3.3 Conclusion 84
VI.4 pH de l'électrolyte 84
VI.4.1 Expérience 84
VI.4.2 Observation 84
VI.4.3 Conclusion 85
VI.5 Détection de l'adsorption de la poly-L-lysine (PLL) 85
VI.5.1 Expérience 86
VI.5.2 Observation 86
VI.5.3 Conclusion 86
VI.6 Fixation des sondes 86
VI.6.1 Fixation par la polylysine (PLL) 87
VI.6.1.1 Expérience 87
VI.6.1.2 Observation 87
VI.6.1.3 Conclusion 88
VI.6.2 Densité d'oligomère sondes adsorbés sur une surface de poly-L-lysine 88

VI.7 Détection de l'hybridation 89
VI.7.1 Blocage chimique et physique 89
VI.7.2 Expérience 90
VI.7.3 Observation 90
VI.7.4 Conclusion 91
VI.8 Spécificité de la détection 91
VI.8.1 Observations expérimentales 92
VI.8.2 Conclusion 92
VI.9 Effet de la concentration en cible et saturation du signal 92
VI.9.1 Conclusion 93
VI.10 Seuil de détection 93
VI.10.1 Conclusion 94
VI.11 Effet d'écrantage des charges 94
VI.11.1 Conclusion 95
VI.12 Hybridation sens et anti-sens 95
VI.12.1 Expérience 95
VI.12.2 Observation 95
VI.12.3 Conclusion 96
VI.13 Cinétique de l'hybridation 96
VI.13.1 Expérience 96
VI.13.2 Observation 97
VI.13.3 Conclusion 98
VI.14 Détection des produits THRCA 98
VI.14.1 Expérience 100
VI.14.2 Observation 100
VI.14.3 Conclusion 100
VI.15 Recyclage des puces 101
VI.16 Conclusion du chapitre 102
VII Conclusion générale et perspectives 103

I Chapitre 1: Introduction générale

La détection d'espèces d'origine biologique est de première importance dans la biotechnologie (environnement, agroalimentaire, biomédical). Un essor remarquable en matière de détection à base de biocapteurs a trouvé un regain d'intérêt dans ces dernières décennies. Ce développement incessant a été motivé par les grandes avancées technologiques et la découverte de nouveaux matériaux et les besoins de plus en plus pressant des différents secteurs touchant à la chimie, la physique et la biologie. Quel que soit le domaine, le défi principal est de détecter en un temps record des quantités de plus en plus petites et avec une grande spécificité. Les biocapteurs semblent ainsi constituer une alternative efficace et économique par rapport aux équipements traditionnels [1] qui fournissent une information très fine et complète mais présentent des contraintes importantes en termes de logistique, de coût et surtout de temps.

Dans le domaine de la médecine, la détection à base de biocapteurs de métabolites permet de contrôler certains métabolismes ainsi que le degré d'avancement de procédés biotechnologiques, la détection de biomarqueurs permet de diagnostiquer le développement de certaines tumeurs [2]. La détection d'une mutation dans un gène donné permet non seulement le diagnostic avec précision de la nature de la maladie mais aussi sa prédiction suffisamment tôt augmente les chances de succès des traitements.

Au niveau du contrôle de la qualité des eaux, l'intérêt des biocapteurs pour doser les espèces toxiques et détecter la présence des bactéries est acquis [3]. Ils présentent l'avantage de détecter en temps réel, in situ des bactéries comparés à d'autres moyens qui ont montré leurs limites [4].

Tout récemment, les biocapteurs à base d'ADN commencent à apparaître. Ce sont les propriétés de reconnaissance moléculaire de l'ADN dans la réaction d'hybridation et la conversion de cette réaction biologique en un signal mesurable optiquement, électriquement ou électrochimiquement qui a permis le développement de systèmes de bioanalyse.

La nécessité de contrôler avec des techniques à haut débit, s'appliquant à de faibles volumes et à faible coût et de détection in situ en temps réel ont conduit au développement d'une nouvelle génération de biocapteurs et de biopuces.

L'année 2004 a témoigné de la naissance d'un nouveau matériau du nom de graphène. Cet allotrope du carbone, isolé pour la première fois par Novoslov et A. Geim en 2004 à l'aide d'un simple ruban adhésif du graphite par exfoliation mécanique possède des propriétés électroniques, mécaniques et physiques uniques en son genre. En plus de toutes ces qualités, le graphène est biocompatible. Comme tous les éléments carbonés, le graphène est inerte et ne réagit pas avec les éléments chimiques. Le graphène a l'avantage de présenter une surface bidimensionnelle. Ainsi toute la surface est utilisée pour interagir avec les molécules et avoir un meilleur rendement. L'idée est simple, une substance chimique est adsorbée à la surface du graphène agit comme un donneur ou un récepteur d'électrons. Les molécules d'ADN ou d'ARN peuvent être utilisées comme donneurs ou accepteurs de charges. Ceci change la concentration des porteurs dans le film et en mesurant la résistance de la feuille de graphène on peut remonter au nombre de molécules adsorbées. L'un des enjeux de ces capteurs est de détecter la plus faible quantité de substance, la molécule. Ceci est possible avec le graphène car il possède peu de défaut et a donc l'avantage d'avoir un bruit très faible. Avec un rapport signal sur bruit très élevé, on est capable de détecter des signaux d'intensité très faible.

L'immobilisation directe des biomolécules en général et de l'ADN en particulier à la surface du graphène présente l'avantage que les molécules sont très proche du capteur et que le biocapteur a par conséquent une meilleure sensibilité. Mais en même temps, cette immobilisation directe a le désavantage d'abimer le graphène et d'altérer ses propriétés électriques (mobilité des porteurs de charge, conductivité…..). Le retrait des molécules pour régénérer le capteur sans dégrader le graphène en vue d'une nouvelle utilisation s'avère compliqué voire impossible. Nous avons proposé dans cette thèse une nouvelle approche de détection de l'hybridation des molécules d'ADN par un réseau de transistors à effet de champ à base de graphène. Cette technique consiste à contrôler le dopage du graphène à partir d'un champ électrique extérieur appliqué à travers une couche de passivation isolante, biocompatible, régénérable. Le grand nombre de transistors en réseau nous permet de faire des détections différentielles et en parallèle.

Ce manuscrit de thèse présente quatre chapitres. Le premier est consacré à la description des acides nucléiques, leurs propriétés physico-chimiques et la détection de l'hybridation par la technique de fluorescence. Nous avons utilisé cette technique pour déterminer des conditions optimales de détection de l'hybridation des oligonucléotides étudiés (température, concentration des sondes et des cibles, durée d'hybridation) et les transposer sur les puces que nous avons fabriquées.

Le deuxième chapitre est dédié à l'étude bibliographique sur le graphène et ses applications en particulier en matière de détection de biomolécules. Ce chapitre nous permet de situer nos travaux par rapport à l'art antérieur.

Dans le troisième chapitre, nous détaillons les procédés de nanofabrication que nous avons développés pour fabriquer nos puces. Ce chapitre présente les techniques originales de transfert du graphène Cu-CVD, sa protection efficace lors des séries de procédés de photolithographie, le choix des types de matériaux pour les électrodes de contact et pour la passivation qui à la fois stabilisent les caractéristiques des transistors et sont biocompatibles.

Le quatrième et dernier chapitre sera réservé à la présentation des résultats obtenus et des perspectives pour améliorer les limitations. Le recyclage des puces, leur sensibilité et leur fragilité sont quelques limitations.

II Chapitre 2 : Acides nucléiques, hybridation et fluorescence

Dans ce chapitre, nous étudions la structure des acides nucléiques en l'occurrence l'ADN et leurs propriétés physico-chimiques dans la première partie. La deuxième partie nous abordons la détection de l'hybridation par fluorescence. Nous avons utilisé cette technique pour étudier certains facteurs qui influencent l'hybridation des oligonucléotides étudiés comme la température, la force ionique du tampon, la concentration des cibles et des sondes et la durée de la réaction.

II.1 Les acides nucléiques

Il existe deux types d'acides nucléiques : l'ADN et les ARN. L'ADN ou acide désoxyribonucléique est le support de l'information génétique. En effet, il est divisé en segments d'ADN qui correspondent à des gènes (ou unités de transcription) qui eux même codent pour une protéine. Les ARN (acide ribonucléique) ont soit un rôle de support de l'information afin d'être traduit en protéines (ARN messager), ou bien un rôle structural et fonctionnel (ARN ribosomiques, ARN de transferts et autres petits ARN). Ces acides sont appelés nucléiques en raison de leur abondance dans les noyaux cellulaires où ils ont été isolés pour la première fois en 1869 par Miescher sous le nom de "nucléine" [5]. Les acides nucléiques sont constitués d'acides phosphoriques, de pentoses et de bases azotés.

II.1.1 L'acide phosphorique

L'acide phosphorique est un triacide dont une fonction acide est dissociée permettant de donner une charge négative à l'ADN, et dont les deux autres peuvent former des liaisons phosphodiester.

II.1.2 Les pentoses

Les pentoses sont des glucides cycliques à 5 atomes de carbone qui sont sous forme de β-D-ribofurane et sous forme « désoxy » pour l'ADN.

II.1.3 Les bases

Il existe cinq bases d'acide nucléiques naturelles. On parle de bases azotées, de base nucléiques ou de nucléobases. Trois d'entre elles sont communes aux ADNs et aux ARNs.

On peut décomposer ces bases en deux familles : les bases dites « puriques » (A et G) qui sont construites sur un motif purine et les bases pyrimidiques (C, T et U), basées sur un motif pyrimidine.

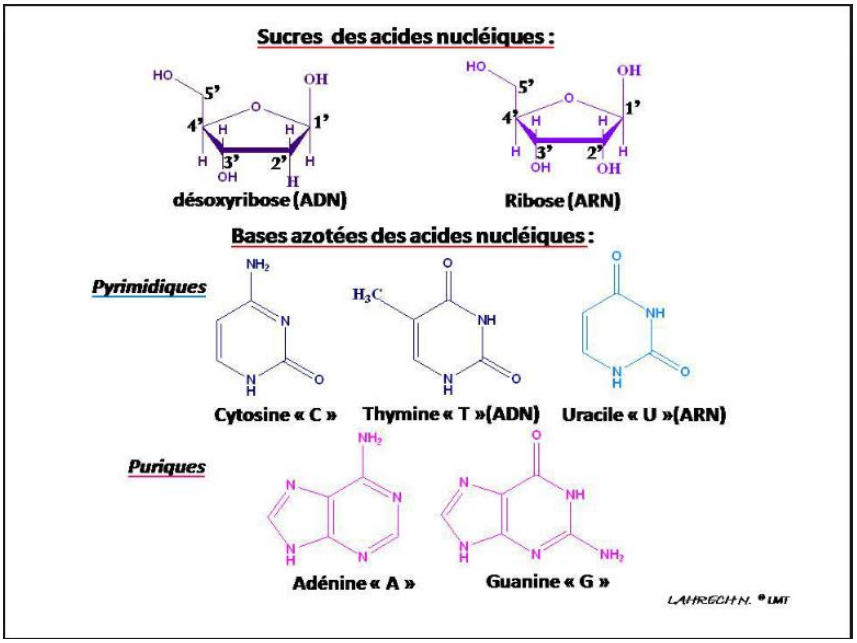


Figure 1. Structure des sucres (désoxyribose(ADN) et ribose (ARN)) et des bases azotées dans l'ADN et l'ARN : les bases pyrimidiques (cytosine, thymine(ADN) et uracile(ARN) et les bases puriques (Adénine et guanine)

L'association d'une base et d'un pentose par une liaison N-glycosidique est appelée un nucléoside et l'association d'un nucléoside et de l'acide phosphorique par une liaison phosphodiester en 5' du pentose est appelée un nucléotide.

L'ADN contrairement à l'ARN est une molécule bicaténaire étant constituée de deux brins dirigés de manière antiparallèle et associés en doubles hélices de type B. Il est constitué d'autant de bases puriques que de bases pyrimidiques, en effet il y a autant d'adénine que de thymine, et autant de guanine que de cytosine. Les deux brins sont liés grâce à des liaisons hydrogènes présentes entre toutes les bases de l'ADN : deux liaisons hydrogènes entre les bases A et T, et trois liaisons hydrogènes entre les bases G et C. Les forces dues à ces liaisons hydrogènes sont supérieures aux forces répulsives (dues aux charges négatives des groupements phosphates sur chaque brin) qu'il y a entre les charges moins présentes sur les deux brins de l'ADN. La double hélice de l'ADN a un diamètre de 20 Å, un pas de 34 Å qui correspond à 10 nucléotides. L'hélice est dite droite car elle s'enroule à droite en la regardant du haut vers le bas. Entre deux paires de bases on mesure un angle de 36°. De plus la molécule d'ADN est dextrogyre, c'est-à-dire qu'elle a la propriété de faire dévier le plan de polarisation de la lumière polarisée vers la droite.

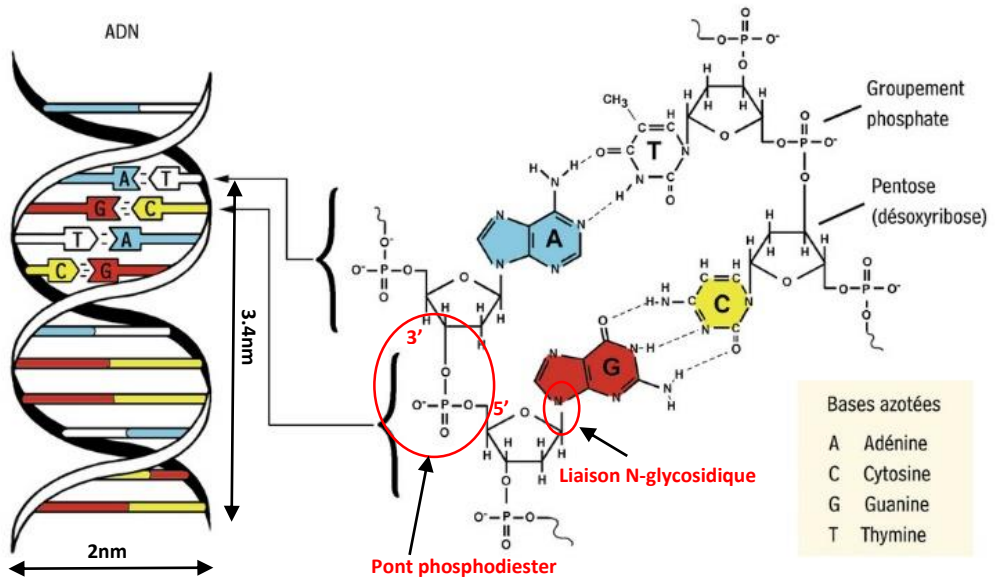


Figure 2. Structure d'une molécule d'ADN double hélice montrant l'appariement des bases azotées. Adénine (A), Cytosine(C), Guanine(G) et Thymine(T) [135]

II.2 Propriétés physico-chimiques de l'ADN

II.2.1 Solubilité

L'ADN devient un sel d'acide en milieux aqueux et est ainsi soluble. Il précipite en présence d'éthanol et d'une forte concentration saline. Cette propriété permet sa purification. Le tableau suivant renseigne l'ordre de grandeur et la masse de l'ADN de différentes espèces.

Pb = paire de base	Taille	masse	longueur
Adenovirus	35 10^3pb	10^7 Da	1.1 10^{-6}m
E.coli	3.5 10^6pb	10^9 Da	1.3 10^{-3}m
Homme	6 10^9pb	10^{12} Da	2m

II.2.2 Absorption UV

En biologie moléculaire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques après leur purification. La méthode la plus utilisée pour le dosage d'acides nucléiques est la spectrophotométrie qui mesure l'absorbance (ou densité optique) des acides nucléiques à 260 nm (absorbant dans l'ultraviolet). La spectrophotométrie d'absorption dans l'UV est une méthode très courante en laboratoire. Elle repose sur la propriété des molécules (Ex. acides nucléiques, protéines …) d'absorber des radiations lumineuses à une longueur d'onde déterminée. L'absorbance (A) aussi appelée Densité Optique (D.O) est la mesure quantitative d'absorption d'une radiation UV-visible à une longueur d'onde donnée par un composé ou un échantillon. Les nucléotides absorbent dans les UV et cette absorption dépend de l'angle d'incidence des rayons UV.

L'absorbance A est définie par $Log(I_0/I)$ où I_0 est l'intensité de la lumière incidente et I est l'intensité transmise après le passage à travers la cuve contenant la solution ou l'échantillon.

II.2.3 Dénaturation thermique

La dénaturation thermique correspond au fait que les deux brins de l'hélice se dissocient par l'action de la chaleur. La température de fusion ou Tm est la température à laquelle la molécule d'ADN est à moitié désappariée. Elle dépend de la longueur de la molécule d'ADN. En effet les petites molécules sont moins stables et ont donc une température de fusion plus faible. Elle dépend aussi de la richesse en paires de bases C-G (40% dans le cas du génome humain) celles-ci plus stables que les paires de bases A-T, ce qui augmente la température de fusion [6]. La Tm est de 86°C pour le génome humain et la dénaturation complète est à 95°C. La dénaturation est mesurable par la mesure du Tm, en effet la dénaturation augmente l'absorption des rayons UV, ceci est appelé l'effet hyperchrome. La température de fusion est représentée sous la forme d'une courbe sigmoïde (Figure 10) qui traduit l'effet coopératif de la dissociation de l'ADN. Le chemin inverse de la courbe correspond à la renaturation. Elle se fait lors d'un refroidissement lent pour permettre la réassociation des deux brins. Lorsque le refroidissement est trop rapide, la réassociation est irréversible. La renaturation est seulement possible pour des petites molécules d'ADN. L'augmentation des forces ioniques du milieu réactionnel (NaCl par exemple) permet une renaturation plus facile, les cations Na^+ neutralisant les forces répulsives de l'ADN.

II.2.4 Le polymorphisme de l'ADN

Le polymorphisme correspond aux variations de la séquence nucléotidique de l'ADN d'un gène dans une population [7]. Par exemple les gènes qui codent pour des protéines ne représentent que 3% du génome humain, le restant de la molécule d'ADN (97%) est non codante. De plus la structure de l'ADN humain est très variable d'un individu à un autre et ces variations sont surtout présentes au niveau de ces parties non codantes, mais aussi au niveau des gènes codants.

II.3 Hybridation des acides nucléiques : Idées générales

II.3.1 Puce à ADN

Une puce à ADN est un ensemble d'échantillons d'ADN simple brin fixés de manière ordonnée sur une petite surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique. Cette biotechnologie récente permet d'analyser le niveau d'expression des gènes (transcrits) dans une cellule, un tissu, un organe, un organisme ou encore un mélange complexe à un moment donné dans un état donné par rapport à un échantillon de référence.

II.3.1.1 Fabrication de la puce.

Les fragments d'ADN dont on souhaite déterminer le niveau d'expression sont amplifiés par la technique de PCR (par exemple) puis déposés sur une lame préalablement recouverte de polylysine: cette substance assure la fixation de l'ADN par des interactions électrostatiques. On peut aussi fixer les oligonucléotides par des liaisons covalentes (voir VI.6). Ces fragments d'ADN fixés à un support constituent des sondes. Ces puces sur lame de verre sont appelées microarrays. Les lieux de dépôts de l'ADN sur le support solide sont des spots. Ces molécules d'ADN simples brins sont en effet capables de reconnaître spécifiquement des acides nucléiques (ADN ou ARN) simple brin de séquences complémentaires (cibles) en formant par hybridation le duplex de l'ADN.

II.3.1.2 Préparation des cibles

Des ARN sont extraits de différents types de cellules (notés arbitrairement ici cellules (a) et cellules (b)) pour lesquelles on veut comparer le niveau d'expression du gène étudié (c'est-à-dire celui qu'on a fixé sur la puce). Les ARN messagers permettent d'obtenir des ADNc par transcription inverse (RT).
Les ADNc sont marqués de manière différente : par exemple, l'ADN des cellules (a) est marqué avec un fluorophore vert**,** tandis que l'ADN des cellules (b) est marqué avec un fluorophore rouge.

II.3.1.3 Hybridation des cibles avec les sondes

Les ADN marqués en vert et ceux marqués en rouges sont mélangés (cet ensemble constitue la cible) La puce est alors incubée une nuit à dans cette solution à une température bien déterminée. A cette température, un brin d'ADN s'apparie avec son complémentaire ce qui forme de l'ADN double brin. La détection localisée des différentes microsurfaces où s'est produit l'hybridation sur la puce permet ainsi d'identifier les séquences génétiques présentes dans l'échantillon d'acides nucléiques analysé.

II.3.1.4 Lecture brute des données

Chaque spot (c'est-à-dire chaque emplacement sur la puce) est excité par un laser et on enregistre la fluorescence émise d'une part dans le rouge, d'autre part dans le vert. On obtient alors deux images dont le niveau de gris représente l'intensité de la fluorescence lue. En remplaçant les niveaux de gris par des niveaux de vert pour la première image et des niveaux de rouge pour la seconde, on obtient en les superposant une image en fausses couleurs composée de spots allant du vert (cas où seulement de l'ADN des cellules (a) s'est fixé à la sonde) au rouge (cas où seulement de l'ADN des cellules (b) s'est fixé à la sonde) en passant par le jaune (cas où l'ADN des deux types de cellules s'est fixé en quantité égale).

II.3.1.5 Analyse des données

Il s'agit, à partir des deux images de la puce, de calculer le rapport du nombre des molécules d'ADNc qui se sont hybridées avec les molécules d'ADN de la sonde. Pour cela, on mesure l'intensité du signal dans la longueur d'onde d'émission du fluorophore vert et l'intensité du signal dans la longueur d'onde d'émission du fluorophore rouge. Puis on normalise ces quantités en fonction de divers paramètres (quantité de cellules au départ , puissance d'émission de chaque fluorophore, ...). On suppose que la quantité d'ADNc fluorescent fixée est proportionnelle à la quantité d'ARNm correspondant dans la cellule de départ et on calcule le rapport fluorescence rouge / fluorescence verte**.** Si ce rapport est supérieur à 1 , cela signifie que le gène étudié est plus exprimé dans les cellules (b) ; si ce rapport est inférieur à 1, cela signifie que le gène est moins exprimé dans les cellules (b).

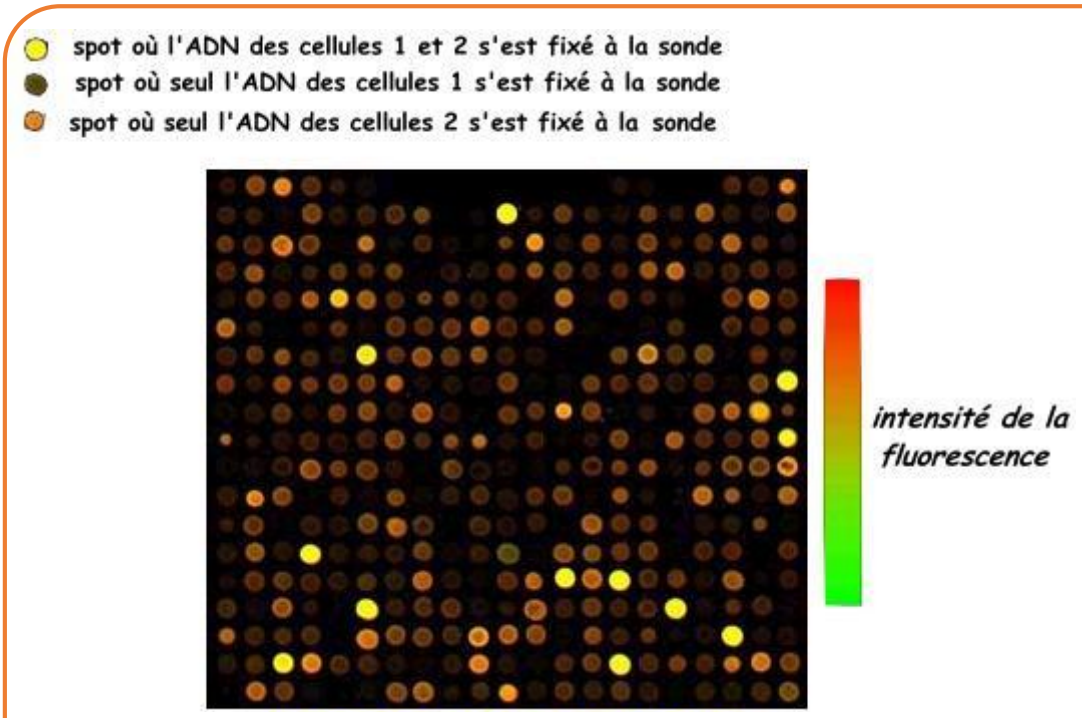


Figure 3. Image de fluorescence à deux couleurs d'une partie d'une puce d'ADN. [136]

II.4 Technique de détection par fluorescence

Dans l'hybridation des acides nucléiques, des populations d'acides nucléiques ou d'oligonucléotides bien caractérisées (sondes) sont utilisées afin d'identifier des séquences apparentées dans un mélange complexe et souvent mal compris d'acides nucléiques à tester. La réaction d'hybridation des acides nucléiques repose sur la spécificité de l'appariement des bases. Ainsi selon la règle de Watson et Crick, l'adénine (A) ne peut que s'apparier à la thymine (T) avec une double liaison hydrogène et la guanine (G) à la cytosine (C) avec trois liaisons d'hydrogène. Les acides nucléiques de la sonde et du mélange complexe à tester sont sous forme de simples brins et mélangés pour permettre la formation d'hétéroduplexes entre la séquence de la sonde et toute séquence de l'échantillon à tester qui serait en partie ou en totalité (cible) complémentaire. Le plus souvent, les hétéroduplexes sont détectés par marquage (par un élément radioactif ou un fluorophore) [8] d'un acide nucléique en solution aqueuse qui pourra s'hybrider avec un mélange d'acides nucléiques non marqués, fixés sur un support solide. Après lavage, afin d'enlever les acides nucléiques marqués non hybridés ou faiblement hybridés, tout marquage restant sur le support solide est constitué d'hétéroduplexe sonde-cible. La stabilité d'un hétéroduplexe dépend du nombre de bases appariées. Elle est influencée par certains paramètres comme la longueur du segment présentant des bases appariées, la température, et la force ionique de l'environnement.

II.4.1 Liste des matériels utilisés dans ce travail

Dans nos expériences les matériels suivants sont utilisés. L'eau déionisée (eau DI), 18MΩ.cm à 25°C pour la préparation des solutions et les rinçages. La poly-lysine (PLL) de masse molaire 150000-300000 g/mol (Sigma,P8920-100ML,0.1% w/v dans l'eau, pH=7.2 à 25°C). La structure de la poly-lysine est représentée sur la **Figure4**.

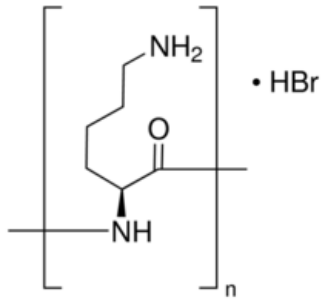


Figure4 Formule de la poly-L-lysine

Pour préparer une solution de PLL, nous utilisons le tampon PBS (Phosphate Buffer Saline). La composition de ce tampon est consigné dans le tableau suivant.

Sels	Concentration (mmol/L)	Concentration (g/L)
NaCl	137	8.00
KCl	2.7	0.2
Na_2HPO_4	10	1.44
KH_2PO_4	1.76	0.24

La recette pour préparer une concentration C_0= 85µM de PLL est la suivante

PLL(C_0) = 32mL (H_2O) + 4mL (PBS) + 4mL (PLL)

La recette pour préparer une solution de Brown est :

Brown solution = Ethanol (99.99%) 29.6mL + NaOH (16M) 4.9mL + H_2O 15.6mL

Les oligonucléotides sont synthétisés par Eurogentec et restitués à une concentration de 100µM dans l'eau DI et stockés à -20°C. Les aliquotes de faible concentration sont conservés à 4°C pour des usages quotidiens. Les séquences des oligonucléotides utilisés sont présentées dans le tableau suivant

Nom	Séquence	Fonctionnalisation	Nbre de bases	Complémentaire de
Ars3	[5']CCGCGAACTGACTCTCCGCC[3']	non	20	Ars3sens
Ars3sens	[5']GGC GGA GAG TCA GTT CGC GG[3']	Cy3 ou Cy5	20	Ars3
Ars5	[5']CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT[3']	non	20	Ars5sens
Ars5sens	[5']AAC GTC AGC CCT GCC GCC TG[3']	Cy3 ou Cy5	20	Ars5
Ars7	[5']TAT AGC GTA CGA ACT CCA GC[3']	non	20	Ars7sens
Ars7sens	[5']GCT GGA GTT CGT ACG CTA TA[3']	Cy3 ou Cy5	20	Ars7
Lprime	[5']GGG TTT TGC TAT CAC GTT GTG[3']	non	21	-

Certains des oligonucléotides que nous appelons les cibles sont fonctionnalisés par les fluorophores Cy3 ou Cy5 par la terminaison 5'. Leur structure chimique est représentée sur la Figure 5.

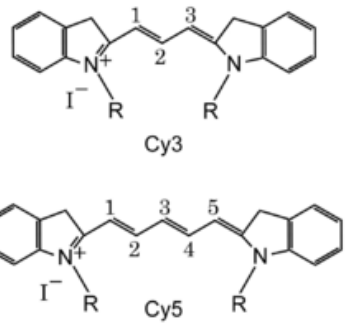


Figure 5 ***Structure chimique des fluorophores cyanine Cy3 et Cy5***

Le spectre d'émission et d'absorption de ces molécules est représenté sur la **Figure 6**.

Nous avons utilisé un scanner équipé de deux lasers de longueur d'onde 532nm et 635nm. Ceci permet de distinguer facilement deux échantillon fonctionnalisés avec Cy3 ou Cy5.

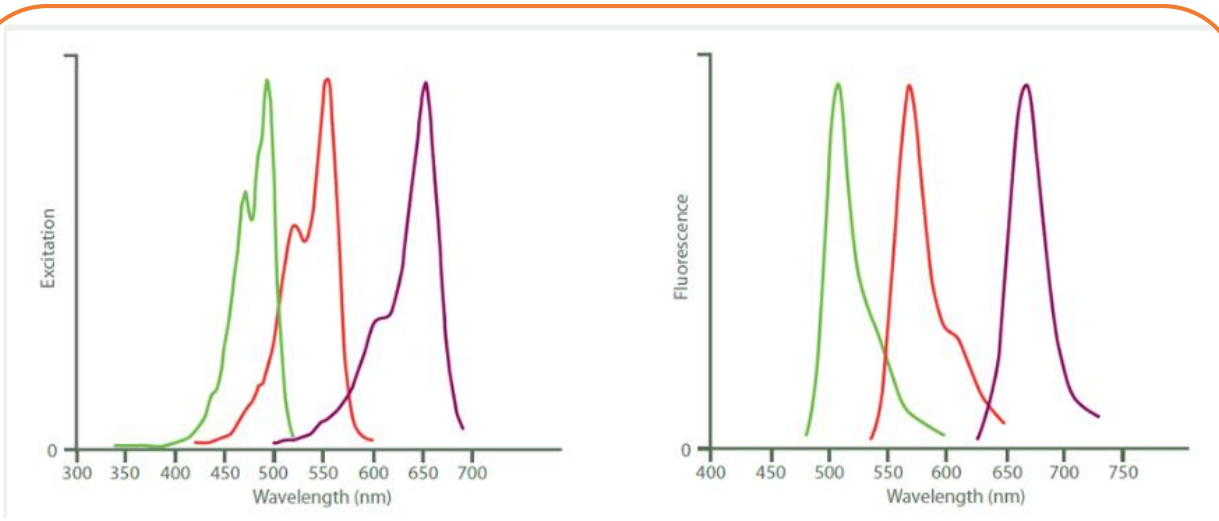


Figure 6. Spectre d'excitation (à gauche) et d'émission (à droite) de Cy2 (vert), Cy3 (rouge) et Cy5 (violet). Les hauteurs des pics ont été normalisées après que les spectres ont été obtenus avec un système de spectrofluoromètre série M de Photon Technology International. [137]

II.4.2 Fixation des sondes

L'hybridation est une réaction spécifique entre les paires de base de deux brins complémentaires d'une séquence d'ADN**.** Elle peut se faire sur un support solide (hybridation 2D) ou en solution (hybridation 3D). Dans le premier cas, il faut immobiliser les sondes sur une surface. Cette fixation peut se faire par des liaisons biotine-avidine [9], une liaison covalente [10] ou encore une liaison électrostatique. Dans nos études, nous utilisons les lames de verres comme support solide et la poly-L-lysine comme moyen d'attache des molécules. On peut procéder manuellement au dépôt des sondes (macrodépôt) ou par un robot programmé (microdépôt).

II.4.3 Préparation des lames

Des lames SuperFrost Plus ESCO (75X25 mm^2) sont lavées dans une solution de Brown pendant 30 min sur agitateur puis rincées deux à trois fois avec de l'eau déionisée (DI) afin de les rendre optiquement propres. Elles sont ensuite incubées pendant une heure dans une solution de poly-L-lysine (PLL). La PLL est un polymère qui est utilisé généralement en biologie pour fixer par effet électrostatique les biomolécules sur un substrat solide. Une fois déposée sur une surface de verre, la PLL permet d'adsorber efficacement les molécules d'ADN par effet électrostatique. Les lames sont ensuite séchées à l'air comprimé puis conservées au moins une nuit en boîte sèche pour les rendre hydrophobes.

II.4.4 Macrodépôts

Une solution de sondes, Ars3 et Ars5 à 1µM est préparée et déposée en gouttes de volume 0.2 µl de chaque espèce dans une zone marquée sur la lame. La lame est placée dans une boîte humide pendant 45 minutes environ pour un séchage doux des gouttes. On incube la lame pendant 30 minutes dans de l'anhydride acétique (blocage chimique) pour neutraliser chimiquement la PLL autour de la goutte. Une deuxième incubation de 30 minutes dans une solution de Lprime (solution d'oligonucléotides d'ADN de 21 bases dont la séquence est très différente de celle des cibles) permet de bloquer la PLL résiduelle. Ces étapes de blocage de surface sont nécessaires pour éviter les adsorptions non-spécifiques des cibles lors de la réaction d'hybridation. On procède à l'hybridation en introduisant la lame dans une chambre d'hybridation. La solution d'hybridation est un tampon physiologique (PBS) de pH 7 à température 25°C (voir II.4.1). On dépose ensuite pendant 30 minutes 70µl de la solution d'hybridation contenant des oligonucléotides cibles (complémentaires des sondes) marqués par les fluorophores cy3 (vert) ou cy5 (rouge). Chaque sonde pourra alors s'hybrider avec sa cible complémentaire. Les cibles non hybridées ou mal hybridées aux sondes sont éliminées par rinçage. La lame est d'abord

scannée avec le scanner InnoScan 710, d'Innopsys muni de deux lasers. Les fluorophores cy3 et cy5 sont alors excités respectivement par le laser vert (F532 nm) et rouge (F635 nm). Les signaux obtenus sont des émissions de fluorescence aux points d'hybridation. L'intensité du signal de chaque spot pour les deux longueurs d'onde d'émission des deux fluorophores est ensuite mesurée et quantifiée par un logiciel(Mapix). Les différentes étapes d'écrites sont résumées sur la **Figure 7**

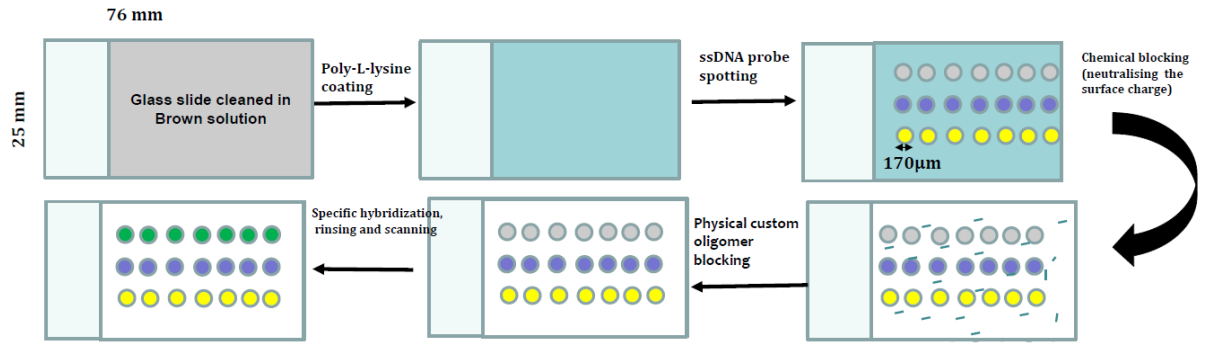


*Figure 7. **Illustration schématique des différentes étapes (traitement de la lame, spotting, les blocages chimique et chimique, l'hybridation et la révélation) de l'hybridation sur une lame de verre.***

II.4.5 Microdépôt

Le microdépôt se fait à l'aide d'un robot (Nano-plotter) dont la photographie est montrée sur la **Figure 8**. On a défini un tableau avec un programme écrit sous LabWindowsCVI (National Instruments) et NPL (Nano Plotter Language, Gesim GmbH) pour faire les spottings. Le programme permet de subdiviser la lame en 18 zones. Dans chaque zone, on peut « spotter » 3 voire 4 rangées de 10 spots de sonde. Dans chaque spot on peut définir le nombre de gouttes. Le nombre de gouttes définit la taille du spot. Un spot de 3, 5 et 10 gouttes a un diamètre de 105, 130 et 170 µm respectivement. En microdépôt, la concentration des sondes est fixée à 10µM. Les autres étapes sont les mêmes que pour le macrodépôt.

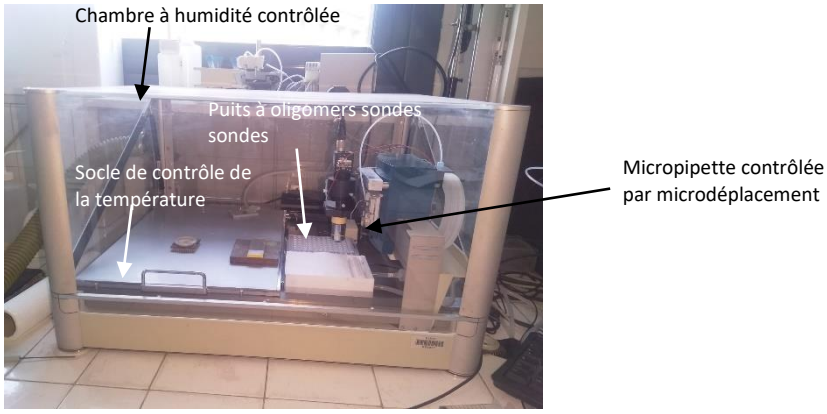


Figure 8. Photographie du robot (Micro pipetting system, Nano-Plotter, Model 2.0) et description des principaux éléments du montage

Le paramètre étudié est le rapport signal sur bruit de fond de la lame (SNR) pour l'anglais (Signal to Noise Ratio). Le SNR est défini selon la technique suivante: Une grille est établie par le logiciel Mapix pour mesurer les intensités totales de fluorescence sur chaque spot pour chacune des radiations de longueur d'onde λ=635nm (laser émettant dans le rouge) et λ= 532nm (laser émettant dans le vert) pour avoir l'intensité du signal spécifique. La même grille est définie sur le fond de la lame (partie non spottée) pour avoir l'intensité du signal du bruit de fond. Le SNR est défini comme le quotient de la

moyenne de l'intensité totale spécifique d'une espèce (Ars3senscy3 ou Ars5senscy5) à une radiation donnée par la moyenne de l'intensité totale du fond pour la même radiation.

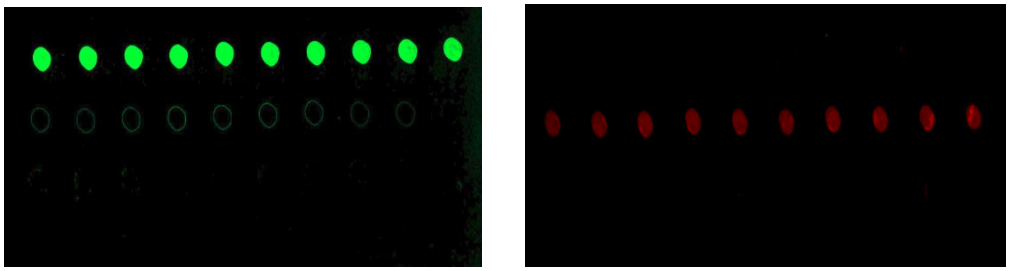


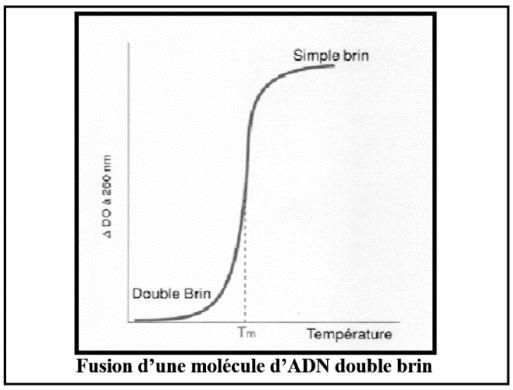
Figure 9. Scan de deux zones d'une lame. A gauche, la zone est hybridée par le ARS3sensCy3 complémentaire de ARS3 spotté en première rangée et à droite, la zone est hybridée par ARS5sensCy5 complémentaire de ARS5 spotté en deuxième rangée.

II.5 Paramètres influençant l'hybridation

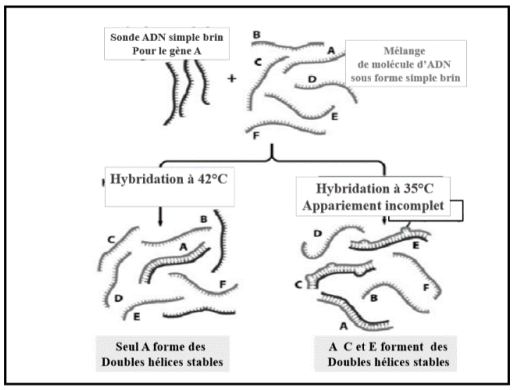
Comme toute autre réaction chimique, l'hybridation de l'ADN est influencée par certains paramètres comme la température, la durée d'hybridation, la concentration des réactifs, la concentration en sels du milieu réactionnel , la longueur des fragments, la nature des bases [11], etc…. . Nous avons étudié l'effet de certains de ces paramètres sur le SNR.

II.5.1 Effet de la température

Il faut tout d'abord déterminer la température optimale d'hybridation des sondes: en effet, une température trop élevée empêchera l'hybridation, alors qu'une température trop basse entraînera des hybridations non spécifiques. La température optimale d'hybridation est appelée la Tm (melting temperature en anglais), elle dépend de l'échantillon. C'est aussi la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme monobrin et l'autre est sous forme double brin [12]. Le passage d'une forme à l'autre est très rapide. En théorie cette température est déterminée par la relation Tm(°C) = 2*(A+T) + 4*(C+G) pour une séquence de longueur inférieure 20 paires de bases. En pratique la méthode la plus simple consiste à mesurer l'absorbance de l'échantillon à 260 nm (aussi appelée Densité Optique, ou DO) en fonction de la température. En effet, l'ADN simple brin absorbe plus cette longueur d'onde que



Fusion d'une molécule d'ADN double brin



l'ADN double brin.

II.5.1.1 Expérience

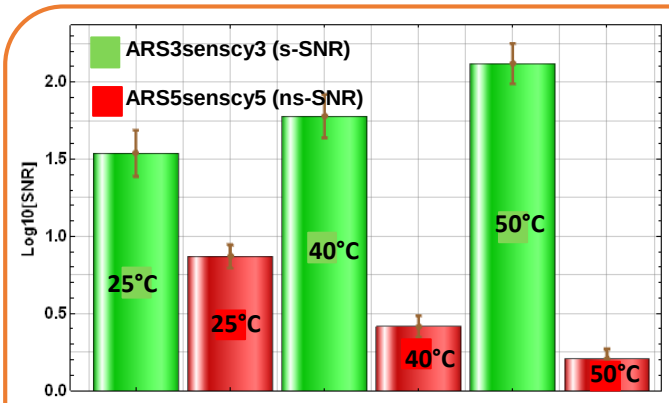
Nous avons réalisé des expériences d'hybridation à différentes températures en microdépôt avec les sondes ARS3 et ARS5 (10µM). L'hybridation est faite avec 50 nM de ARS3sensCy3 complémentaires pendant 30 minutes. Le signal vert est donc l'intensité spécifique (s-SNR) et l'intensité non spécifique

Figure 10 ***Mesure de la densité optique en fonction de la température d'un échantillon à 260 nm. b) Représentation schématique de la réaction d'hybridation à différentes températures. A 42°C on a une formation des doubles hélices stables alors qu'à 35°C, on a des appariements non spécifiques*** *[133].*

c'est-à-dire la réaction entre ARS3sensCy3 et ARS5 (ns-SNR). Les valeurs représentées sont obtenues sur 18 zones de la lame et chaque zone contient 10 spots ce qui équivaut à 180 spots.

II.5.1.2 Observation

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 11. On constate que l'intensité spécifique augmente avec la température alors que l'intensité non spécifique décroit.



	s-SNR	ns-SNR
25°C	34.5	7.4
40°C	60	2.6
50°C	131.7	1.6

Figure 11 ***Evolution du SNR spécifique et non spécifique en fonction de la température. En vert, le signal spécifique et en rouge le signal non spécifique à des températures de 25°C, 40°C et 50°C. A gauche, les valeurs réelles des signaux. Nous avons utilisé la représentation Log pour sortir toutes les sensibilités.***

II.5.1.3 Conclusion

L'augmentation de la température dans les conditions physiologiques rend la réaction d'hybridation plus spécifique. On voit que le s-SNR augmente avec la température alors le ns-SNR décroit au même moment. Pour la même durée, la réaction d'hybridation est beaucoup plus rapide quand on élève la température du milieu réactionnel. L'élévation de la température augmente alors la mobilité des cibles en solution.

II.5.2 Effet de la concentration en sels

Un brin d'ADN peut être décrit physiquement comme un fil uniformément chargé dû à la charge négative que porte les groupements phosphates le long de la chaine. Le rapprochement de deux brins d'ADN est souvent impossible en solution dû à l'effet de répulsion électrostatique. Des cations monovalents comme Na^+ et K^+ interagissent avec l'ADN au niveau de ces groupements phosphates pour

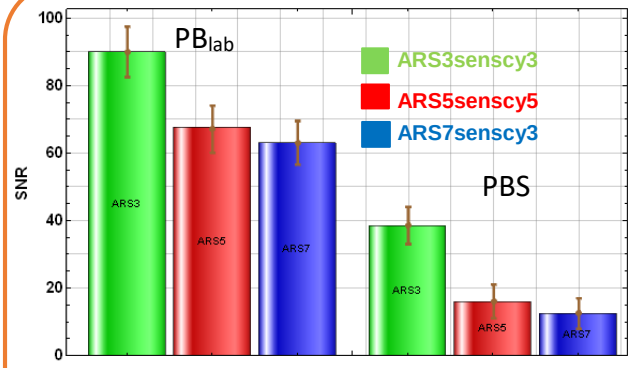
baisser la répulsion électrostatique entre les deux brins, et donc favoriser l'hybridation. Nous avons réalisé des expériences pour étudier l'effet de la concentration de ces cations sur le SNR.

II.5.2.1 Expérience

Habituellement nous réalisons l'hybridation dans un tampon physiologique commercial PBS (Phosphate Buffer Saline) de composition selon (II.4.1). La concentration en cations de ce tampon est estimé à $[K^+]+[Na^+]$ = 161.5mM. Nous avons préparé un autre tampon « home made » dont la recette est la suivante. PB_{Lab}: 94mL K_2HPO_4(1M) + 6mL KH_2PO_4(1M)+ 900mL H_2O. Ce dernier tampon ne contient que des cations K^+ dont la concentration est de 194mM. Nous avons réalisé des réactions d'hybridation dans ces deux types de tampon les autres conditions expérimentales restant inchangées.

II.5.2.2 Observation

Les résultats sont représentés sur la Figure 12. On remarque que la force ionique du tampon a un réel effet sur l'hybridation. Les SNRs spécifiques sont plus élevés dans le tampon PB_{Lab} « home made » où la concentration en cations monovalents est plus élevé que le PBS commercial.



PB_{Lab}	90	67.6	63
PBS	38.5	16	12.4

Figure 12. Effet de la teneur en cations monovalents K^+ et Na^+. Le SNR est plus prononcé avec le tampon PB_{Lab} où la concentration en sels est plus élevée que dans le PBS commercial où on une concentration beaucoup plus faible.

II.5.2.3 Conclusion

Les cations monovalents K^+ et Na^+ ont un effet remarquable sur la réaction de l'hybridation des oligonucléotides. Ils réduisent la répulsion électrostatique entre les brins complémentaires et favorisent ainsi l'hybridation. Le SNR est très élevé dans le tampon PB_{Lab} ne contenant que des cations K^+. La concentration des cations K^+ dans le tampon PB_{Lab} est 1.2 fois plus élevée que la concentration des cations K^+ et Na^+ réunis dans le tampon PBS, mais les SNRs sont 4 fois plus élevés dans le tampon PB_{Lab}. Ceci laisse croire que les cations K^+ contribuent plus à la réduction de la répulsion électrostatique entre les brins d'oligonucléotides que les cations Na^+. Des expériences dans lesquelles les deux types d'ions sont en même proportion peuvent apporter des conclusions plus pertinentes.

II.5.3 Durée d'hybridation

La vitesse à laquelle les cibles complémentaires s'hybrident aux sondes pour former un ADN double brin dépend de la concentration initiale (C_0) de l'échantillon d'ADN. S'il y a une forte concentration en

séquences d'ADN complémentaires, le temps nécessaire pour qu'une molécule d'ADN simple brin rencontre le brin complémentaire et former un duplex sera diminué [13]. La cinétique de réassociation peut être calculée en utilisant la concentration de départ (C_0) de la séquence spécifique d'ADN en moles par litre et le temps de réaction (t) en secondes. La valeur C_0t est généralement appelée la valeur du C0t (mol.$L^{-1}s^{-1}$) dépend aussi de la température et de la concentration en cations monovalents [14].

II.5.3.1 Expérience

Nous avons effectué des expériences pour étudier l'effet du temps d'hybridation sur le SNR. On utilise les sondes ARS3 et ARS5 à 10 µM en microdépôts sur trois lames prétraitées avec la poly-L-lysine. Les lames sont séchées pendant 45 minutes en boîte humide et à l'air comprimé. Les blocages chimique et physique (30 min chacun) sont suivis de rinçages à l'eau DI. Les lames sont incubées pendant 15 min, 30 min et 60 min respectivement dans un tampon PBS contenant ARS3sensCy3 (50nM), les cibles complémentaires de ARS3 à température ambiante (25°C). Les sondes ARS5 sont utilisées comme contrôle. Après rinçage pour retirer les cibles non ou faiblement hybridées, les lames sont scannées. Les résultats sont consignés sur la Figure 13.

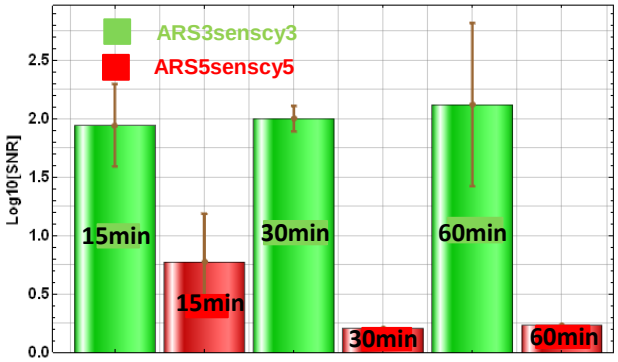


Figure 13. Effet de la durée de l'hybridation sur le SNR pour 15 min, 30 min et 60 min. Nous avons représenté les SNRs en log pour ressortir toutes les sensibilités.

II.5.3.2 Observations expérimentales

Les SNRs spécifiques augmentent avec la durée d'hybridation et les SNRs non-spécifiques diminuent au même moment. Le signal non spécifique est plus important pour une durée d'hybridation de 15 minutes et reste de même ordre de grandeur à 30 et 60 minutes.

II.5.3.3 Conclusion

Le temps d'hybridation est un paramètre important à prendre en compte lors de la détection. Pour un temps trop faible (15 minutes), l'hybridation non spécifique prédomine et que la majorité des cibles n'ont pas encore retrouvé leurs complémentaires. Par contre pour une durée d'hybridation suffisante, la totalité des cibles sont hybridées et les duplex formés sont stables. Nous avons, à la lumière de cette expérience fixé la durée d'hybridation à 30 minutes pour les oligonucléotides.

II.6 Hybridation en compétition

L'idée dans cette expérience est de fixer plusieurs types de sondes sur la lame et les hybrider avec leurs cibles complémentaires simultanément dans les mêmes conditions de température et de concentration c'est-à-dire le tampon d'hybridation est un mélange équimolaire des cibles.

II.6.1 Expérience

- Microdépôt des sondes ARS3, ARS5 et ARS7 de concentration 10µM.

- Séchage 45 minutes en boîte humide
- Blocage chimique et physique 30 minutes chacun et rinçage à l'eau DI
- Hybridation : ARS3sensCy3 + ARS5sensCy5 dans le tampon PBS de concentration 10nM de chaque cible pendant 30 minutes à 50°C et rinçage à l'eau DI

II.6.2 Observations

Après révélation de la lame, sur 9 zones de la lame (chaque zone comporte 10 spots de chaque sonde), nous avons calculé le SNR de chaque zone et la moyenne est renseignée dans le tableau ci-dessous.

	Excitation (λ=635nm)	Excitation (λ=532nm)
ARS3	5.7 ± 7.4	21.6 ± 8.5
ARS5	50.3 ± 11.35	1.8 ± 0.5
ARS7	5.0 ± 1.9	3.9 ± 2.4

Le SNR spécifique de ARS5sensCy5 (50.3 ± 11.35) est plus prononcé que celui de ARS3sensCy3 (21.6 ± 8.5). Cela est dû en partie au bruit de fond marqué que produisent souvent les fluorophores Cy3 ce qui réduit le SNR. L'hybridation non spécifique entre ARS3 et ARS5sensCy5 (5.7 ± 7.4) est très élevée par rapport à celle de ARS5 et ARS3sensCy3 (1.8 ± 0.5). Cette grandeur reste dans la même ordre de grandeur entre ARS7 et les deux cibles non complémentaires (5 ± 1.9 et 3.9 ± 2.4).

II.6.3 Conclusion

Cette expérience met en lumière l'hybridation non spécifique entre les sondes et les cibles non complémentaires et les phénomènes d'adsorption non spécifique des cibles. Pour s'en affranchir il faut non seulement un contrôle de la température lors de la réaction d'hybridation mais aussi bien faire les étapes de rinçage pour élimer les cibles non ou faiblement hybridées.

II.7 Hybridation des produits THRCA

Les produits THRCA (Tagged Hyperbranched Rolling Circle Amplification) sont des molécules complexes constituées d'une partie simple brin dont la séquence peut être celle de ARS3 ou ARS5 et une partie double brin dont la séquence est périodique (Voir VI.14). Les produits sont synthétisés par Ismail Cissé avec la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction). L'hybridation de ces produits est beaucoup plus compliquée (dû à leur grande taille) que celle des oligonucléotides. Nous avons étudié certains paramètres (Température et durée de blocage chimique et d'hybridation) qui nous ont permis de trouver des conditions optimales d'hybridation de ces produits.

II.7.1 Expérience

- Microdépôt des sondes ARS3, ARS5 et ARS7 de concentration 10µM.
- Séchage 45 minutes en boîte humide.
- Blocage chimique 3 heures et physique 30 minutes et rinçage à l'eau DI.
- Hybridation : (THRCA-Cy3, 1XPBS) dont la partie simple brin est complémentaire de ARS3.

II.7.2 Observations

Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous.

THRCA	ars3			ars5			ars7		
Durée(min)	60	30	15	60	30	15	60	30	15
40°C	29.1±8.9	15.2±6.7	10.3±2.7	1.2±0.1	4±1.7	1.9±0.4	0.8±0.1	1.4±0.3	1±0.3
50°C	56.2±7.9	33.5±10.7	17.7±3.2	0.9±0.3	1.3±0.3	1.4±0.8	0.8±0.3	1.1±0.3	1±0.2

Le signal non spécifique est très faible dans l'ensemble sauf le cas de ARS5 lors de l'hybridation à 30 minutes (4±1.7) mais cette valeur est celle que nous avons retrouvée avec les oligonucléotides précédemment (5.0 ± 1.9 et 3.9 ± 2.4). Le signal spécifique augmente avec la durée d'hybridation et avec la température.

II.7.3 Conclusion

Les produits THRCA étant des molécules de grande taille, elles ont plus de sites de fixation et donc se combinent plus facilement à la PLL résiduelle (dû à l'attraction électrostatique) et ont une mobilité réduite. Si cette dernière n'est pas suffisamment neutralisée les cibles non hybridées peuvent s'y fixer et donner une intensité de bruit de fond très prononcée; ce qui réduit considérablement le rapport signal sur bruit. Un temps de blocage chimique de trois heures nous a permis de trouver les résultats ci-dessus. Un blocage plus court que cette durée donne un bruit de fond élevé et réduit le SNR. L'augmentation de la température permet une bonne mobilité des molécules.

II.8 Conclusion du chapitre

Nous avons utilisé la détection par fluorescence pour déterminer certaines conditions et optimiser le rendement de la réaction d'hybridation. La technique est pratique en terme de commodité, de coût et de temps de travail. Ces conditions seront appliquées aux puces dont la fabrication fera l'objet du chapitre suivant.

III Chapitre 3 : Le graphène

Ce chapitre est consacré à l'étude bibliographique du graphène. Dans un premier temps nous passerons en revue l'élément carbone et ses différentes formes allotropiques (Voir **Figure 14**). Dans un second temps, nous nous pencherons sur le graphène: sa structure cristallographique, ses propriétés physiques, mécaniques et électroniques et les différentes méthodes de fabrication.

III.1 L'élément carbone

Le carbone est un élément chimique de numéro atomique Z=6. C'est l'élément de base de toutes les formes de vie que nous connaissons, car les atomes de carbone créent facilement des liens entre eux et d'autres éléments comme l'oxygène, l'hydrogène et l'azote. Toutes les molécules d'une cellule sont faites essentiellement de ces quatre éléments, mais le carbone est toujours la « colonne vertébrale » des grandes molécules (glucides, lipides et protéines, les acides nucléiques).

Le carbone possède plusieurs formes allotropiques, c'est-à-dire que les atomes de carbone sont placés différemment les uns par rapport aux autres dans le solide. Il existe huit formes allotropiques du carbone aujourd'hui. Les deux formes naturelles sont le graphite et le diamant. Parmi les formes synthétiques, on peut citer les nanotubes de carbone qui représentent, par leur résistance électrique très faible, un grand espoir pour les scientifiques. On peut citer aussi le fullerène, assemblage de 60 atomes de carbone ayant la forme d'un ballon de football et le graphène, réseau hexagonal plan d'atomes de carbone.

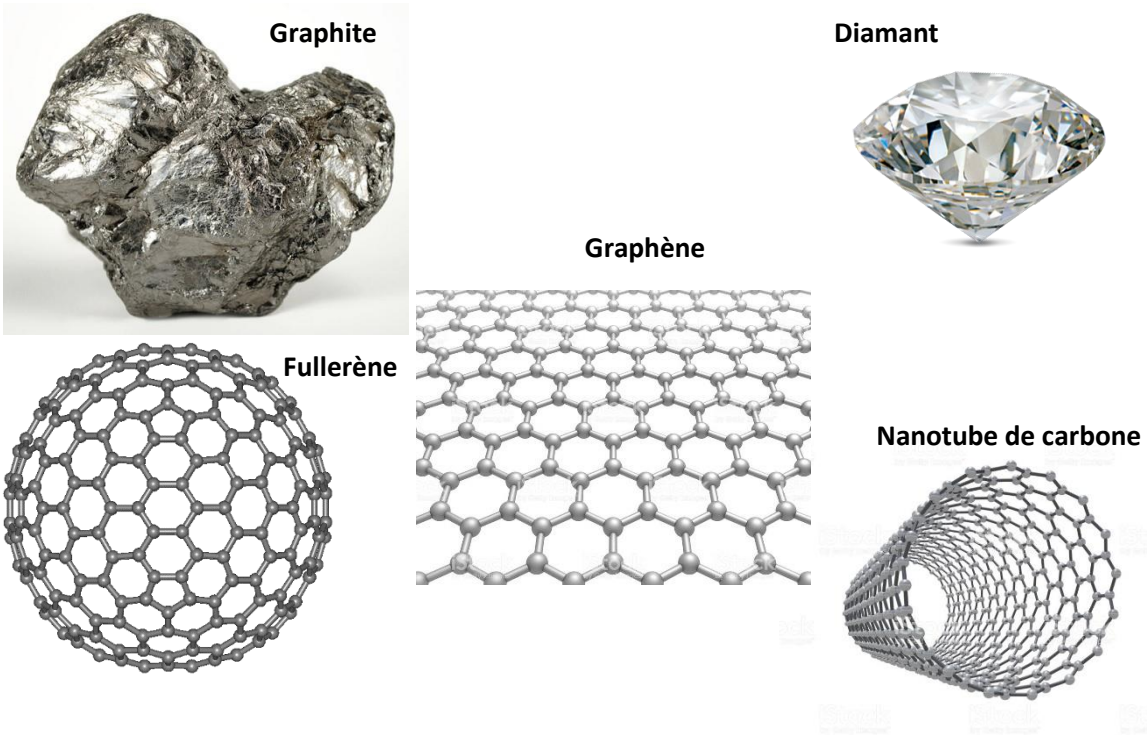


Figure 14. Différentes formes allotropiques du carbone

III.2 Le graphène

Le graphène est un matériau bidimensionnel de carbone, où les atomes sont positionnés suivant un ordre régulier de structure hexagonale, similaire à celle d'un nid d'abeilles. C'est la plus mince membrane obtenue à ce jour : son épaisseur est inférieure au nanomètre (Diamètre de l'atome de carbone), les échantillons obtenus faisant quelques micromètres (millièmes de millimètre) de largeur ou de longueur. Le graphène s'apparente au graphite et non au diamant, l'autre forme cristalline du carbone utilisée en bijouterie (où les atomes de carbone forment un réseau tétraédrique). Le graphite est un cristal de carbone qu'on trouve à l'état naturel et qui a une structure en couches: c'est une superposition de feuilles de graphène faiblement liées les unes aux autres.

Il est commode de classer les cristaux de carbone en fonction de leur dimensionnalité, c'est-à-dire du nombre de dimensions d'espace dans lesquelles le cristal s'étend. Le graphite, sorte de millefeuille de graphène, est un représentant tridimensionnel (3D); c'est aussi le plus anciennement connu.

Dans les années 1980, les Américains Robert Curl et Richard Smalley, et leur collègue anglais Harry Kroto ont découvert les fullerènes, des molécules géantes de carbone. Parmi eux, le footballène ou C60 dont la forme et la structure rappellent un ballon de football est sans doute le plus célèbre. Comme les fullerènes ne s'étendent dans aucune direction, le ballon est de rayon microscopique, on leur attribue une dimensionnalité nulle (0D).

En 1991, le physicien japonais Sumio Iijima a découvert les nanotubes de carbone, que l'on peut voir comme des tubes de graphène enroulé. Étant longs et très fins et s'étendent sur une seule dimension, on les caractérise par (1D). Le graphène s'étendant dans le plan avec une épaisseur négligeable a une dimension 2D.

III.2.1 Structures

III.2.1.1 Structure cristallographique

Le graphène est un cristal plan de carbone avec une structure en nid d'abeille, c'est-à-dire faite de cellules hexagonales. On distingue dans la **Figure 15**a une périodicité dans la structure cristallographique du graphène en considérant une maille élémentaire constituée de deux atomes de carbone voisins A(●) et B(●). Deux vecteurs $\vec{a}_1$ et $\vec{a}_2$ définissent chacune des mailles :

$$\vec{a}_1 = \frac{a}{2}(3,\sqrt{3}), \quad \vec{a}_2 = \frac{a}{2}(3,-\sqrt{3})$$

avec a = 1.42A° la distance entre deux atomes de carbone voisins. On peut extraire les vecteurs du réseau réciproque de ces vecteurs élémentaires.

$$\vec{b}_1 = \frac{2\pi}{3a}(1,\sqrt{3}), \ \vec{b}_2 = \frac{2\pi}{3a}(1,-\sqrt{3})$$

A partir de la maille élémentaire du réseau réciproque, on obtient la zone de Brillouin

(**Figure 15**b). Dans l'espace réciproque, les points K et K' sont appelés points de Dirac.

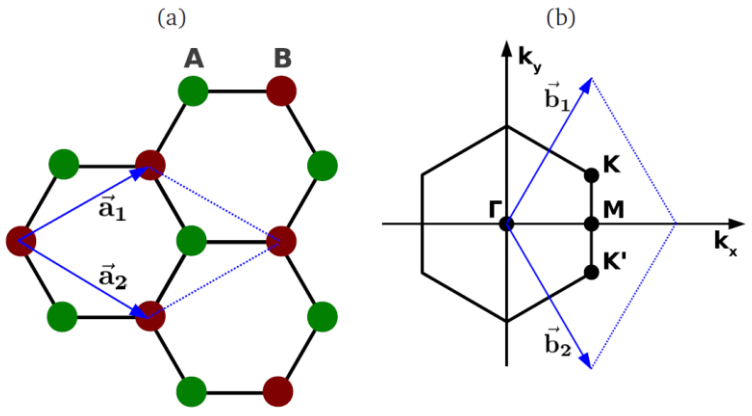


Figure 15. Représentation de la structure du graphène en nid d'abeille. (a) l'espace réel et (b) l'espace réciproque. Les vecteurs de base sont représentés dans chaque espace ($\vec{a}_i$, $\vec{b}_i$). Image extrait de [16]

III.2.1.2 Structure atomique

La configuration électronique du carbone est donnée par $1s^2 2s^2 2p^2$. Il comporte donc 6 électrons dont deux de l'orbitale 1s les plus proches du noyau sont liés et ne participent pas aux réactions chimiques. Les 4 autres électrons de la couche de valence lui permettent d'établir de liaisons covalentes de types σ et π. Pour le graphène, un atome de carbone est lié à ces trois voisins par des liaisons σ issues du recouvrement des orbitales sp^2 formées par hybridation de l'orbitale atomique 2s et des deux orbitales 2p comprises dans le plan du graphène. En plus de ces liaisons, il reste à chaque atome un électron dans l'orbitale p_z, perpendiculaire au plan du graphène. Ces électrons π, très mobiles, confèrent au graphène la plus grande partie de ses propriétés de transport.

III.2.1.3 Structure de la bande d' énergie

Le calcul de l'Hamiltonien, dans le modèle des liaisons fortes [15], donne la formule suivante pour l'énergie des électrons [16]:

$$E_{\pm} = \pm t\sqrt{3 + f(k)} - t' f(k)$$

Avec
$$f(k) = 2\cos(\sqrt{3}k_y a) + 4\cos(\frac{\sqrt{3}}{2}k_y a)\cos(\frac{3}{2}k_x a)$$

t : l'énergie de saut vers un site de plus proche voisin (d'un site A vers un site B ou inversement)

t' : l'énergie de saut vers un site de second plus proche voisin (d'un site A vers un autre site A ou d'un site B vers un autre site B)

a : distance entre deux atomes de carbone

$\vec{k}(k_x, k_y, k_z)$: le vecteur d'onde

La structure de bande d'énergie du graphène est présentée sur la Figure 16. Aux points K et K', les bandes de valence et de conduction sont tangentes (gap nul), ce qui confère au graphène sa nature semi-métallique.

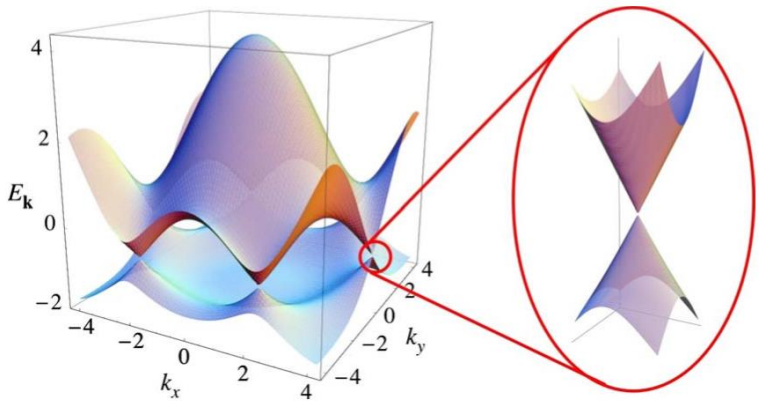


Figure 16 Structure de bande du graphène. Image extrait de [15]

Le développement de l'expression précédente autour des points K et K' donne une expression de l'énergie linéaire avec le module du vecteur d'onde

$$E_{\pm}(\vec{k}) = \hbar v_F \left|\vec{k}\right|, \quad \hbar v_F = \frac{3}{2} ta \text{ avec } v_F \text{ la vitesse de Fermi.}$$

Dans cette structure de bande en cône que l'on trouve autour des points K et K', le comportement des électrons est décrit par l'équation de Dirac. C'est pourquoi K et K' sont appelés points de Dirac.

III.2.2 Transport électronique dans le graphène

Le transport dans la feuille de graphène est assuré par des porteurs de charge se comportant [17] comme des particules sans masse se déplaçant dans un espace 2D à la vitesse v_F égale à $1/300$ de celle de la lumière. Grâce à sa structure de bande unique, le graphène présente des propriétés de transport extraordinaires et notamment des propriétés d'effet de champ ambipolaire et de fortes valeurs de mobilité de porteurs comparé aux autres semi-conducteurs classiques. La Figure 17 montre la comparaison des propriétés électroniques du graphène avec les matériaux classiques.

	Si	Ge	GaAS	4H-SiC	GaN	AlGaN/GaN 2DEG	Graphene
Energy band gap (eV) @ 300 K	1.1	0.67	1.43	3.3	3.4	3.4	~0
Electron effective mass (m^*/m_e)	1.08	0.55	0.067	0.3	0.19	0.19	~0
Electron mobility ($cm^2 V^{-1} s^{-1}$) @300 K	1,350	3,900	4,600	800	1,300	1,500–2,000	2×10^5
Saturated electron drift velocity v_s (10^7 cm s^{-1})	1	0.6	2	2	3	3	>5
Carrier concentration (cm^{-3})	10^{15}	10^{15}	10^{15}	10^{15}	10^{15}	10^{19}–10^{20}	10^{19}–10^{20}

Figure 17 Comparaison des propriétés électroniques du graphène avec d'autres matériaux classiques : Gap, masse effective de l'électron, mobilité, vitesse de saturation et concentration des porteurs. Source [21]

On distingue deux régimes de transport dans le graphène :

- Le transport balistique : Lorsque le libre parcours moyen des électron l est supérieur à la longueur du canal L. ($l \geq L$)
- Le transport diffusif : Lorsque $l \leq L$, les collisions élastiques et inélastiques gênent le parcours des électrons. Dans ces conditions le parcours est décrit par la formule de Drude-Boltzmann [18]

Le graphène réel contient des défauts [19] et des impuretés [20], interagit avec le substrat et est affecté par l'interaction des porteurs avec les phonons du substrat. Ce type de perturbations altèrent les propriétés du graphène en introduisant des inhomogénéités dans la densité de porteurs et en limitant le libre parcours moyen des électrons [21]. Il existe plusieurs types de mécanismes de diffusion dont :

- La diffusion à courte portée : dû aux défaut et aux adsorbats.
- La diffusion à grande portée : dû aux charges piégées à l'interface du graphène et le substrat ou sur le graphène.
- La diffusion par interaction avec les phonons du substrat: C'est un phénomène quasi-élastique qui limite la mobilité des porteurs.

Pour minimiser l'effet de la diffusion, plusieurs techniques ont été élaborées comme l'utilisation d'un autre type de substrat comme le BN ou carrément la suppression du substrat en fabriquant des dispositifs avec le graphène suspendu [22].

L'avantage du BN est qu'il présente une surface lisse, quasiment dépourvue de charges piégées et une structure proche de celle du graphène.

III.2.2.1 L'effet de champ

L'un des avantages du graphène est la possibilité de moduler la densité des électrons et des trous par application d'un champ extérieur. Il est alors possible de moduler le niveau de Fermi du graphène dans la structure de bande d'énergie.

L'effet de champ est schématisé sur la **Figure 18**. L'application d'une tension de grille négative entraine un courant porté par les trous et l'application d'une tension de grille positive entraine un courant porté par les électrons.

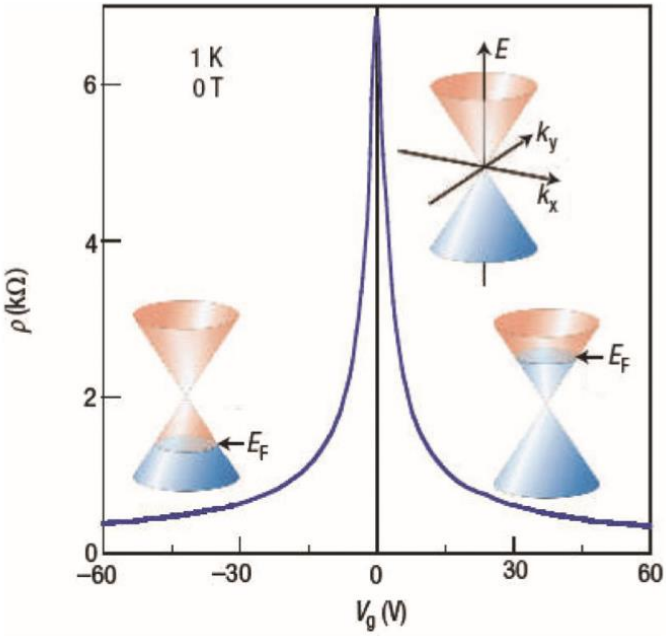


Figure 18. Effet de champ dans le graphene. Dépendance du niveau de Fermi en fonction de la tension de grille. Source [134]

III.2.2.2 La mobilité du graphène

Si le graphène fait autant parler de lui par ses propriétés électroniques exceptionnelles, c'est aussi dû à la grande mobilité de ses porteurs de charges. La plus grande valeur rapportée dans la littérature est de 200.000 $cm^2/V.s$ [23]. Le tableau suivant présente la mobilité du graphène obtenu par différentes techniques.

Substrat	Type de croissance	μ(10^3 $cm^2/V.s$)	Référence
SiO_2/Si	Exfoliation	10 - 15	[24]
BN	Exfoliation	25 - 140	[22]
Suspendu	Exfoliation	120 - 200	[23]
SiC	Sublimation du SiC	1 - 5	[25]
SiO_2/Si	Ni-CVD	2 - 5	[26]
SiO_2/Si	Cu-CVD	1 - 16	[27]

III.2.3 Autres propriétés du graphène

Outre les propriétés électroniques, le graphène possède aussi d'autres propriétés uniques et surtout mécaniques puisque c'est un matériau à la fois très fin et flexible mais également très résistant. De plus le graphène est fortement transparent car il n'absorbe que 2.3% de la lumière visible. C'est aussi un bon conducteur thermique. Des valeurs de 5000W/m.K ont été rapportées à température ambiante [28].

Le tableau ci-dessous résume ces propriétés et d'autres du graphène.

Propriété	Valeur	Source
Mécanique	Module de Young : 0.5 TPa	[29]
Thermique	Conductivité thermique : 50 W /cm.K	[28]
Optique	Transparence : 97.7% (visible et IR)	[30]

III.3 Technique de fabrication du graphène

Il existe plusieurs méthodes de fabrication du graphène de nos jours. Chacune a ses avantages et ses inconvénients. Nous allons essayer de décrire quelques-unes d'entre elles.

III.3.1 L'exfoliation mécanique

Lorsqu'on écrit avec un crayon sur un papier, on y dépose du graphite. Ceci est possible parce que les feuilles de graphène qui composent un cristal de graphite sont faiblement liées les unes aux autres. C'est aussi le principe de la technique mise au point par Geim et Novoselov en 2004, appelée exfoliation, paradoxalement d'une grande simplicité. Un ruban de scotch est utilisé pour arracher des feuilles de graphène d'un cristal de graphite très pur et obtenir ainsi un cristal très fin. L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à obtenir sur le scotch un empilement contenant au plus quelques feuilles de graphène. Celles-ci sont alors déposées, sur un substrat (SiO_2). La plupart des morceaux de graphite transférés sur le substrat sont des multicouches de graphène (**Figure 19**). Cependant, certains morceaux, dont la surface peut atteindre quelques μm^2, sont des monofeuillets. Ils peuvent être repérés au microscope optique car, quand l'épaisseur d'oxyde est bien choisie (285 nm), différentes nuances de couleur sont associées aux différentes épaisseurs de graphène. La microscopie à force atomique ou la spectroscopie Raman permettent ensuite à coup sûr de distinguer les monofeuillets des multifeuillets. Bien que la technique ne nécessite pas un équipement trop lourd pour être réalisée et fournit un graphène de bonne qualité, elle n'est pas industrialisable car limitée par la taille des feuilles du graphène obtenues.

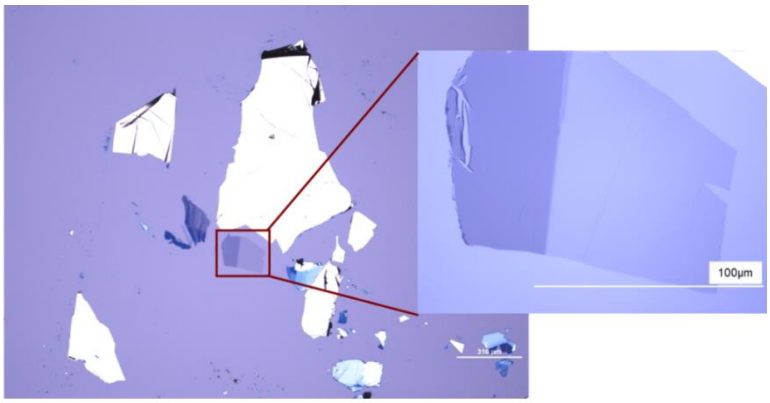


Figure 19. Exfoliation mécanique du graphène à l'aide d'un ruban adhésif d'un cristal de graphite

III.3.2 L'exfoliation chimique

Cette méthode est basée sur la production de graphène oxydé également appelée la procédure Hummers [31]. Le principe consiste à oxyder du graphite en milieu acide (acide sulfurique par exemple) puis utiliser un solvant réducteur pour purifier le graphène. On peut ainsi produire de grandes quantités de graphène, mais de qualité médiocre.

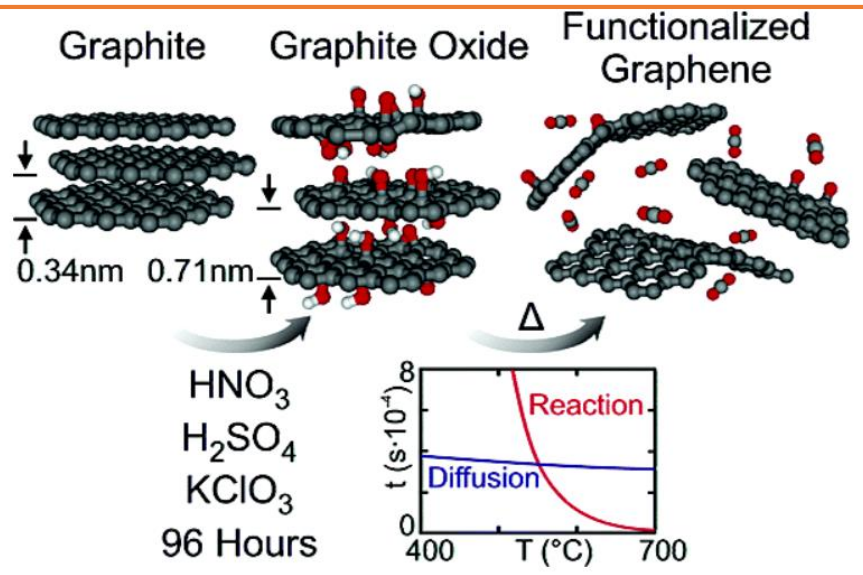


Figure 20. Synthèse chimique du graphène combinée à une réduction thermique. Source [138]

III.3.3 La sublimation du SiC

Le carbure de silicium peut être employé pour synthétiser des couches de graphene [32]. Quand le carbure de silicium est chauffé jusqu'à 1300-1400°C, les atomes de silicium s'évaporent, la face restante du carbure de silicium devient une surface mince de graphite constituée de feuilles de graphène. [33]. La méthode présente l'avantage d'une production à grande échelle. De plus la croissance se fait directement sur un substrat isolant (SiC) et donc plus besoin de le transférer sur un autre substrat. Toutefois cet avantage peut être aussi considéré comme un inconvénient puisqu'on est limité à utiliser que ce substrat. Plus encore la croissance se fait à très haute température ce qui rend difficile le contrôle des autres paramètres et le prix du substrat reste élevé.

III.3.4 Le dépôt chimique en phase vapeur CVD

Le dépôt chimique en phase vapeur, également appelé CVD (Chemical Vapor Deposition) repose sur un mécanisme de décomposition catalytique à haute température d'un gaz carboné (souvent du méthane) sur un métal qui servira de précurseur de nucléation. Cette technique a été développée progressivement avec plusieurs métaux dont : le platine (Pt) [34], le ruthénium (Ru) [35], l'iridium (Ir) [36], le nickel (Ni) [37], le cobalt (Co) et le cuivre (Cu) [38].

Pour utiliser ce type de graphène, il est obligatoire de le transférer sur un substrat adéquat en le protégeant avec une résine PMMA (poly(methyl methacrylate)) et retirer le support métallique.

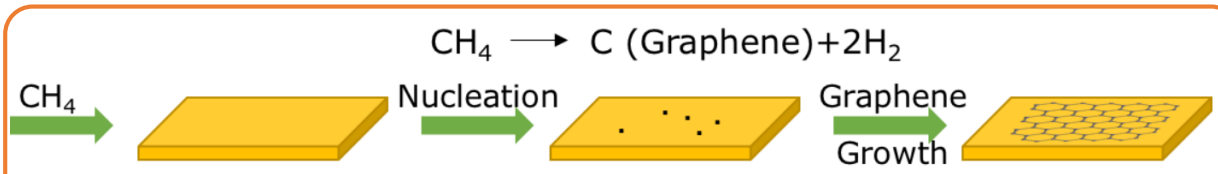


Figure 21. Illustration de la croissance du graphène par dépôt chimique en phase vapeur

La **Figure 22** montre le rapport qualité-prix des différentes techniques de croissance de graphène

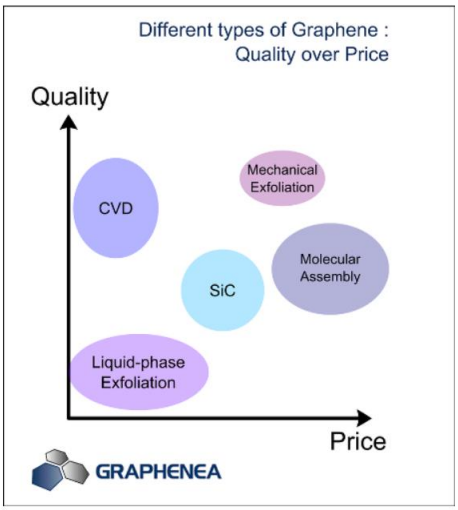


Figure 22. Rapport qualité-prix des différentes techniques de croissance du graphène

Le tableau ci-dessous résume les différentes méthodes de fabrication de graphène qu'on vient de décrire, les avantages et les inconvénients.

Méthode	Procédé	Avantage	Inconvénient
Clivage microméca-nique	Le clivage successif du graphite pyrolytique fortement orienté en utilisant une énergie mécanique	Cristal de bonne qua-lité En particulier pour les recherches sur les pro-priétés du graphène	Procédé laborieux Petites surfaces
Exfoliation	Séparation des plans de graphène par : -Ultra-sonification -Réduction de l'oxyde de graphite -Intercalation d'atomes	Bonne qualité du gra-phène	Petites surfaces
Epitaxie sur carbure de silicium (SiC)	A haute température et sous ultra-haut vide le SiC se décompose et l'évaporation des atomes de surface du silicium laisse place à une surface riche de carbone qui forment une couche de graphène	Graphène de bonne qualité	Surface du graphène dépend de la taille du wafer Contrôle du nombre de plans atomiques Transfert du graphène
Dépôt chimique en phase vapeur (CVD)	Un gaz carboné est in-troduit dans une en-ceinte à haute tempé-rature où il se décom-pose grâce à un catalyseur métallique	De grandes feuilles métalliques peuvent être utilisées pour per-mettre d'avoir de large surfaces Reproductibilité	Structure non uni-forme en limites des grains du métal poly-cristallin génèrent des défauts dans la struc-ture

III.4 Caractérisation Raman du graphène

Le repérage optique de quelques couches de graphène est possible lorsque le substrat est muni d'une couche mince d'oxyde (280nm de SiO_2 par exemple). Mais le contraste généré par les feuillets est trop faible pour être visible à l'aide d'un simple microscope optique à partir d'une certaine épaisseur de l'oxyde. Il est donc nécessaire de disposer d'une autre méthode de repérage. Il s'agit de la spectroscopie Raman.

III.4.1 La Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique de caractérisation non-destructive, ce qui constitue un avantage pour l'analyse d'un matériau comme le graphène. C'est une méthode assez rapide à utiliser et qui ne nécessite aucune préparation au préalable pour l'échantillon. Cette technique a été découverte en 1928 par Chandrasekhar Raman [39] . Le principe repose sur l'interaction rayonnement-matière ou plus précisément photon-phonon.

III.4.1.1 Principe

Si on éclaire une substance par une radiation monochromatique intense de fréquence ν_0 (provenant d'une source laser), les photons constituant cette radiation peuvent être transmis, absorbés ou diffusés dans toutes les directions de l'espace. L'analyse spectroscopique de la lumière diffusée montre que l'essentiel des photons réémis ont la même fréquence ν_0 que le rayonnement incident. Cette diffusion sans changement de fréquence est appelée diffusion Rayleigh (ou diffusion élastique). Pour moins d'un million de photons diffusés, un changement de fréquence est observé : cette diffusion inélastique de la lumière constitue l'effet Raman. Les fréquences des photons diffusés de façon inélastique valent $\nu_{RS} = \nu_0 - \nu_V$ et $\nu_{RAS} = \nu_0 + \nu_V$ (où ν_V représente la fréquence d'un mode de vibration de la molécule). On parlera ainsi de diffusion Raman Stokes et Raman anti-Stokes pour les fréquences respectives ν_{RS} et ν_{RAS}. On indique la position des raies Raman en nombre d'onde ($\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$) exprimé en cm^{-1}. Avec λ la longueur d'onde de la radiation exprimée en cm.

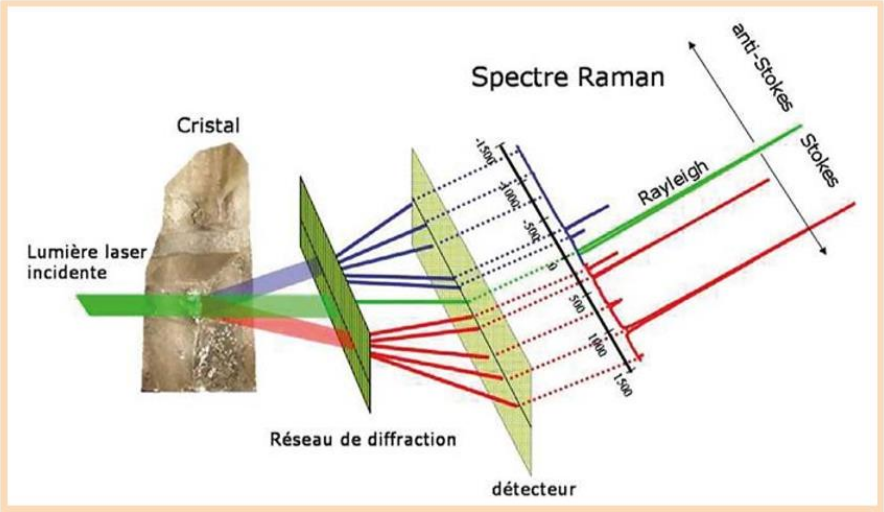


Figure 23. Principe de l'effet Raman

III.4.1.2 Spectre Raman du graphène

L'utilisation de la spectroscopie Raman pour caractériser les matériaux carbonés a été initié par Yan Wang et ses collaborateurs [40] et particulièrement le graphène récemment par Andrea C. Ferrari [41]. Le spectre Raman du graphène présente 3 pics importants que sont le pic G, le pic 2D et le pic D de défauts (voir **Figure 24**). Deux autres pics peuvent également être détectés lors des mesures : le pic D' et le pic D+G.

- Le pic G (1590 cm^{-1}) :il est caractéristique du signal du graphène et est associé à des vibrations planaires des atomes de carbone sp^2. Il correspond à un processus Raman du 1er ordre.

- Le pic 2D ou le pic G' (2700 cm^{-1}) : Il correspond à un processus Raman du 2nd ordre. Dans cette configuration, il en découle une diffusion de deux phonons : un premier suite à la diffusion d'un électron excité d'une bande proche du point K vers une bande proche du point K' et un second par le même processus mais dans le sens inverse. Il correspond à un mode de respiration de la maille.

- Le pic D (1350 cm^{-1}) : il est caractéristique des défauts ou désordres présents dans la couche de graphène et est associé à des vibrations hors plan. Il est dû à un processus Raman du 2nd ordre avec un phonon de symétrie E_{2G} et un défaut du système nécessaire pour l'activation du pic D [42]. D'une part, une diffusion élastique d'un électron excité se déroule d'une bande proche du point K vers une bande proche du point K' sur un défaut. D'autre part, une seconde diffusion engendre l'émission d'un photon. Ce mode est absent pour un graphène de haute qualité (graphène exfolié par exemple) [43].

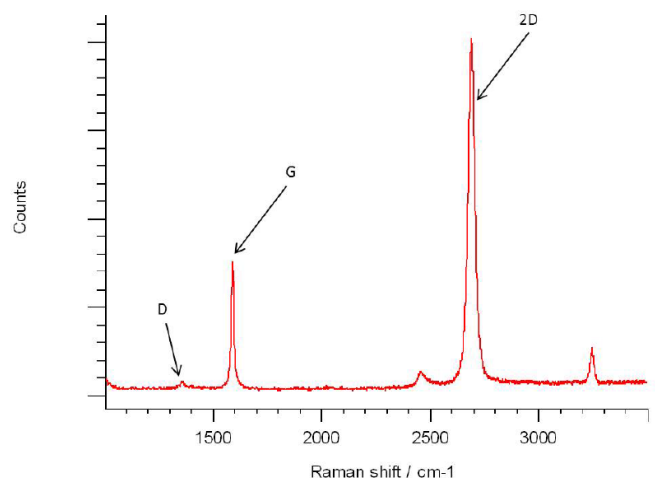


Figure 24. Spectre Raman typique du graphène. Source [90]

L'étude du spectre Raman du graphène peut nous renseigner sur sa qualité, le nombre de couches et son niveau de dopage. En effet le rapport des intensités de certains pics nous permet de déterminer à la fois le nombre de couches de graphène présentes sur l'échantillon mais également de quantifier les défauts du film.

III.4.1.3 Qualité du graphène

La qualité du graphène monocouche est appréciable grâce à l'estimation des défauts présents dans l'échantillon. La mesure de l'intensité du pic D synonyme de présence de défaut dans l'échantillon par rapport à l'intensité du pic G relatif au signal du graphène donne une idée du niveau de désordre dans l'échantillon. Un rapport I_D/I_G très faible signifie que le graphène est de très bonne qualité et vice-versa.

III.4.1.4 Nombre de couches

Pour un graphène monocouche, le pic 2D est très fin et plus intense que le pic G. Plus le nombre de couche augmente plus le pic 2D s'élargit et devient moins intense [44].

III.4.1.5 Niveau de dopage

Le spectre Raman est sensible au niveau de dopage de la couche de graphène. Cette corrélation peut donc être observée sur le spectre Raman du graphène dopé. L'effet d'un dopage par polarisation de la grille arrière sur le spectre Raman a déjà été démontré. On observe le décalage du pic G avec un dopage en trou ou en électron vers les nombres d'onde plus élevés [45]. Le pic 2D autre se décale positivement (respectivement négativement) avec un dopage en trous (respectivement en électrons) [46]

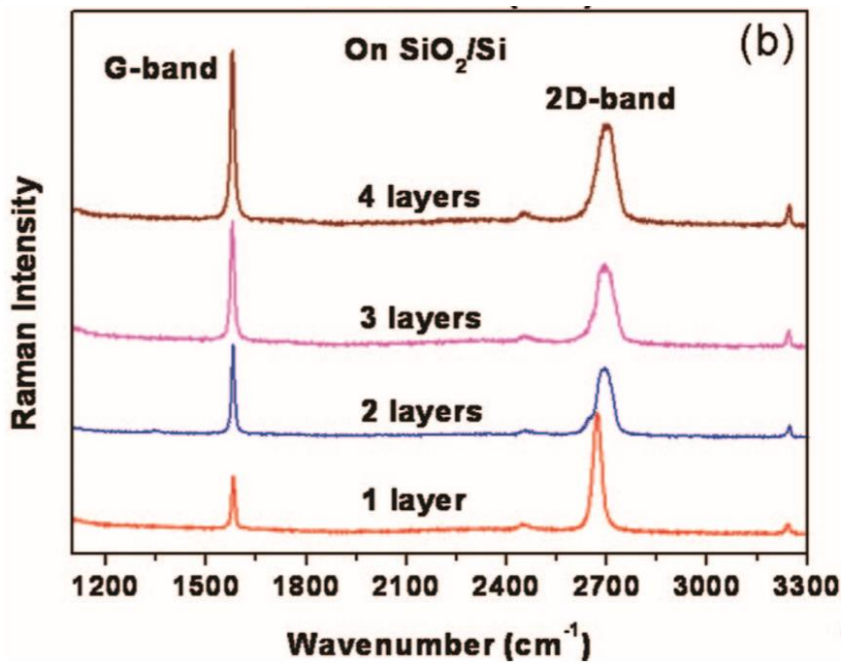


Figure 25. Spectre Raman du graphène de différentes épaisseurs sur 300nm de SiO_2. On voit l'évolution des pics G et 2D. Source [132]

III.5 Conclusion du chapitre

Dans cette partie, nous avons passé en revue l'élément carbone et ses différentes formes allotropiques et plus particulièrement le graphène. Nous avons décrit ses propriétés uniques, les diverses techniques de croissance et de caractérisation. La prochaine partie sera consacrée aux différentes applications du graphène en biodétection.

IV Chapitre 4 : Graphène et ses applications

Dans ce chapitre, nous verrons l'intérêt porté par l'industrie et la recherche fondamentale au graphène. Notre étude bibliographique portera beaucoup sur les différentes applications en biodétection utilisant des capteurs à base de graphène.

IV.1 Le graphène, matériau du futur

Le graphène est doté de propriétés extraordinaires qui font de lui un matériau unique en son genre. Il est plus dur que le diamant, 200 fois plus résistant que l'acier, plus fin, plus léger et plus conducteur que le cuivre. Ce qui fait sa particularité est qu'il possède à la fois les trois propriétés essentielles : La transparence, la conductivité et la flexibilité (voir III.2.3). L'ensemble de ces propriétés motive les grands groupes de recherche et de jeunes start-up à développer des méthodes de production fiables et moins couteuses et en faire des applications dans de nombreux domaines.

Les méthodes de fabrication sont à la fois mécaniques comme l'exfoliation qui consiste à détacher les feuillets de graphène à l'aide d'un ruban adhésif ou la méthode par épitaxie qui consiste à produire du graphène à partir du carbure du silicium. Certaines entreprises comme **Graphenano** [47], **Graphmatech** [48], **Graphene Frontiers** [49] ou **Graphenea** [50] produisent du graphène de haute qualité (pauvre en défaut) mais très cher car il nécessite des moyens de production très couteux en utilisant des méthodes CVD (Chemical Vapor Deposition). D'autres comme **Vorbeck** [51] en utilisant la méthode RGO (Reduced Graphene Oxide) obtiennent un graphène de qualité moindre mais beaucoup moins cher.

Si aujourd'hui une grande partie de la recherche fondamentale et appliquée est focalisée sur le gaphène et ses applications c'est que ses propriétés uniques offrent des perspectives commerciales très intéressantes. Les industries misent sur ce matériau très prometteur et les pouvoirs publics mettent la main à la poche pour soutenir la recherche. Les intérêts sont tels qu'en 2013, l'**Union Européenne** a retenu le graphène comme sujet d'un **FET Flagship** [52] doté d'un milliard d'euros ayant pour but d'accélérer la mise au point et la commercialisation des applications de ce matériau. De même, le National Graphene Institute a été lancé par l'Université de Manchester pour allier la recherche fondamentale, la recherche empirique et le transfert de technologies vers les entreprises nationales et internationales partenaires.

C'est dans le cadre du Graphene Flagship qu'une équipe de chercheurs de l'école polytechnique Chalmers en Suède a mis au point un photodétecteur à base de graphène capable de détecter les ondes de l'ordre du terahertz. Ce capteur pourrait permettre le développement de la technologie 5G, renforcer l'intelligence des voitures autonomes et aussi d'évaluer l'évolution des plaies à travers des bandages et pansements. Pour ce dernier aspect, une jeune Startup **Grapheal** [53] co-fondée par Vincent Bouchiat spécialisée dans le traitement des plaies chroniques (ulcères du pied diabétiques, ulcères de pression, etc.) a vu le jour tout récemment à Grenoble (France).

Le secteur qui attend le plus sa révolution à partir du graphène est l'électronique. En effet, ses propriétés de transparence, de conductivité et de flexibilité pourrait permettre de créer des écrans souples pour des smartphones et des tablettes. Samsung, LG et Nokia investissent énormément à la mise au point d'appareils à écrans flexibles. Le graphène pourrait aussi révolutionner la performance des batteries et à terme remplacer celles au lithium-ion [54]. Le lithium-ion enrobé dans des billes de graphène permettra des temps de recharge plus courts et un maintien de qualité dans le temps. Le graphène sera aussi utilisé sous forme d'aérogel permettant d'améliorer les supercondensateurs qui

remplaceront les batteries classiques pour certains usages spécifiques (conditions de stockage extrêmes, voitures électriques).

Sur le plan sanitaire, le graphène offre des perspectives prometteuses. Le graphène pourrait permettre de désaliniser l'eau pour la rendre utilisable en agriculture. Le projet **GraphAir** [55] concentre des efforts sur l'utilisation du graphène pour dépolluer l'eau pour la rendre propre à la consommation ou encore extraire le lithium dans l'eau de mer, métal alcalin utilisé dans le fonctionnement des voitures électriques.

Le secteur médical place un grand espoir dans l'utilisation du graphène pour lutter contre les cancers. Le graphène peut s'accumuler sur les tumeurs, il pourrait ainsi faciliter la détection des cancers. Dans les applications biomédicales, le graphène peut être utilisé pour administrer des médicaments ou des thérapies génétiques. Un exemple d'utilisation du graphène pour l'amélioration des biocapteurs est aussi intéressant. Sa forme bidimensionnelle le prédispose à une meilleure sensibilité à son environnement immédiat. Outre les secteurs de la biologie et de la chimie, l'utilisation de ces capteurs nouvelle génération pourrait se faire également dans le domaine industriel, la sécurité alimentaire ou encore l'environnement.

L'aéronautique et l'aérospatiale ne sont pas en reste. Le graphène est actuellement testé en conditions spatiales dans les caloducs satellitaires et des voiles se déplaçant dans l'espace grâce à des photons et autres particules solaires. Dans l'avenir, le graphène pourrait équiper les ailes des avions afin de les rendre plus résistants, plus légers et les protéger de la foudre.

IV.1.1 Biocompatibilité du graphène

D'autres domaines d'application du graphène est la détection chimique. Comme tous les éléments carbonés, le graphène est inerte et réagit peu avec les éléments chimiques. Les biocapteurs à base de nanotube de carbone ont été rapportés dans la littérature [56]. Mais ces capteurs offrent peu de surface active aux biomolécules. Le graphène a l'avantage de présenter une surface bidimensionnelle. Ainsi toute la surface est utilisée pour interagir avec les molécules et avoir un meilleur rendement. Le principe est simple; une substance chimique est adsorbée à la surface du graphène agit comme un donneur ou un récepteur d'électrons. Ceci change la concentration des porteurs dans le film et en mesurant la résistance de la feuille du graphène on peut remonter au nombre de molécules adsorbées. L'un des enjeux de ces capteurs est de détecter la plus faible quantité de substance, la molécule. Ceci est possible avec le graphène car il possède peu de défaut et a donc l'avantage d'avoir un bruit très faible. Avec un rapport signal sur bruit très élevé, on est capable de détecter des signaux d'intensité très faible.

IV.2 Les biocapteurs à base du graphène

IV.2.1 Introduction aux biocapteurs

Le premier biocapteur date du début des années 60. Ses inventeurs sont Clark et Lyon [57]. De nos jours, les biocapteurs prennent une part importante dans des domaines comme le médical et l'agro-alimentaire.

Un biocapteur est un dispositif pour la détection d'un analyte qui combine une composante biologique avec un composant détecteur physico-chimique. Etymologiquement un biocapteur est composé de deux parties:

La première partie est le bio-récepteur, c'est l'élément biologique. Le bio-récepteur sert à la reconnaissance moléculaire et il réagit de manière spécifique avec l'analyte.

La deuxième partie est le transducteur, on le définit comme un élément sensible, il traduit les réactions du corps d'épreuve (ici le bio-récepteur), dispositif convertissant une grandeur physique en une autre. Cette autre grandeur est plus facile à mesurer et à quantifier. Le transducteur agit en tant que détecteur.

Ces deux parties qui sont le transducteur et le bio-récepteur sont intégrées dans le même dispositif, c'est-à-dire que l'élément de reconnaissance cellulaire est immobilisé près de la surface du transducteur par physisorption, ou chimisorption ou bien par un piégeage dans une membrane inerte. Ainsi, on peut doser directement l'analyte d'intérêt sans l'ajout d'autre réactif.

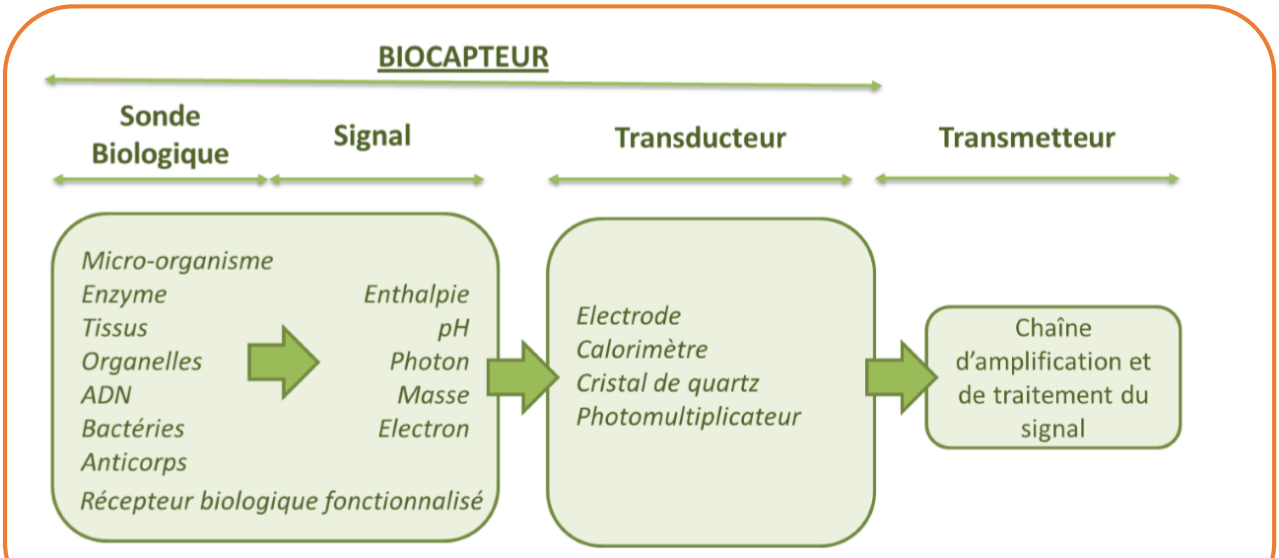


Figure 26. Représentation systémique d'un biocapteur. Image extrait de [58]

IV.2.1.1 Classification des biocapteurs

Il existe de nombreux types de récepteurs. La classification des biocapteurs est généralement effectuée selon la nature du transducteur utilisé. Un même transducteur peut toutefois être couplé à différents récepteurs, selon la molécule à détecter. Les possibilités de détection sont ainsi multiples, et en général, la spécificité du capteur est portée par le récepteur, et la sensibilité par le transducteur [58]. On peut citer par exemple les types de biocapteurs suivants :

- Les biocapteurs électrochimiques permettent de transformer le signal chimique en signal électrique, qui pourra être analysé par un dispositif électronique après amplification du signal.
- Les biocapteurs optiques sont divers et variés. La réaction entre la molécule à analyser et le récepteur va induire une modification des propriétés optiques (indice de réfraction, absorptivité molaire, rendement quantique d'émission de fluorescence,…) qui est traduit en signal électronique pour interprétation.
- Les biocapteurs piézoélectriques (vibration du cristal en fonction de sa masse sous l'impulsion d'un courant électrique)
- Les biocapteurs thermiques (changement de température entre une enzyme et son substrat)
- Les biocapteurs manométriques (changement de pression partielle d'un gaz dans une cavité close)

IV.2.1.2 Evaluation de la performance d'un biocapteur

Plusieurs facteurs comme le pH, la température, la concentration et la nature des éléments chimiques peuvent affecter la réponse d'un biocapteur. Les performances d'un biocapteur peuvent être évaluées grâce à différents paramètres qui sont requis pour toute application dans le domaine de l'analyse.

IV.2.1.2.1 La sélectivité

Un biocapteur se doit reconnaitre uniquement l'analyte d'intérêt. Cela est d'autant plus important si cet analyte se trouve dans un milieu complexe (eau, plasma sanguin….) contenant plusieurs molécules différentes (voir VI.12).

Les biocapteurs d'affinité utilisent des biomolécules sélectives capables de réaliser des liaisons spécifiques (anticorps, récepteurs membranaires ou des oligonucléotides) avec l'analyte cible pour produire un signal électrique mesurable. La reconnaissance moléculaire est principalement déterminée par des complémentarités de taille et de forme du site pour l'analyte d'intérêt. La grande affinité et la spécificité de ces biomolécules pour leurs ligands en font des outils très sensibles et très sélectifs. Les biorécepteurs dits « naturels » que l'on trouve dans cette catégorie sont les anticorps et l'ADN [59].

IV.2.1.2.2 La sensibilité

Pour une valeur donnée de la grandeur à mesurer G, la sensibilité (s) s'exprime par le quotient de la variation de la grandeur de sortie S par la variation correspondante de la grandeur mesurée autour de la valeur G.

$$s = \left(\frac{\Delta S}{\Delta G}\right)_{G=const}$$

Dans le cas le plus général (la courbe d'étalonnage n'est pas linéaire), la sensibilité représente la pente de la tangente en un point à la courbe d'étalonnage.

IV.2.1.2.3 Le temps

Le temps de réponse court et une réponse rapide, relèvent de la performance d'un biocapteur. Il dépend des applications envisagées. Un temps de réponse inférieur à 5 minutes est jugé acceptable mais devient trop long s'il dépasse 10 minutes. Les biocapteurs enzymatiques opèrent par une consommation de substrats. Ainsi, l'agitation de la solution échantillon permet de réduire le temps de réponse du biocapteur en favorisant la diffusion du substrat à travers la couche active. La perméabilité de cette couche facilite aussi cette diffusion et permet d'atteindre plus rapidement une réponse stable. Le temps nécessaire à un biocapteur pour se régénérer afin d'être prêt pour une nouvelle mesure est appelé temps de régénération. Lors d'un nouvel essai, la réponse d'un biocapteur peut être immédiate ou nécessite un retour à l'équilibre. Généralement, ce paramètre est rapporté comme étant le nombre d'échantillons analysés par heure [60].

IV.2.1.2.4 La reproductibilité

La reproductibilité est une indication quantitative de la déviation de deux mesures indépendantes ayant été déterminées dans les mêmes conditions. Plusieurs essais peuvent être réalisés afin de calculer, grâce aux méthodes statistiques, la déviation standard et le coefficient de corrélation. Dans le cas des biocapteurs, la diversité entre les essais doit être inférieure à ± (5-10) % [60].

Quelques exemples de biocapteurs sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Eléments biologiques	Transducteur	Exemple
-Enzyme -Bicouche lipidique	**Electrochimie** Conductimétrie	Électrodes de Pt ou Au pour déterminer le changement de conductivité de la solution due à la production d'ions
-Anticorps -Acide nucléique	**Optique** Fluorescence	Photodiodes, fibre optiques, puces à ADN
- Anticorps - Antigène - Enzyme - Acide nucléique	Résonance de plasmons de surface (SPR)	BIAcore (avec surfaces d'Au ou Ag)

IV.2.2 Détection avec le graphène

L' imperméabilité du graphène permet de détecter des molécules aussi petites que l'hélium, et une conductivité électrique élevée associée à de faibles niveaux de bruit électronique et thermique font du graphène un matériau prometteur pour la détection de substances chimiques et biologiques. Quand celui-ci est exposé à différents environnements chimiques et biologiques, sa conductivité électrique et/ou l'intensité de sa fluorescence changent, et ces changements sont exploités par les capteurs. Ainsi, des gaz tels que le monoxyde de carbone, l'ammoniac ou la vapeur d'eau ont été détectés par des capteurs à base de graphène.

Après fonctionnalisation du graphène avec des biomolécules telles que des anticorps utilisés en récepteurs spécifiques, les capteurs à base de graphène peuvent détecter des marqueurs biologiques liés à des cancers ou à des maladies cardiaques. Ceci peut à terme aboutir à des laboratoires sur puce.

IV.2.2.1 Graphène FET pour détecter le glucose

En 2012, Yeon Hwa Kwak et ses collaborateurs [61] à l'institut coréen de technologie électronique ont réussi à fabriquer des transistors à effet de champ à base de graphène (GFET) pour détecter des taux de glucose entre 3.3 et 10.9mM. Ceci couvre principalement la plage de référence des tests médicaux pour le diagnostic du diabète. Le capteur est fabriqué à partir du graphène CVD transféré sur du polyéthylène téréphtalate (PET), un substrat flexible et connecté par les électrodes en argent. Un puits en polydiméthylsiloxane (PDMS) est monté sur la puce de 33mm^2 pour délimiter la zone active et contenir l'électrolyte (PBS) connecté par une électrode en platine pour des mesures électriques. Les molécules de glucose sont attachées au graphène par l'ester succimidylique de l'acide 1-pyrénébutanique (PSE). On observe un décalage du point de Dirac vers des tensions négatives avec l'augmentation de la concentration du glucose.

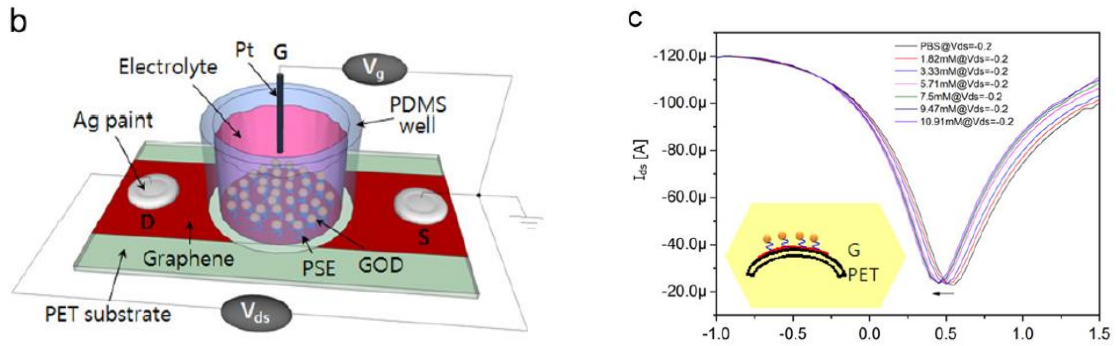


Figure 27. Détection du glucose avec des transistors à effet de champ à base du graphène. b) dispositif expérimental, c) mesures électriques des caractéristiques de transfert pour différentes concentrations de glucose. V_{ds}= - O.2V. Image extrait de [61].

IV.2.2.2 Graphène FET comme détecteur de gaz

En 2007, F. SCHEDIN et ses collaborateurs [62] du Manchester Center for Mesoscience and Technology à l'Université de Manschester ont fabriqué des transistors à base du graphène exfolié du graphite d'un taille de 10µm. Ces capteurs sont capables de détecter des gaz à l'échelle de la molécule unique. Ils ont démontré que les gaz comme NO_2, H_2O, et I_2 agissent comme des accepteurs de charges alors que les gaz comme NH_3, CO et l'éthanol sont des donneurs. Bien que le graphène soit fortement fixées par les molécules de gaz, ils sont parvenus à restaurer l'état initial neutre du graphène en faisant un recuit à 150°C sous vide. La sensibilité de ces transistors peut être encore améliorée et un temps de réaction très court si on augmente la surface d'exposition du graphène ont souligné les auteurs.

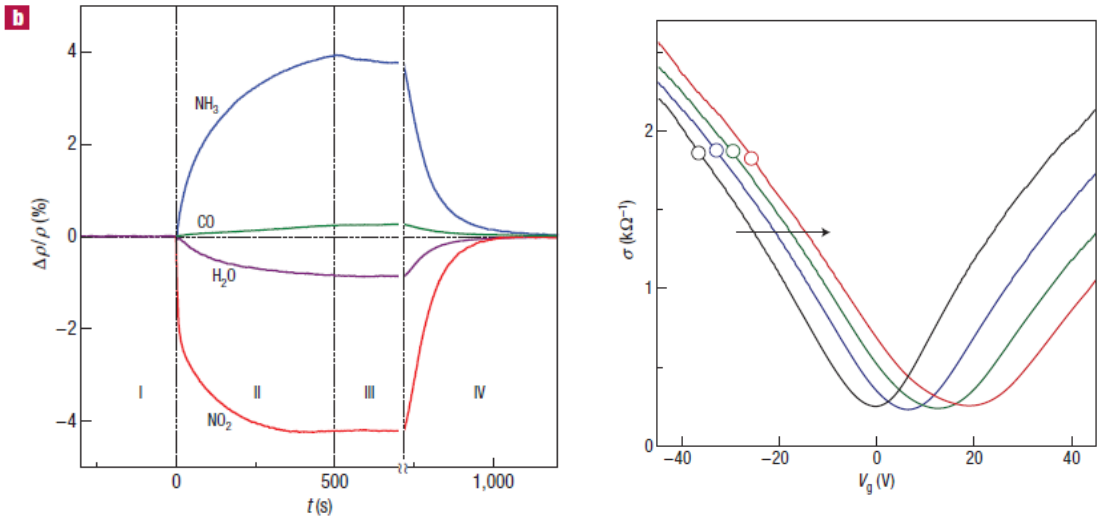


Figure 28 a) Variation de la résistivité du transistor suite à son exposition à un gaz. La région I montre l'état du transistor avant l'exposition, la région II, pendant l'exposition et la région III, l'arrêt de l'exposition. La région IV montre le retour à l'état initial après recuit. b) Caractéristique de transfert du transistor lors de son exposition au NO_2. On voit que ce gaz a un effet dopant positif sur le graphène. Image extrait de [62]

Plus tard en 2010, Hyeun Joong Yoon et al. [63] ont élaboré des dispositifs plus performants pouvant détecter du CO_2 de l'ordre de 10 à 100ppm avec un temps de réponse plus court (10s). Ces appareils miniaturisés peuvent être utilisés dans la détection de gaz toxiques, dans l'armée et en médecine légale.

IV.2.2.3 Graphène FET comme détecteur de pH et de protéines

En 2009, Yasuhide Ohno et ses collaborateurs [64] de l'institut de recherches scientifiques industrielles à l'université de Osaka au Japon ont montré que des transistors à base du graphène exfolié peuvent être utilisés pour détecter le pH de l'électrolyte et l'adsorption des protéines, l'albumine de sérum bovin (BSA). Ils sont couplés des mesures de top-gated et back-gated pour contrôler le dopage du graphène. Des solutions de pH 4.0 à 8.2 ont été préparées avec un mélange de PBS et un tampon borate de pH9.3. La conductance varie positivement avec le pH et les décalages du point de Dirac suivent une relation linéaire en fonction du pH croissant. Ils ont ensuite montré que la conductance augmente avec l'augmentation de la concentration de protéine introduite dans l'électrolyte à intervalle de temps de 20 minutes. Un an auparavant, Priscilla Kailian Ang et al. [65] de l'université de Singapour ont détecter le pH des électrolytes en utilisant du graphène épitaxie multicouche. Des sensibilités de 98mV/pH pour du graphène bicouche et 99mV/pH pour du graphène 3-4 couches ont été reportées.

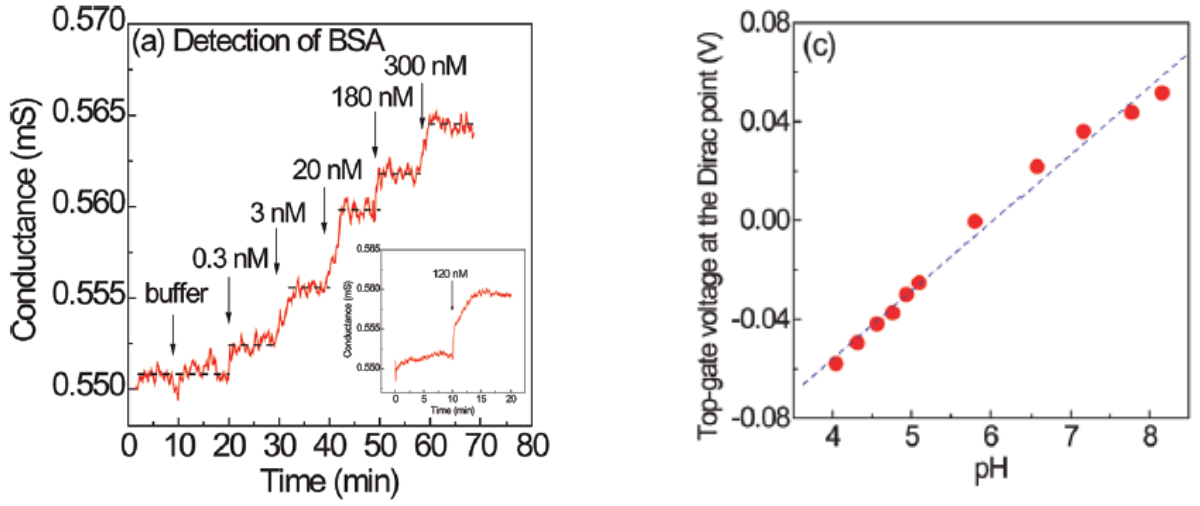


Figure 29 a) Variation de la conductance suite à l'augmentation de la concentration de protéine, c) dépendance linéaire de la tension au point de Dirac en fonction du pH de l'électrolyte. Source [65]

IV.2.2.4 Graphène FET comme détecteur d'acides nucléiques

Les méthodes traditionnelles de détection des acides nucléiques sont entre autres la détection par marquage (fluorescence, ou éléments radioactifs) et la détection électronique. La détection par fluorescence nécessite le marquage des cibles qui est une étape qui prend assez de temps, compliquée et limitée par les phénomènes de photoblanchiment [66]. Il n'est pas aussi évident de marquer une molécule avec un fluorophore ou un élément radioactif ce qui peut induire des erreurs dans l'analyse des résultats. La révélation des images nécessite aussi des appareils optiques comme un scanner qui sont volumineux, lourds et coûteux. Les nouvelles technologies ont permis d'avoir des puces électroniques beaucoup plus petites en taille et plus rapides. Un exemple typique est la puce en silicium. Le prix du substrat utilisé reste relativement élevé. La délocalisation du gaz d'électrons dans le plan vertical dans le substrat limite la sensibilité des capteurs fabriqués [67].

La découverte de nouveaux matériaux comme le graphène a ouvert la voie à de nouvelles approches de détection directe sans aucune étape intermédiaire de marquage qui peuvent altérer les biomolécules. Nous faisons ici un tour d'horizon sur les travaux qui ont été fait par différents groupes de recherche. On peut classer ces dispositifs en deux grandes catégories. Les dispositifs à grille arrière (back-gated) et les dispositifs à grille liquide (liquid-gated).

IV.2.2.4.1 Les dispositifs à grille arrière

Les transistors à grille arrière sont moins utilisés pour la détection de l'ADN. Cela est dû probablement à la nécessité d'appliquer des tensions de grille élevées avant de pouvoir les faire fonctionner. Ceci peut produire des chaleurs par effet joule qui peut détruire les molécules. Les dispositifs à grille liquide sont mieux adaptés dans ces cas puisqu'ils marchent à de faibles tensions [68]. Toutefois les dispositifs à grille arrière ont leurs avantages dans les situations où l'analyte n'est pas soluble comme dans le cas de la détection des gaz [69]. Kybert et al. ont récemment rapporté que l'utilisation d'un réseau de capteurs à base de graphène fonctionnalisé par des molécules d'ADN pour la détection de vapeur chimique ont besoin d'une large plage de tension de grille avant d'observer le point de Dirac après dépôt d'ADN [70]. L'adsorption des molécules d'ADN mono brin à la surface du graphène permet la détection des vapeurs chimiques jusqu'à une concentration ppb[1] en induisant des décalages du point de Dirac. La mobilité des transistors et la localisation du point de Dirac avant (14V) et après (58V) le dépôt d'ADN sont montrés sur la **Figure 30**. Les auteurs expliquent que le décalage du point de Dirac est dû à l'apport des charges négatives des groupements phosphates des molécules d'ADN.

Généralement les dispositifs à grille arrière montrent de large décalage du point de Dirac par rapport aux dispositifs à grille liquide que nous abordons dans la section suivante.

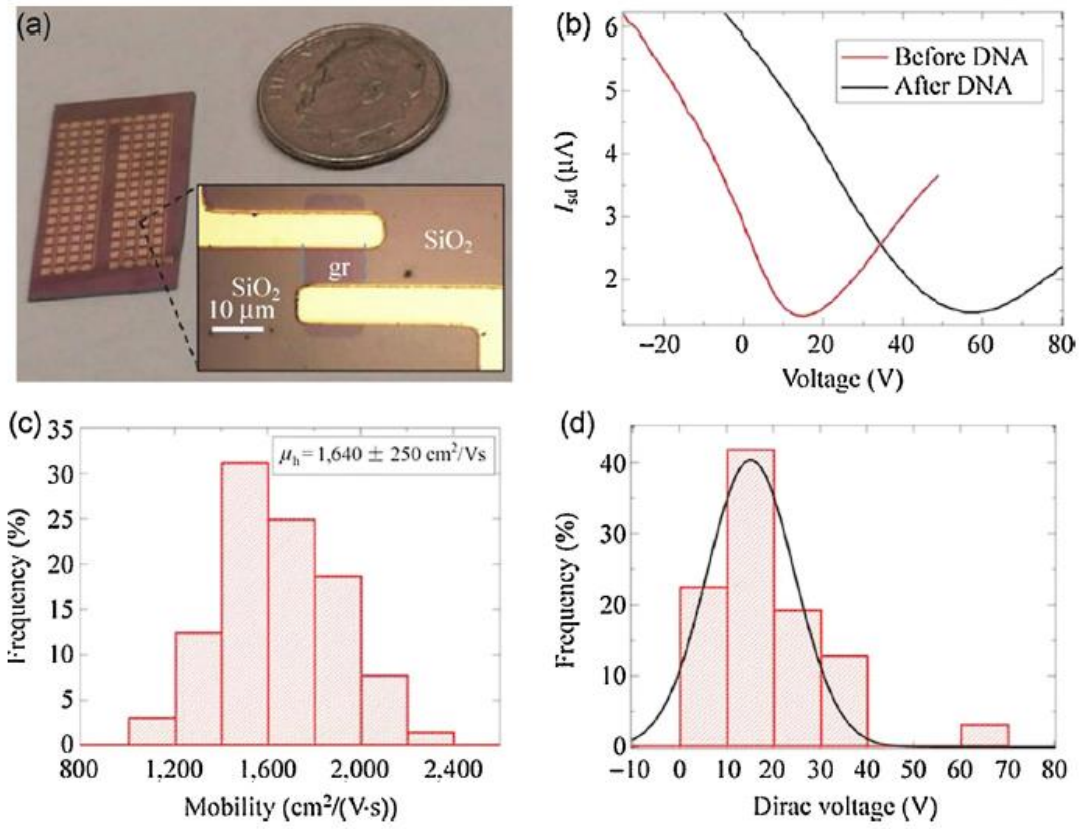


Figure 30 a) Dispositif expérimental contenant 112 transistors de taille 10µmx15µm. a) réponse d'un transistor avant et après le dépôt d'ADN, c) évolution de la mobilité des différents transistors du réseau, d) position relative du point de Dirac. [70]

[1] Une partie par milliard, souvent représentée par le symbole **ppb** (sigle de l'anglais américain *part per billion*), est une manière d'exprimer les concentrations et les proportions en général. Le terme est fréquemment utilisé en sciences (toxicologie, chimie, etc.)

IV.2.2.4.2 Les dispositifs à grille liquide

Les conditions électroniques similaires précédentes sont appliquées mais la grille métallique est remplacée par une solution conductrice « électrolyte » dont les propriétés peuvent être modifiées à volonté. On peut alors changer la nature des ions, leur concentration, le pH de l'électrolyte. En Janvier 2019, Rui Campos et ses collaborateurs ont fabriqué des transistors avec du graphène CVD et détecté l'hybridation et des mutations à l'échelle d'attomolaire. Cette grande sensibilité du transistor est due à son architecture. Le canal du graphène a une grille 2500 plus grande que sa taille permettant une distribution homogène du potentiel dans l'électrolyte et un champ électrique uniforme [71]. Un peu plus tôt, les EGFETs (Electrolyte-gated graphene field-effect transistors) ont été utilisé pour la détection de l'ADN [72] avec une sensibilité de 0.01nM et capables de détecter les mutations [73].

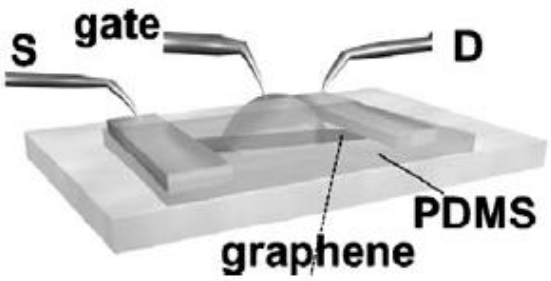


Figure 31. Vue d'artiste d'un transistor à effet de champ à base de graphène à grille liquide [73]

Une goutte de tampon contenant les échantillons d'ADN est placée sur le graphène préalablement découpé et connecté par les électrode source et drain. Une importante distinction entre les EGFETs et BGFETs (Back-gated graphene fiel-effect transistors) est la circulation du courant entre le graphène et l'électrode à travers l'électrolyte. Alors que les fuites de courant entre la grille et la source sont limitées par le diélectrique (SiO_2) dans le cas des BGFETs, cette fuite est dans le cas des EGFETs limitées par la formation de la double couche de Debye le long du graphène (voir **Figure 32**) et l'électrode pour de faible tension de grille [74]. Les fuites de courant apparaissent pour des potentiels de grille élevés et provoquent des phénomènes électrochimiques.

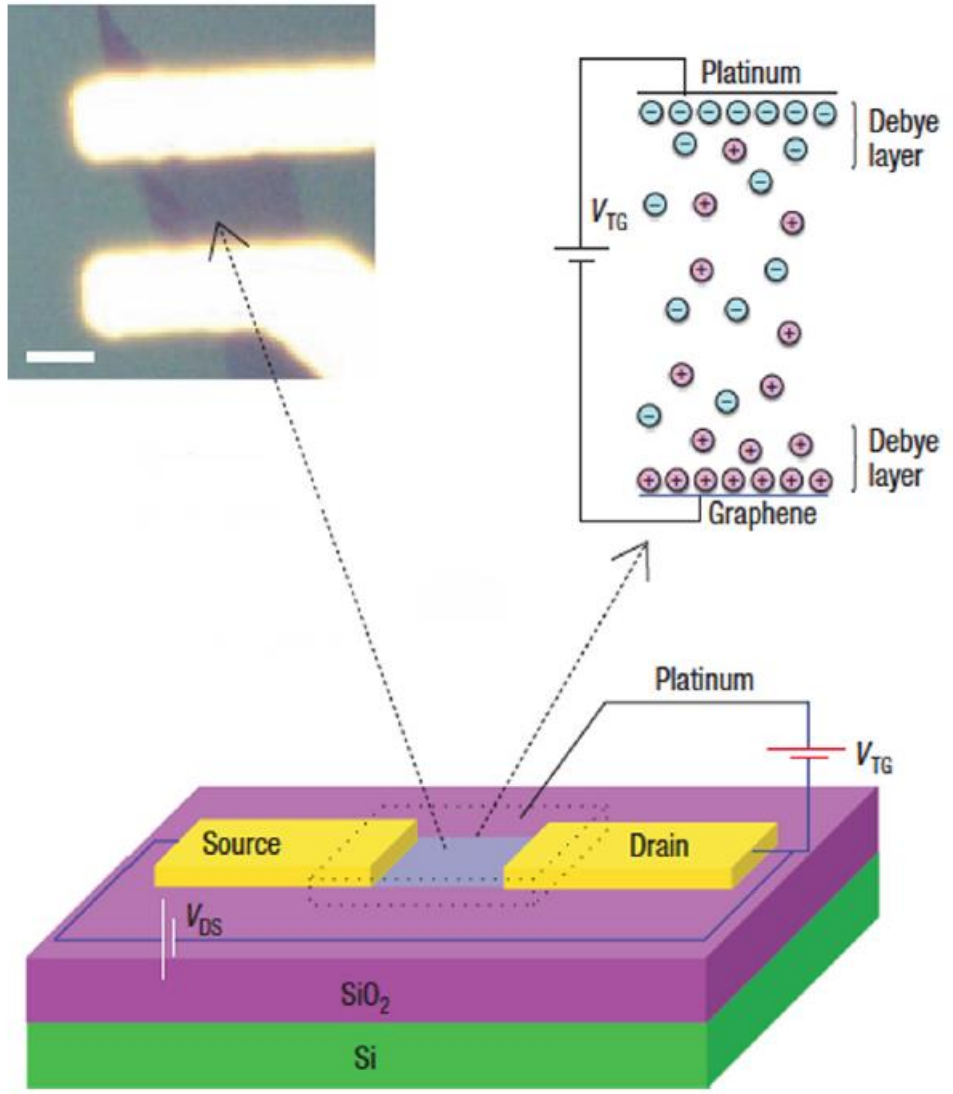


Figure 32. Formation de la double couche de Debye avec les dispositifs à grille liquide. Image extraite de [74]

Dong et al. ont récemment détecté l'hybridation de l'ADN avec les EGFETs [73]. Des molécules sondes (ssDNA) sont immobilisées à la surface du graphène puis séchées. Une solution des cibles complémentaires (cDNA) a été ajoutée suivi de mesure électrique avec une électrode de référence en argent (Ag/AgCl). Des décalages vers des tensions de grille négatives ont été observés après l'hybridation. En outre, les auteurs ont pu écarter la possibilité de modifications de la concentration de la solution ionique entraînant le décalage du point de Dirac en augmentant la concentration du tampon [75]. D'autres ont rapporté que la concentration ionique provoque des déplacements du point de Dirac en masquant les impuretés de charge dans le graphène [76]. Les auteurs affirment que le décalage du point de Dirac est plutôt dû au dopage de type n par l'empilement π– π des cycles aromatiques riches en électrons des acides nucléiques avec le graphène. Des arguments sur l'injection de charge, ou de dopage, ont déjà été discutés expérimentalement dans le cadre d'une étude qui modifiait la longueur des groupes chargés attachés à la surface du graphène [77]. Cependant, le décalage négatif du point de Dirac après la liaison ADN-graphène a été expliqué dans la littérature par divers mécanismes, notamment le dopage en trous [72] [78], le dopage en électrons [79] et des interactions chimiques.

Le tableau ci-dessous montre une étude bibliographique sur les conditions d'hybridation, le type de graphène, la longueur du canal, les moyens de fixation des molécules et le sens de décalage du point de Dirac.

work	LoD (M)[a]	hybridization conditions	FET channel growth/transfer	FET channel $L \times W$ (μm^2)	linker	gate	shift in V_{Dirac}[b]	fabrication
Chen et al.[21]	1×10^{-12}	1× PBS[c]	CVD on Cu/PMMA	$10^4 \times 10^4$	none	Ag-wire	negative	contacts w/Ag paste
Dong et al.[20]	1×10^{-11}	PB1, pH 7.4[d]	CVD on Ni/PMMA	3000 × 10000	none	Ag-wire	negative	contacts w/Ag-paint
Xu et al.[25]	1×10^{-11}	0.01× PBS, pH 7.8	CVD on Cu/PMMA	45 × 90	PBSE	Pt-wire	positive	μ-fluidic platform, optical litho.
Xu et al.[51]	1×10^{-13}	0.01× PBS, pH 7.4	CVD on sapphire/ direct growth	43 × 90	PBSE	Ag/AgCl wire	positive	μ-fluidic platform, optical litho.
this work	1×10^{-17}	PB2, pH 7[e]	CVD on Cu/PMMA	25 × 75	PBSE	Au-planar, integrated	positive	planar, optical litho., contacts prepatterned

[a]In synthetic medium. [b]Upon DNA hybridization. [c]137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 1.47 mM KH_2PO_4. [d]10 mM PB, 250 mM NaCl. [e]10 mM PB, 150 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$.

Figure 33. Tableau résumant les différentes techniques d'hybridation avec le GFETs. Source [80]

Récemment Lin et al. ont émis des incohérences dans l'utilisation des EGFETs pour les applications de détection de l'ADN. Les auteurs proposent que la résistance de la feuille du graphène et la mobilité des porteurs de charges devraient être analysées au lieu des décalages du point de Dirac [72].

Cette étude a été faite par Nihar Mohanty et Vikas Berr [78] au département d'ingénierie chimique de l'université Kansas State à Manhattan en 2008. Ils ont remarqué que la fonctionnalisation du graphène avec les sondes affecte sa conductivité en l'augmentant de 128%. Par la suite l'hybridation des sondes avec les cibles complémentaires conduit à une augmentation de la conductivité de 71%. Ceci s'est traduit par la baisse de la resistance du graphène de 9.86 ± 0.24 M Ω à 5.77 ± 0.17 MΩ.

IV.3 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre nous avons fait l'état de l'art des biocapteurs à base de graphène. Le matériau est utilisé pour détecter des gaz, des protéines, le pH des solutions et aussi les acides nucléiques avec de meilleures sensibilités. Le contact direct du graphène avec les substances à détecter a l'avantage d'offrir une très grande sensibilité mais dans certains cas il est difficile de régénérer le capteur (c'est-à-dire désadsorber les molécules) et réutiliser le capteur. Nous avons proposé dans les chapitres suivants une approche originale permettant la détection sans contact direct du graphène avec les molécules.

V Chapitre 5 : Nanofabrication et caractérisation des réseaux de GFETs

Nous développons dans ce chapitre des procédés de fabrication d'un réseau de transistors à base de graphène Cu-CVD sur un substrat Si/SiO_2 en vue des applications de détection électronique des bio-molécules.

V.1 Transfert du graphène

La fabrication d'un réseau de transistors à base de graphène comporte une série d'étapes techniques de haute précision qui doivent être bien maîtrisées. Afin d'avoir une bonne mobilité, une faible résistance de contact et un graphène faiblement dopé, toutes les étapes suivantes ont été soigneusement travaillées en salle blanche.

Dans mon projet de thèse, j'ai fabriqué des réseaux de 48 transistors pour la détection des molécules d'ADN. Ces transistors sont linéairement disposés et connectés par une source commune et des drains individuels. Pour avoir un tel nombre de transistors sur un même réseau, j'ai utilisé le graphène CVD (Chemical Vapor Deposition). Le graphène CVD est fabriqué par la déshydrogénation catalytique du méthane à haute température(voir III.3.4). Les atomes de carbone peuvent alors se précipiter sur une feuille de cuivre et former une couche d'épaisseur monoatomique dépendant des conditions de la croissance (Cu foil 25µm d'épaisseur, pureté 99,5% - 99,999%, préoxydation à 200°C sous air, 1050°C, 25mBar H2 300sccm, CH4 3sccm, Ar 700 sccm temps de croissance: 5min). Initialement je devrais utiliser le graphène fabriqué au LPA par Pascal Morfin. Mais une nouvelle répartition des tâches dans l'équipe suite au recrutement d'une nouvelle ingénieure de recherche (Aurélie Pierret) a du ralentir la mise en place de la technique de croissance. Nous nous sommes acquittés des services de la compagnie Graphenea pour nous procurer du graphène Cu-CVD monolayer. Pour utiliser ce graphène, on a besoin de le transférer sur un substrat: du Si/SiO2 par exemple dans mon cas. Le transfert du graphène est une étape essentielle lors de la fabrication d'une puce. Pour avoir un réseau dont tous les transistors ou du moins la majorité marchent, il faut que la feuille de graphène soit continue; ceci passe par un transfert de qualité. Lors de ma thèse, j'ai réussi à mettre sur place un process assez reproductible qui m'a permis d'avoir des résultats satisfaisants. Dans les parties qui suivent, je vais essayer de les décrire le plus fidèlement possible.

V.1.1 Dégazage de l'eau

L'eau des robinets de la salle blanche contient des gaz dissous (O2, CO2….). Son utilisation pour rincer lors du transfert de graphène conduit à la formation d'agrégats de bulles de gaz à l'interface graphène/eau. Ces bulles de gaz s'éclatent lors du séchage et laissent une ouverture dans la feuille de graphène. Pour éviter cela, nous puisons de l'eau dans un grand bécher qu'on met de côté pendant une journée avant de l'utiliser. Ceci permet aux bulles de gaz de monter et s'éclater à la surface.

V.1.2 Support mécanique

Le graphène des deux faces de la feuille de cuivre ne sont pas de même qualité. Lors de la croissance, le graphène se forme sur les deux faces mais celui de la face supérieure est de meilleure qualité. La face inférieure étant posée contre le four, elle ne subit pas les mêmes traitements. Une instruction « graphene on top » est indiquée sur la pochette du graphène de la compagnie Graphenea pour repérer la meilleure face par exemple. Malgré les propriétés mécaniques exceptionnelles du graphène, son

épaisseur de quelques couches atomiques rend difficile, voire impossible [81], le transfert d'échantillons de graphène de l'ordre du centimètre carré sans entraîner la rupture du matériau. Pour cette raison la plupart des transferts de graphène sont réalisés en ajoutant un support mécanique pour faciliter sa manipulation. Le matériau le plus utilisé pour transférer du graphène obtenu par croissance sur du cuivre est un polymère, le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) [82]. Ce polymère peut être appliqué par simple dépôt par tournette (spin coating) à une vitesse de rotation variant entre 1000 et 4000 rotation par minute (rpm). L'épaisseur de la couche du polymère peut être également ajustée en utilisant du PMMA de masse moléculaire variée, typiquement entre 450 000 et 996 000 g/mol et en utilisant différentes concentrations de PMMA. L'optimisation de ces paramètres permet d'obtenir une couche de PMMA d'épaisseur idéale, suffisamment résistante mécaniquement tout en demeurant flexible, ce qui garantit une bonne conformité entre le graphène et le substrat. Après le dépôt, le PMMA est recuit pendant 6 minutes à une température d'environ 160°C. Nous avons aussi tenté de déposer une fine couche d'alumine (5nm) par ALD sur le graphène (pour le protéger davantage) avant d'appliquer le PMMA et ceci marche encore mieux. Il est à noter que la couche d'alumine ne tient pas après la dissolution du PMMA. Elle est juste utilisée comme une couche sacrificielle. Il faut en déposer une autre si on veut protéger le graphène lors des séries de lithographie.

V.1.3 Retrait du graphène de la deuxième face

Comme je l'avais mentionné plus haut, les deux faces de la feuille de cuivre sont exposées aux précurseurs et il y a donc croissance du graphène sur chacune. Afin d'éviter que la deuxième couche de graphène vienne adhérer à la première lors du transfert, il est préférable de la retirer avant de dissoudre le support métallique. Le graphène de la face inférieure peut être alors gravé par la RIE (Reactive-Ion Etching) avec le programme stripping à une pression de 10 nbar pendant 2 minutes.

V.1.4 Dissolution de la feuille de cuivre

Pour ce qui concerne la dissolution du support métallique, différentes solutions chimiques peuvent être utilisées. Bien qu'il soit possible d'utiliser des acides concentrés tel que l'acide nitrique, leur utilisation n'est pas recommandée, car il y a généralement production de bulles d'hydrogène lors de la dissolution du métal qui risquent d'endommager le graphène. Pour la dissolution du nickel, il est possible d'utiliser une solution aqueuse de chlorure de fer (III) (FeCl3) à une concentration de 1 M ou alors une solution de HCl diluée à 3 %. Pour ce qui est du cuivre, plusieurs solutions peuvent être utilisées, telles qu'une solution de nitrate de fer(III) (Fe(NO3)3) à une concentration de 0,05 g/ml, une solution commerciale pour la gravure du cuivre (CE-100, de la compagnie Transene) ou alors une solution de persulfate d'ammonium à 0,05-0,1 M ce que j'utilise dans mon cas. Ce dernier nous permet de faire une gravure douce de la feuille de cuivre. Pour une feuille de cuivre de 25µm d'épaisseur, il faut une nuit pour une dissolution totale.

V.1.5 Retrait de la feuille de cuivre

Lorsque la feuille de cuivre est complètement dissoute, le film de l'ensemble PMMA/graphène flottant à la surface de la solution est ensuite rincé plusieurs fois dans l'eau déionisée préalablement dégazée, puis récupéré directement sur le substrat désiré ici du SiO_2 traité comme décrit à l'étape V.1.6. Les échantillons sont ensuite séchés sous hotte pendant quelques heures. Pour améliorer l'adhésion du graphène au substrat il est conseillé de chauffer de façon douce l'échantillon jusqu'à 160°C [83]. On peut maintenant dissoudre la PMMA dans l'acétone à 50°C pendant minimum 15 minutes puis rincer à l'isopropanol (IPA). L'utilisation de la soufflette est prohibée une fois que le graphène est transféré pour éviter de l'endommager.

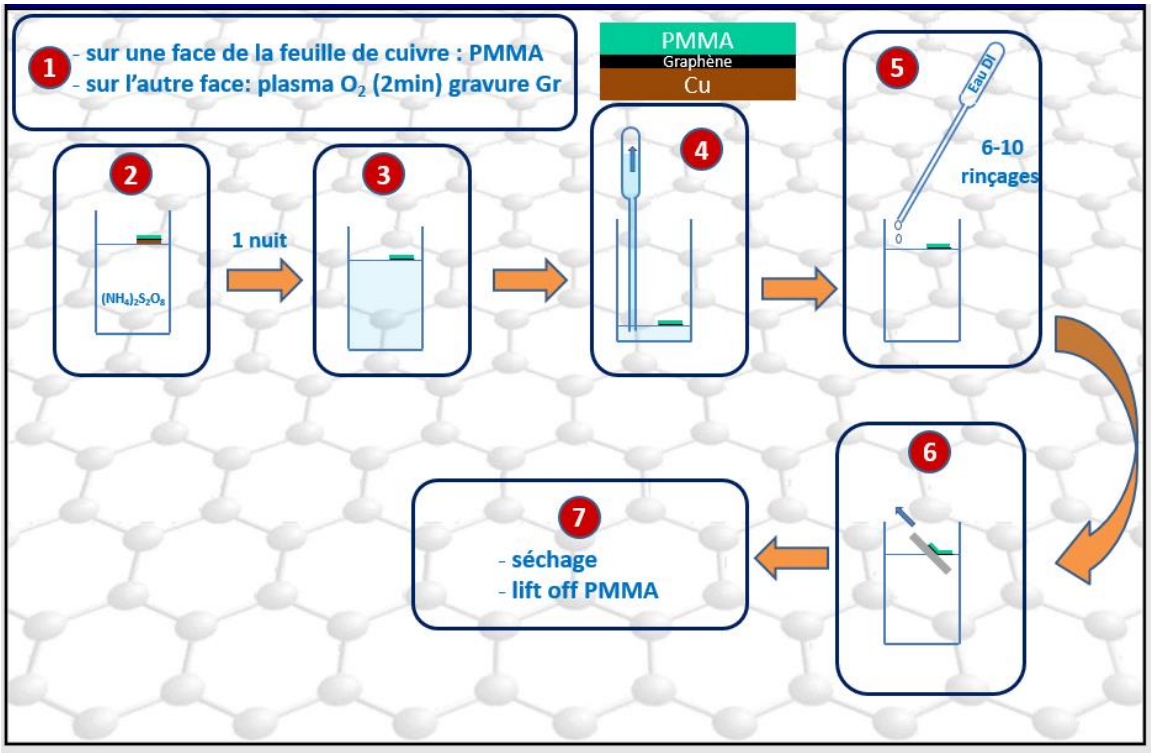


Figure 34. Illustration des différentes étapes d'un transfert humide. Schéma adapté d'une présentation lors de la journée du LPA du 6-8 octobre 2014.

V.1.6 Nettoyage du substrat

Le nettoyage du substrat est une étape essentielle pour avoir une bonne qualité de surface. L'élimination des déchets organiques se fait par un nettoyage à base de solvants standards. Un premier bain d'acétone pendant 5 minutes permet d'enlever ces particules organiques, notamment les résines. Ensuite un bain dans l'isopropanol permet de retirer l'acétone et d'enlever toutes les traces lors du séchage. Une dernière étape de plasma oxygène est nécessaire afin de rendre hydrophile la surface du substrat. Ceci permet un bon étalement de la feuille de graphène et améliore son adhésion au substrat.

Une fois le transfert réussi, on peut passer maintenant aux étapes de lithographie qui nous permettent de découper le graphène et définir les motifs des électrodes suivi de la métallisation.

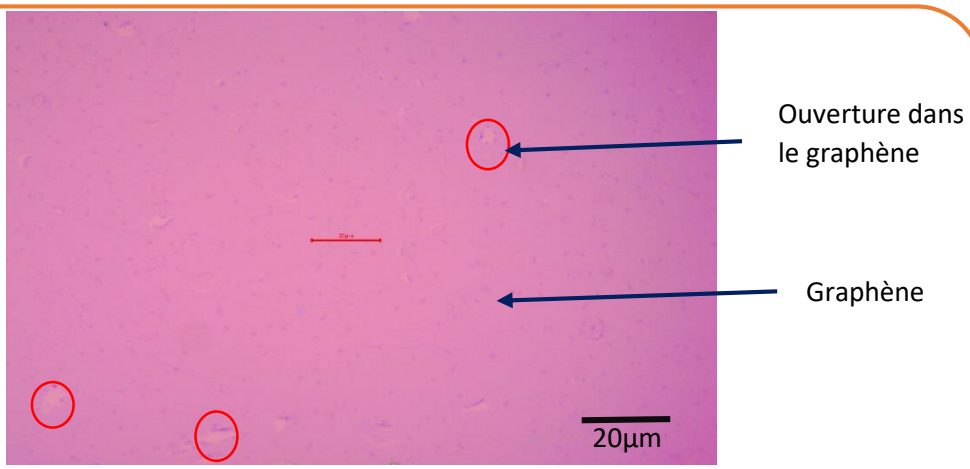


Figure 35. Image d'un transfert de graphène réussi sur du 280 nm de SiO_2 . Les encerclés en rouge montrent des trous qui peuvent être causés par éclatement des bulles de gaz ou des agressions mécaniques subites par le graphène lors du transfert

V.1.7 Protection du graphène

Avant tout procédé de lithographie, le graphène doit être protégé pour éviter son contact direct avec la résine et le développeur. Le matériau largement utilisé est l'alumine [84], [85]. Le dépôt se fait par la technique de ALD (Atomic Layer Deposition). Le dépôt n'a aucun effet destructif sur le graphène, mais au contraire réduit l'hystérèse et diminue le dopage en trous du graphène [86]. Mais l'alumine adhère mal au graphène et se décolle facilement lors des étapes de lift-off pendant la lithographie. On peut utiliser l'aluminium oxydé comme couche d'accroche avant de déposer l'alumine [87] mais ceci ne semblent pas marcher à chaque fois. La Figure 36 montre les différentes combinaisons que nous avons développées. Sur la Figure 36a, le graphène est protégé avec une couche de 3 nm d'aluminium oxydé. Les 3nm d'AlO_x sont obtenus par une série de 3 dépôt de 1nm d'aluminium par évaporation à 4.10^{-6}mbar et l'oxydation à 200 mbar pendant 15 minutes. Sur la Figure 36b, le graphène est protégé par 15nm de Al_2O_3 (150 cycles, 300mTorr, 175°C) et sur la Figure 36c, le graphène est protégé par 3nm AlO_x et 15nm de Al_2O_3. On peut voir que dans les deux premiers cas, la couche de protection ne tient pas après le lift-off. Dans le troisième cas, le graphène est bien protégé mais nous avons des problèmes de sous-gravure lors de la lithographie de contact dû à la durée de gravure relativement longue pour graver la totalité de la couche de protection sur les plots de contact. L'autre difficulté rencontrée est la valeur élevée des résistance de contact lors de la mesure électrique ceci étant dû à la présence de résidus de la couche de protection sur les plots de contact.

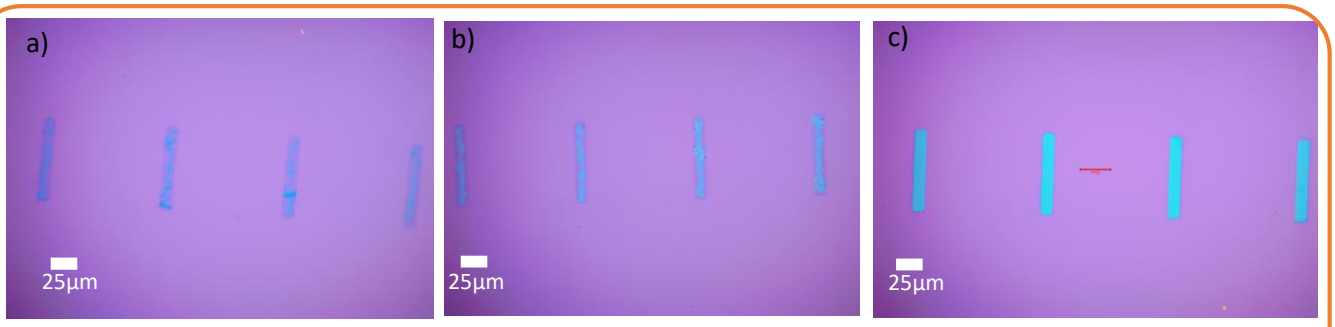


Figure 36 Protection du graphène lors des procédés de lithographie. a) Protection avec 3nm d'Alox, b) Protection avec 15nm de Al2O3 (ALD), c) Protection avec 3nm Alox et 15nm Al2O3 (ALD)

Nous avons finalement utilisé une couche de 1nm d'oxyde d'aluminium déposé par la technique de ALD et une combinaison de résine au cours des étapes de lithographie pour protéger le graphène à la suite de nos travaux. Cette technique fait l'objet de dépôt d'un brevet [88].

V.2 Les différentes étapes de lithographie

V.2.1 La lithographie

La lithographie est l'étape technologique nécessaire pour transférer les motifs présents sur un masque sur un substrat. Le transfert se fait sur de la résine photosensible étalée sur la surface où on veut imprimer les motifs. Par insolation, la résine exposée réagit et sa structure change. Il est alors possible d'enlever sélectivement soit les parties exposées, soit les parties protégées (**Figure 37**). Il existe plusieurs types de résine. Les résines positives (dont les parties exposées aux rayons ultraviolets UV seront enlevées) et des résines négatives (dont les parties exposées restent après développement). D'autres résines permettant les deux types de lithographie sont dites réversibles. Elles peuvent se comporter comme une résine positive ou négative dépendant des traitements d'insolation et de recuit qu'elles

subissent. Celle que nous utilisons est la AZ5214E. Le procédé d'inversion nécessite une étape supplémentaire de recuit et d'insolation pleine plaque.

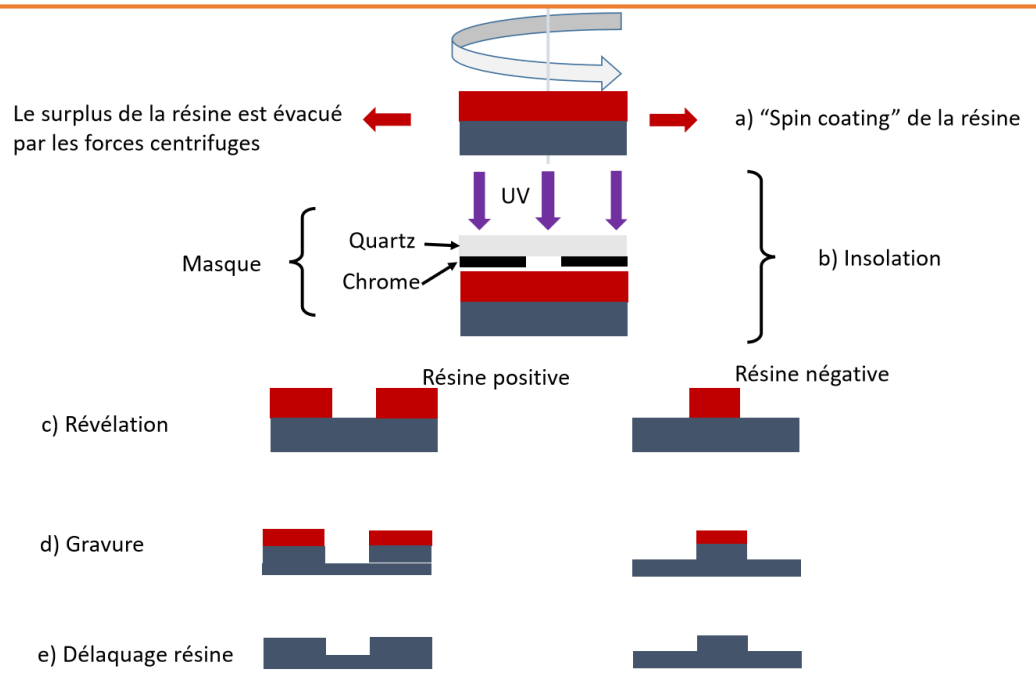


Figure 37. Schéma illustratif des étapes de photolithographie. a) « Spin coating » de la résine sur le substrat, b) Insolation à travers le masque de photolithographie, c) Révélation chimique des différentes résines (positive ou négative), d) Gravure chimique et/ou physique, e) Nettoyage de la résine restante

V.2.1.1 Première lithographie

Nous utilisons des substrats de silicium oxydés dont l'oxyde fait 1 µm d'épaisseur. Bien qu'avec cette épaisseur le contraste optique ne nous permet pas de bien voir le graphène, elle nous permet du moins d' empêcher les fuites de courant entre la source et la grille ceci étant dû à la grande taille de nos électrodes. Ces substrats sont tout d'abord découpés en des petits morceaux (1.2 cm X 1.2 cm) puis nettoyés à l'acétone pendant 5 minutes et rincés à l'IPA. On passe alors à la première lithographie (qui est une lithographie négative) qui nous permet d'imprimer les croix d'alignement sur le substrat. Etant donné qu'un procédé de fabrication comprend plusieurs étapes correspondant à plusieurs niveaux du masque, il est nécessaire d'effectuer un alignement à chaque étape. Cette lithographie est d'autant plus importante car ces croix nous permettront de nous aligner sur les canaux de graphène qui sont totalement invisibles sur 1 µm de SiO_2 en dessous de la résine.

a. Recuit du substrat pour évaporer l'eau : 5 mins @ 120°C
b. Revêtement résine AZ5214E : 30 s @ 4000 rpm
c. Recuit : 2 mins @ 110°C
d. Exposition en utilisant le masque correspondant : Align and expose 2s
e. Recuit : 2 mins @ 125°C
f. Exposition sans masque : Flood exposure 15 s
g. Développement : AZ 726 MIF, 35 s
h. Métallisation : Cr 5 nm/Au 180 nm
i. Lift-off : Acétone 50°C, 15 mins et rinçage à l'IPA

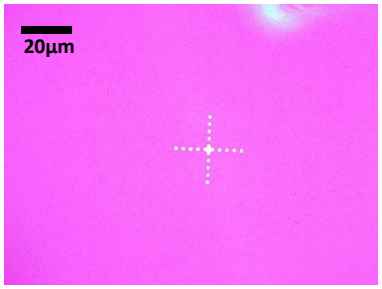


Figure 38. Photographie d'une croix d'alignement après métallisation

V.2.1.2 Deuxième lithographie

Cette lithographie nous permet de découper le graphène en 48 canaux de 60µm de longueur (L) sur 10µm de largeur (W). Il s'agit alors d'imprimer les motifs du masque correspondants en lithographie positive sur le substrat sur lequel le graphène a été déjà transféré et protégé. Pour se faire il suffit de faire les étapes suivantes.

a. Revêtement résine AZ5214E : 30 s @ 4000rpm
b. Recuit : 2mins @ 110°C
c. Exposition en utilisant le masque correspondant : Align and expose 15s
d. Développement : AZ 726 MIF, 22s
e. Gravure de la couche de protection : H3PO4 @ 50°C, 3mins, rinçage à l'eau 2mins
f. Gravure du graphène non désiré : Stripping, 2mins

Le temps de développement (22s) est strict car un sous-développement laisserait de la résine sur le graphène non désiré et on ne pourra pas le graver et un sur-développement révèle des canaux crénelés. Normalement après cette dernière étape on doit dissoudre la résine sur les 48 morceaux de graphène protégés par 1nm Al2O3(ALD) avant de passer à la lithographie suivante. Mais l'alumine adhère mal au graphène dû à sa nature hydrophobique [89], comme on peut le voir sur la **Figure 39**, ce qui fait que quelle que soit les précautions prises lors de cette opération l'alumine s'enlève et expose le graphène à la résine et aux autres déchets organiques pouvant se trouver dans le solvant. Nous avons essayé d'enrésiner à nouveau le substrat en vue de la lithographie contact qui est une lithographie négative où la résine conservée sur le graphène est retraitée en litho négative et ceci marche très bien.

Figure 39. Mise en évidence de la non adhérence de l'alumine au graphène. On voit qu'après le lift-off, les 3nm d'aluminium oxydé s'enlève en partie et expose le graphène à la résine et au développeur qu'on utilisera à la prochaine lithographie

V.2.1.3 Troisième lithographie

Il s'agit ici de définir les motifs des électrodes en vue d'une prochaine métallisation en lithographie négative. Cette lithographie comporte les étapes suivantes.

a. Revêtement résine AZ5214E : 30 s @ 4000rpm
b. Recuit : 2mins @ 110°C
c. Exposition en utilisant le masque correspondant : Align and expose 2s
d. Recuit : 2mins @ 125°C
e. Exposition sans masque : Flood exposure 15s
f. Développement : AZ 726 MIF, 1 min
g. Gravure de la couche de protection sur les contacts: H3PO4 @ 50°C, 3mins, rinçage à l'eau DI 2mins
h. Dépôt métallique (Ti10/Au180) par évaporation thermique

i. Lift-off : Acétone 50°C, 15mins et rinçage à l'IPA

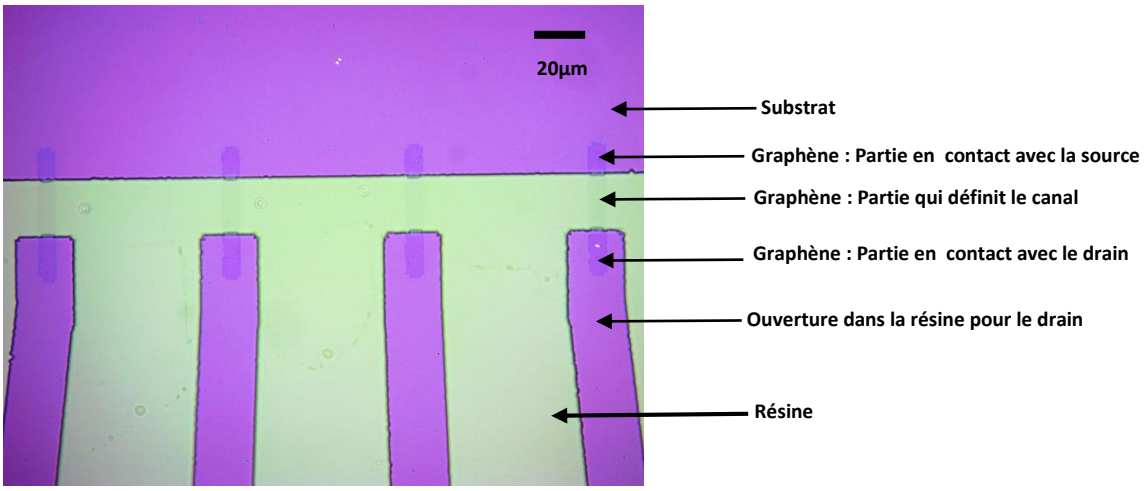


Figure 40. Photographie de l'échantillon après la 3 eme lithographie pour définir les contacts.

V.2.2 Métallisation

Il y a plusieurs techniques de dépôt de couche mince. La plus répandue pour les dépôts de couches minces métalliques est l'évaporation. On peut déposer plusieurs métaux: le nickel, le titane, l'or, le palladium, le platine, chrome etc… avec plusieurs combinaisons possibles.
Dans notre cas, on a principalement utilisé l'or et le titane ou le chrome comme couche d'accroche pour d'améliorer l'ancrage de l'or au substrat.
Le principe est basé sur l'évaporation du métal. Le transfert du métal évaporé puis le dépôt par condensation sur un substrat cible. Le substrat est placé à une distance assez raisonnable du creuset du métal. Le dépôt se fait sous un bon vide (autour de 4.0 10^{-6}mbar). L'évaporateur « Plassys » est équipé d'une chambre de dépôt avec un système de pompage, des sources d'évaporation, des porte-substrats et une source d'énergie pour le chauffage. Trois étapes sont nécessaires pour le dépôt par évaporation.
-Evaporation : cette étape consiste au passage de l'état condensé à l'état vapeur. Elle se fait par chauffage du creuset contenant le métal. Pour le titane, on monte progressivement le courant jusqu'à 20mA, on attend deux minutes puis on monte jusqu'à la vitesse d'évaporation voulu (0.1nm/s). Cette vitesse d'évaporation est atteinte vers 67 mA. Après ce premier dépôt, on laisse refroidir le creuset pendant cinq minutes puis on tourne sur le creuset d'or. On procède de la même façon que précédemment. On monte le courant par palier jusqu'à 50mA puis on attend deux minutes puis on augmente le courant pour atteindre la vitesse de 0.3nm/s vers 270mA.
-Transport de la vapeur de la source au substrat sous vide; ce qui permet d'éviter les collisions lors du parcours. Un libre parcours moyen supérieur à un mètre est déjà bien pour éviter les collisions.
-Croissance du film sur le substrat par condensation. Ce procédé dépend de nombreux paramètres : l'énergie des vapeurs incidentes, la température et la nature du substrat, la vitesse d'évaporation etc…..
A la fin du dépôt on casse le vide pour sortir l'échantillon. On fait un lift-off en introduisant l'échantillon dans de l'acétone à 50°C pendant 15 minutes pour retirer le métal non désiré en dissolvant la résine. On peut passer maintenant à la passivation comme décrit dans le paragraphe suivant.

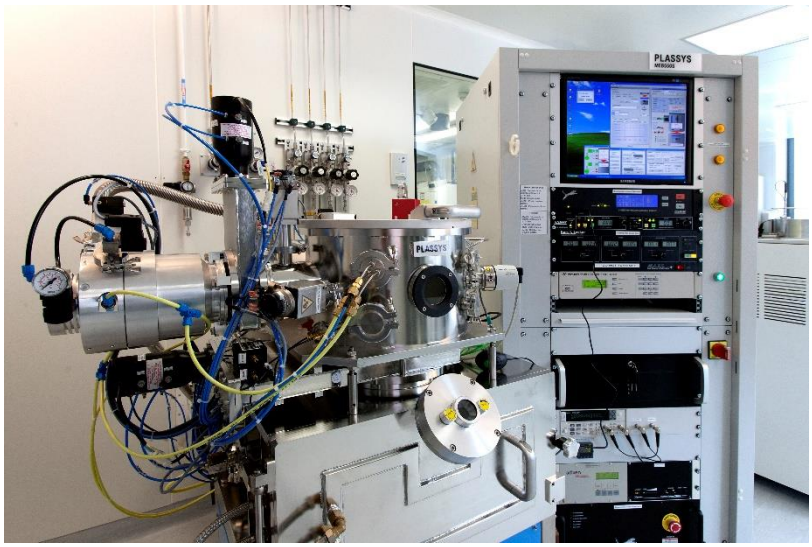


Figure 41. Photographie du bâti de dépôt par évaporation. « Evaporateur Plassys de Paris7 »

V.2.3 Passivation

A la fin de la fabrication, il est nécessaire de protéger les dispositifs contre les impuretés, les molécules d'eau dans l'air ambiant et de stabiliser les caractéristiques électriques. Dans mes expériences je n'ai jamais obtenu de point de Dirac dans la fenêtre $|V_g| \leq 200V$ quand la puce n'est pas passivée. Dans nos applications de biodétection, nos analyses porteront sur la sensibilité de ce point caractéristique. Un dispositif est d'autant plus sensible que si le graphène est moins dopé c'est-à-dire le point de Dirac proche de 0V [90]. Le choix de la nature et de l'épaisseur de l'oxyde dépend de sa résistance à l'électrolyte de mesure lors de la détection électronique (biocompatibilité) et de son étanchéité (stabilisation et sensibilité). Les technologies de dépôt de couches minces les plus couramment utilisées dans le domaine des microtechnologies sont: La pulvérisation cathodique, l'évaporation thermique et les dépôts par ALD ou PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition). Nous avons combiné deux types d'oxyde : L'oxyde d'aluminium Al_2O_3 déposé par ALD et l'oxyde de silicium déposé par PECVD.

V.2.3.1 Dépôt de Al_2O_3 par ALD

L'Atomic Layer Deposition (ALD) est un procédé de dépôt de couches minces atomiques. Le principe consiste à exposer successivement une surface à différents précurseurs chimiques afin d'obtenir des couches ultra-minces. Il est utilisé dans l'industrie des semi-conducteurs. L'énorme avantage de l'ALD est de pouvoir faire une monocouche sur une surface présentant un très fort rapport d'aspect (des creux et des bosses). Le dépôt d'alumine par ALD se fait de façon séquentielle et utilise comme précurseur le triméthylaluminium (TMA) et de l'eau pour l'oxydation [91]. La surface du substrat doit avoir des groupes hydroxyle (OH) pour amorcer la réaction. Le précurseur injecté (TMA) réagit avec les groupes hydroxyle selon l'équation suivante :

$$-OH + Al(CH_3)_3 \rightarrow (O)Al(CH_3)_2 + CH_4$$

Le gaz produit (CH_4) est évacué par purge. La vapeur d'eau est ensuite introduite dans la chambre de réaction et réagit avec les groupements ($-CH_3$) du produit de la première réaction selon la réaction suivante :

$$(O)Al(CH_3)_3 + 2H_2O \rightarrow (O)Al(OH)_2 + 2CH_4$$

La surface est saturée lorsque tous les groupes méthyles ont réagi. Les paramètres que nous avons utilisés lors de nos travaux sont : Température 175°C, Pression 300 mTorrs. Dans ces conditions la vitesse de dépôt est de 1Å/cycle.

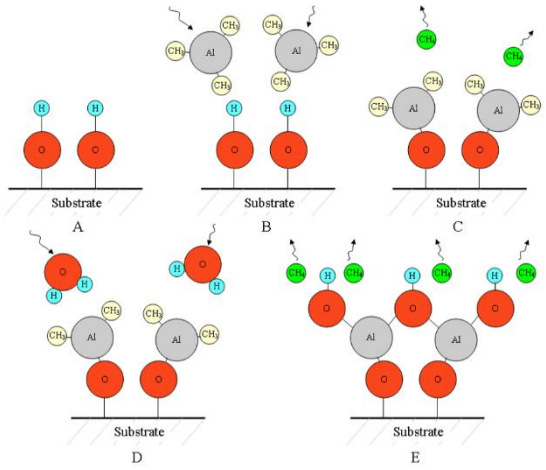


Figure 42. Mécanisme de dépôt de l'alumine par ALD. Image extrait de [138]

V.2.3.2 Dépôt de SiO_x par PECVD

J'ai fait tous mes dépôts de SiO_x à la salle blanche de Paris 7. Le dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD) nous permet de déposer des couches d'oxyde ou de nitrure de silicium (SiO_2 ou Si_3N_4). On peut déposer des couches allant de 10 à 4000nm par run, avec une vitesse de dépôt allant jusqu'à 100nm/min. Le réacteur est constitué d'un générateur RF de 300W à 13.56MHz ainsi que de lignes de gaz spécifique SiH_4, NH_3 et N_2O (SF_6 pour les nettoyages). Les températures de dépôts possible sont 150°C ou 280°C pour une taille maximale d'échantillon de 8 pouces (20cm). Pour mes passivations, je dépose 50nm de SiO_x à 280°C. Le dépôt nécessite les étapes suivantes :

-Heating: 1min, -Stabilization: 10s, - RF on : 5s, -RF match :5s, -Surface preparation: 10s, -Go to deposition: 5s, -Send SiH_4: 5s, -Deposition: 1min 53 s

Figure 43 ***Photographie du bâti de dépôt de SiO_x par PECVD de Paris7***

Une fois les deux couches de passivation déposées, elles sont gravées sur les plots de contact des drains et de la source pour pouvoir faire un contact électrique lors de la caractérisation. La photo ci-dessous montre les couches de passivation découpées (**Figure 44**).

V.2.3.3 Découpe de la couche de passivation

Il s'agit du découpage de la couche de passivation. On protège la zone active de la puce (le réseau des 48 transistors) et une grande partie des électrodes contre l'électrolyte de mesure et les impuretés.

a. Revêtement résine AZ5214E : 30 s @ 4000rpm
b. Recuit : 2mins @ 110°C
c. Exposition en utilisant le masque correspondant : Align and expose 15s
d. Développement : AZ 726 MIF, 35s, rinçage à l'eau DI 30s
e. Gravure de la couche de passivation : RIE, Programme SiO_2 6min, Gaz (O_2 et CHF_3), 10nbar
f. Lift-off : Acétone, 50°C, 15min, rinçage à l'IPA

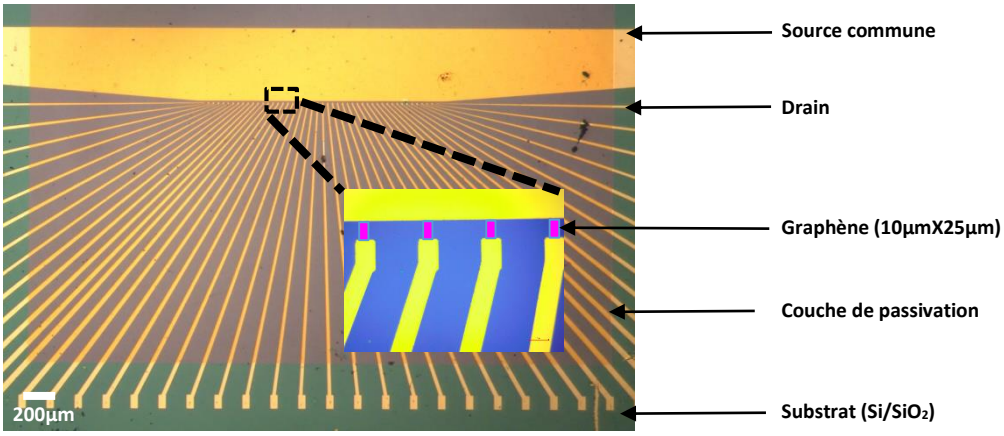


Figure 44. Photographie d'une puce après passivation. On voit les 48 drains individuels et la source commune qui connectent les canaux du graphène

V.3 Mesure électrique

Pour caractériser le réseau, nous avons besoin de deux générateurs de tension (Keithley 2400). L'un pour polariser le canal entre le drain et la source par une tension V_{DS}. Le choix de la valeur de cette tension dépend de la résistance de contact du transistor. Plus la résistance de contact est élevée, plus la polarisation est élevée pour se situer au-dessus des fluctuations thermiques. Ce générateur mesure le courant entre le drain et la source I_{DS}. Le second délivre la tension de grille entre la source commune et la grille ($P^{++}Si$). Le silicium dopé p fournit des porteurs de charges qui sont transportées par effet de champ crée par le diélectrique (1µm d'oxyde de silicium) entre le silicium ($P^{++}Si$) et la source. Le courant entre la source et la grille est quasi nul si nous sommes toujours dans les limites du champ de claquage de l'oxyde de silicium. Le deuxième sourcemètre est aussi utilisé pour détecter les courants de fuite à travers le diélectrique. Nous avions eu de gros soucis de fuite sur les substrats de 280nm d'oxyde qui avaient du moins le mérite d'offrir une bonne visibilité du graphène par contraste optique. Nous avons finalement utilisé des substrats de 1µm d'épaisseur d'oxyde pour éviter les fuites. Mais parfois nous avons des fuites à cause des traitements à la RIE et à l'acide phosphorique qui gravent légèrement l'oxyde lors de la nanofabrication. Avec une telle épaisseur, nos mesures sont faites de [-200V,200V] pour avoir un effet de champ élevé.

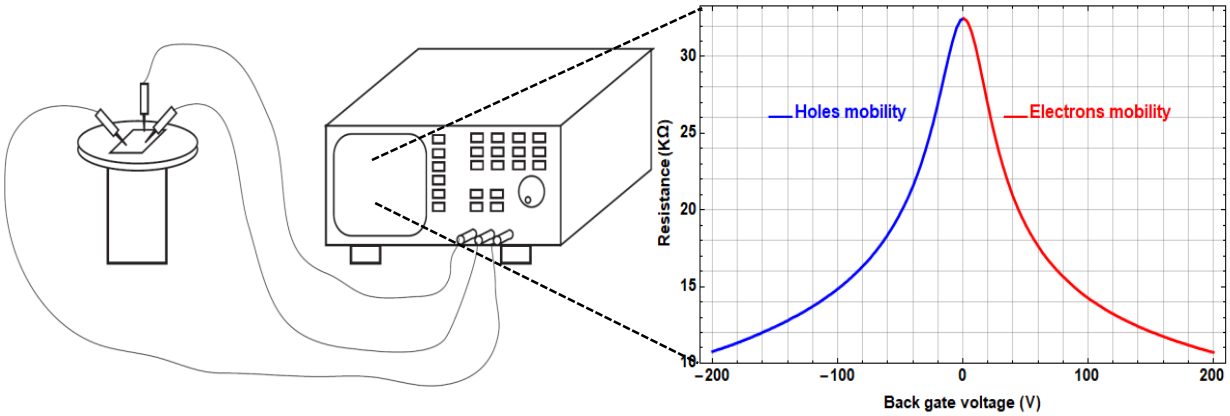


Figure 45. Schéma d'un montage électrique pour caractériser les transistors (à gauche) et une mesure typique montrant la dépendance en tension de grille de la résistance d'une feuille de graphène monocouche (à droite)

V.3.1 Types de dopage

Les propriétés électriques du graphène peuvent être fortement influencées par la présence de molécules adsorbées, induisant à la fois transfert de charge et dopage [92]. Le graphène obtenu par croissance CVD est généralement non dopé. Mais les techniques utilisées pour le transférer sur un substrat approprié et les produits utilisés lors des procédés de lithographie finissent par le doper p dans la majorité des cas. Pour un transistor dopé p, la tension au point de Dirac est positive, cette tension est négative pour un transistor dopé n. Ce dernier cas est moins fréquent sur nos puces. Sur le réseau représenté sur la **Figure 47**, seulement 4 transistors sont dopés n sur les 48. La figure suivante montre les deux situations. Nous faisons souvent un recuit pour réduire le niveau du dopage (voir V.4).

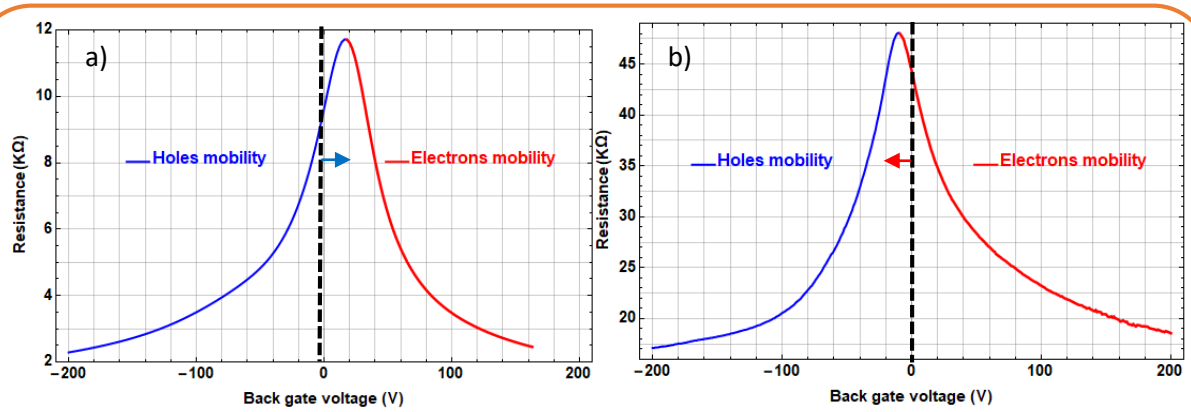


Figure 46 Dopage du graphène : a) Graphène dopé p V_{DP} >0V et b) graphène dopé n V_{DP} <OV

V.3.2 Le réseau

Nous avons imprimé sur la puce comme mentionné plus haut 48 transistors. Chaque transistor (L/W=2.5) est caractérisé par la résistance et la tension au point de Dirac et sa résistance de contact (R_{DP}, V_{DP} et R_c). Les valeurs des résistances de contact sont extraites lors la détermination de la mobilité. Les mesures sont souvent bruitées quand la résistance de contact est très élevée. Chaque transistor est repéré par son numéro et l'une des caractéristiques précitées. Pour la petite histoire, j'ai fabriqué plus de 250 puces au cours de ma thèse chacune servant de leçon pour améliorer la suivante. Sur ce

réseau, on peut voir que les résistances au point de Dirac et de contact sont homogènes mais la localisation du point de Dirac est très dispersée.

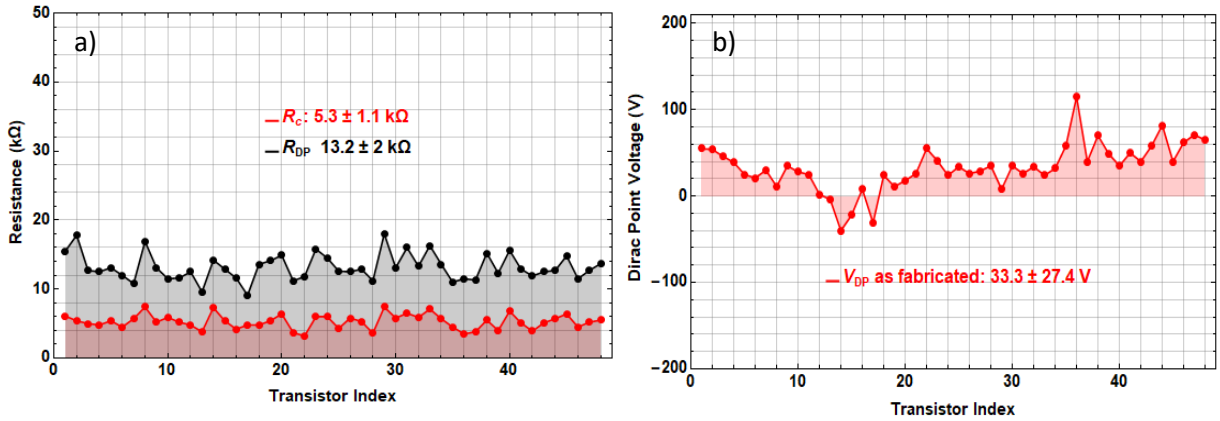


Figure 47. Réseau de 48 transistors repérés par leur résistance de contact R_c, la résistance au point de Dirac R_{DP} et la tension au point de Dirac V_{DP}.

V.3.2.1 Stabilisation des caractéristiques

Après la nature des couches de passivation (Alumine ALD et SiO_x PECVD) il faut déterminer l'épaisseur de chacune de ces couches qui permettra de stabiliser les transistors et d'avoir une meilleure sensibilité lors de la détection. Abhay A. et ses collaborateurs [93] ont réussi à stabiliser les transistors en déposant une première couche d'accroche de 2nm d'aluminium oxydé à 6.10^{-5} Torr avant de passiver avec 90nm Al_2O_3 (ALD). Nous avons essayé plusieurs combinaisons. Une passivation directe avec 40nm Al_2O_3 (ALD) présente de violentes dérives temporaires et est en plus vite détruit par l'électrolyte lors de la détection électronique. **Figure 48**c. On obtient des décalages du point de Dirac vers des tensions de grille positives. Ce décalage est d'autant plus rapide qu'on ne peut pas mesurer tout le réseau avant de perdre le point de Dirac de certains transistors (au-delà de 200V). Les autres combinaisons sont représentées dans le tableau suivant. En outre nous avons essayé une passivation directe avec l'oxyde de silicium (PECVD) et on s'est rendu compte que tous les transistors ne marchaient plus après la passivation. Nous avons finalement réussi à stabiliser les réseau avec une combinaison de 40nm Al_2O_3 (ALD) et 50nm SiO_x (PECVD).**Figure 48**d.

	10nm Al_2O_3+ 100nm SiO_x	20nm Al_2O_3+ 50nm SiO_x
Mesure initiale : V_{DP}(V)	19.7±45.7	31.2±32.2
Après une semaine : V_{DP}(V)	51.3±32.2	41.2±30.8

Le tableau ci-dessus résume deux autres combinaisons de passivation. L'une avec 10nm Al_2O_3+ 100nm SiO_x où on voit qu'au bout d'une semaine les positions du point de Dirac dérivent de 20V en moyenne. Les dérives sont réduites de moitié avec une passivation de 20nm Al_2O_3+ 50nm SiO_x.

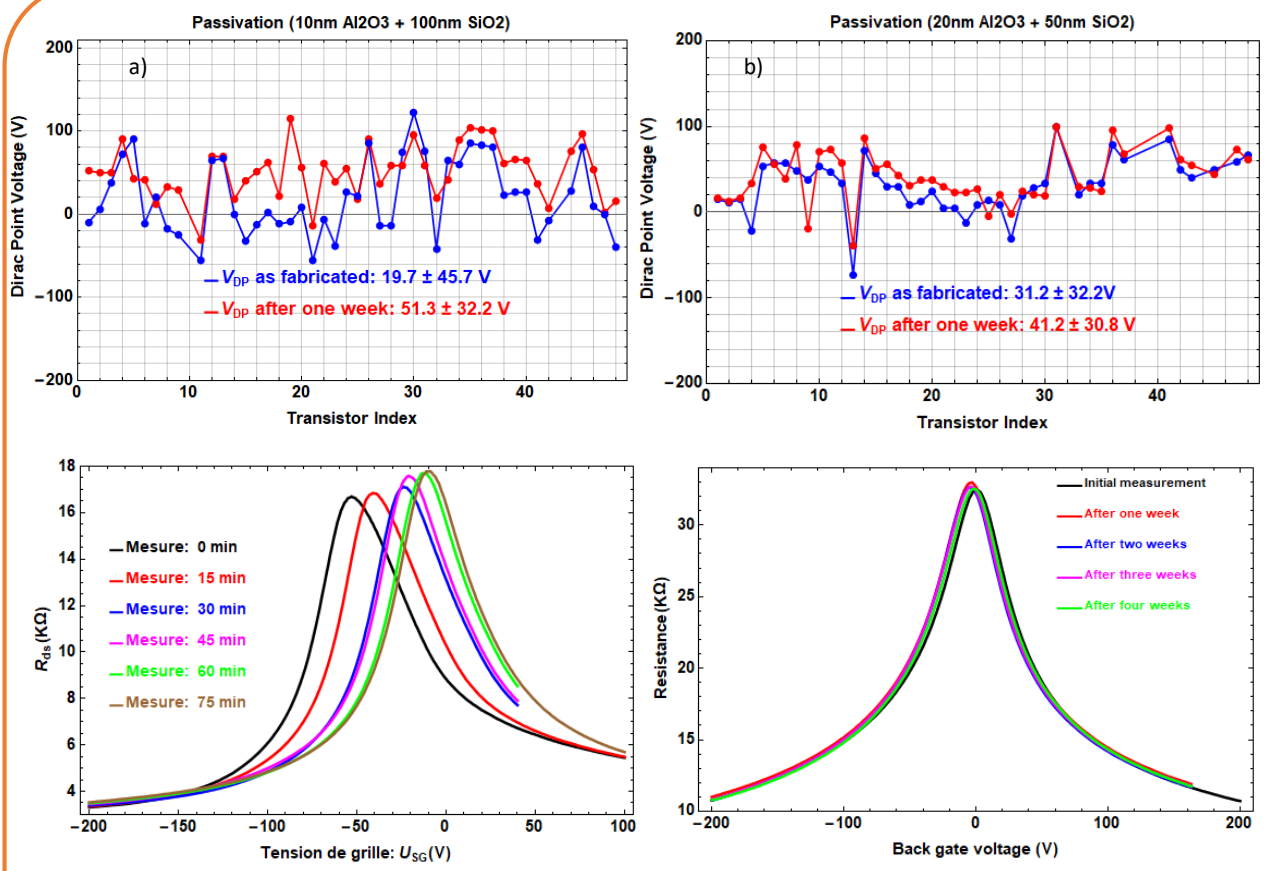


Figure 48 a) Passivation avec 10nm Al_2O_3 + 100nm SiO_x, b) Passivation avec 20nm Al_2O_3 + 50nm SiO_x, c) Passivation 40nm Al_2O_3 d) et passivation 40nm Al_2O_3 + 50nm SiO_x

V.3.2.2 Transport électronique dans le graphène

Le graphène transféré est équipé d'une grille métallique qui permet de réaliser un effet de champ électrique et le doper. Le graphène est posé sur un substrat en silicium. En réalité sous la feuille du graphène se trouve 1µm d'oxyde de silicium qui est un isolant, avant d'accéder au silicium proprement dit. Celui-ci est très fortement dopé (chimiquement) pour le rendre métallique. Si on applique une différence de potentiel entre le silicium dopé (la grille arrière) et la feuille de graphène (la source), on réalise un condensateur dont le diélectrique est le dioxyde de silicium. Par effet de champ électrique, en réglant la différence de potentiel, on peut ajouter ou enlever les électrons au graphène. Comme le graphène non dopé ne comporte pas de porteurs de charge, on dispose alors d'un « bouton » extérieur pour contrôler électriquement le dopage en porteurs de charge. En changeant le signe de la différence de potentiel, on peut passer continûment d'un dopage en électrons à un dopage en trous. Ainsi pour une tension de grille positive la mobilité est assurée par les électrons et les trous assument la conductivité pour une tension de grille négative.

V.3.2.3 Mobilité

L'une des qualités exceptionnelles du graphène est la grande mobilité des porteurs de charge. Cette mobilité peut être altérée par les phénomènes de diffusion par les impuretés adsorbées sur la feuille du graphène et les interaction des phonons du substrat. La mobilité n'a de sens que si la densité d'impuretés induites est précisée. La résistance totale du canal du transistor est décrite par l'équation (1). L'estimation de la mobilité des transistors se fait en minimisant l'écart quadratique moyen entre les données expérimentales (en noir) et la formule théorique (en rouge) (Equation 1) qui décrit la résistance totale du canal. Les paramètres du fit sont la mobilité (µ), la résistance de contact ($R_{contact}$) et la

densité d'impureté induite n_0. La mobilité des porteurs de charge pour ce transistor est estimée d'environ 3732.5 $cm^2 V^{-1} s^{-1}$. Cette valeur est cohérente par rapport à celles rapportées dans la littérature pour des dispositifs fabriqués en utilisant du graphène Cu-CVD:
[1-16].$10^3 cm^2.V^{-1}s^{-1}$

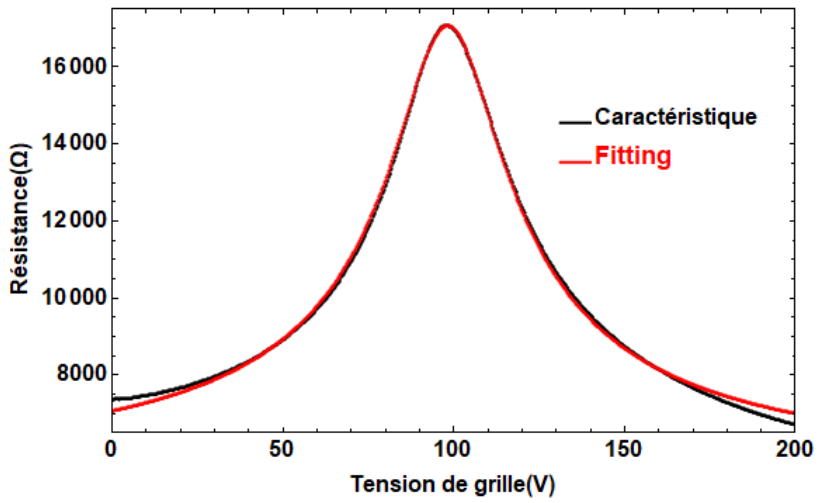


Figure 49 Extraction de la mobilité. En noir la mesure expérimentale et en rouge l'ajustement théorique.

$$R_{total} = R_{contact} + \frac{L}{W}\frac{1}{\mu e\sqrt{n_0^2 + (\frac{C_g(V_g - V_{dp})}{e})^2}} \qquad [94] \qquad (1)$$

V_{dp} = 98.2V: Tension au point de Dirac.
C_g = 34.5 10^{-10}F. cm^{-2} : Capacité de l'oxyde de grille
n_0 = 3.5 10^{11}. cm^{-2} : Densité de charge des impuretés.
L = 25µm: Longueur du canal
W = 10µm: Largeur du canal
µ = 3732.5 cm^2/Vs : Mobilité des porteurs de charge

$R_{contact}$ = 5110Ω

$n = \frac{C_g}{e}(V_g - V_{dp})$: densité de charge induite par la grille.

Pour V_g= 0V i.e., $n_0 = -\frac{C_g}{e}V_{dp}$, pour le graphène intrinsèque, n_0 = 0 i.e., V_{dp}=0.

Si $V_g \leq \boldsymbol{V_{dp}}$, conduction par les trous.

Si $V_g \geq \boldsymbol{V_{dp}}$, conduction par les électrons.

V.3.2.4 Mesure d'hystérèse

L'hystérésis des transistors à base du graphène se manifeste par des changements dans la position de la résistance maximale (pic de Dirac) du graphène lorsque la direction du balayage de la tension de grille change. Ce phénomène a été attribué aux molécules d'eau adsorbées sur le substrat ou sur la

feuille de graphène [95]. En effet, la configuration des dipôles H_2O change lors du balayage de la tension de grille et influe sur la position du pic de Dirac. P Joshi et al. [96] explique que l'apparition de l'hystérésis dans les caractéristiques des transistors à base de graphène et de nanotubes de carbone est due à la présence des groupements silanol (Si-OH) à l'interface du substrat (SiO_2) et le graphène et que ceci disparait avec un recuit sous vide (300°C à 2 10^{-7} mTorr) pendant 1 heure. Nos transistors montrent une très faible hystérésis après passivation. Ceci peut s'expliquer par le temps de séjour dans le bâti de l'ALD (175°C, 300 mTorr, pendant 4 heures) lors du dépôt de l'alumine et quelques minutes dans le bâti du PECVD (280°C). Sur la **Figure** 50, nous avons fait la mesure directe (en noir, de -200V à 200V) et indirecte (en rouge, de 200V à -200V) sur un transistor. La moyenne d'écart entre les deux mesures est de 0 .013KΩ ce qui est négligeable. On observera la même chose sur les autres transistors du réseau caractérisés.

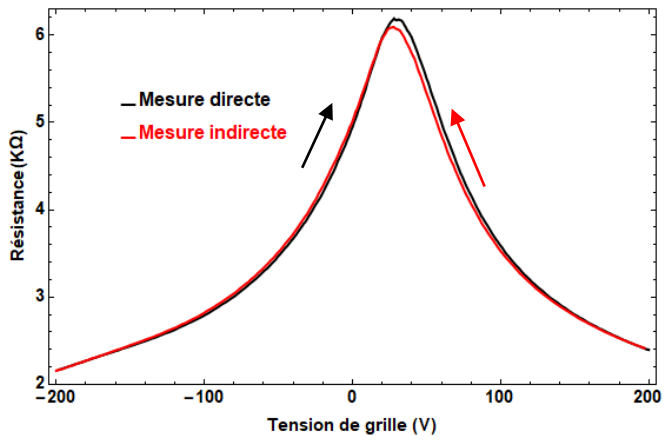


Figure 50. Mesure d'hystérèse, en noir mesure de -200V à 200V et en rouge la mesure dans le sens opposé. V_{ds}= 0.2V

V.4 Effet du recuit

Les techniques de transfert du graphène obtenu par la croissance CVD et les différentes étapes de lithographie optique lors de la fabrication des transistors l'expose à plusieurs solutions dopantes, en premier l'acide utilisé pour dissoudre le cuivre lors du transfert. Bien que rincé plusieurs fois le graphène reste tout de même légèrement dopé à cause des traces d'acide. Même si on réussit à protéger efficacement le graphène lors des séries de lithographie, on observe souvent que le graphène est légèrement dopé en trous. Ceci peut être dû au reste d'acide peroxodisulfurique utilisé pour retirer le support métallique (Cu) et la présence de résidus organiques sur le substrat avant le transfert. Pour réduire le dopage après la nanofabrication, on peut faire un recuit de l'échantillon sous vide à haute température. Ceci permet d'évaporer les molécules d'eau piégées à l'interface du graphène et du substrat d'une part et d'autre part entre le graphène et la couche de passivation. Un four a été fabriqué à cet effet par l'équipe mécanique de Pascal Morfin à l'Ecole Normale Supérieure. Les premiers résultats sont encourageants. Nous avons fabriqué un réseau qui a été fortement dopé pour lequel le point de Dirac des transistors est au-delà de 100V. Cet échantillon est introduit dans le bâti du four pendant une journée pour faire un vide au tour de 5. 10^{-6} mbar. On augmente alors la tension d'alimentation de la LED ce qui permet de chauffer par effet joule l'enceinte où est placé l'échantillon **Figure 51**. On peut alors monter la température jusqu'à 280°C pour une tension d'alimentation de 36V. Le recuit commence une fois que la température souhaitée est atteinte(**Figure 54**). Sur le réseau représenté à la **Figure 52**, nous avons fait une recuit de 48 heures à 280°C. Une mesure avant (en noir) et après (en

rouge) le recuit nous permet de voir une nette diminution du niveau de dopage et une amélioration de la mobilité des transistors sans toutefois affecter les résistances de contact. L'idée de base de ce projet était de faire des mesures en temps réel lors du recuit mais les fils électriques et les soudures dans le four sont détruits à haute température.

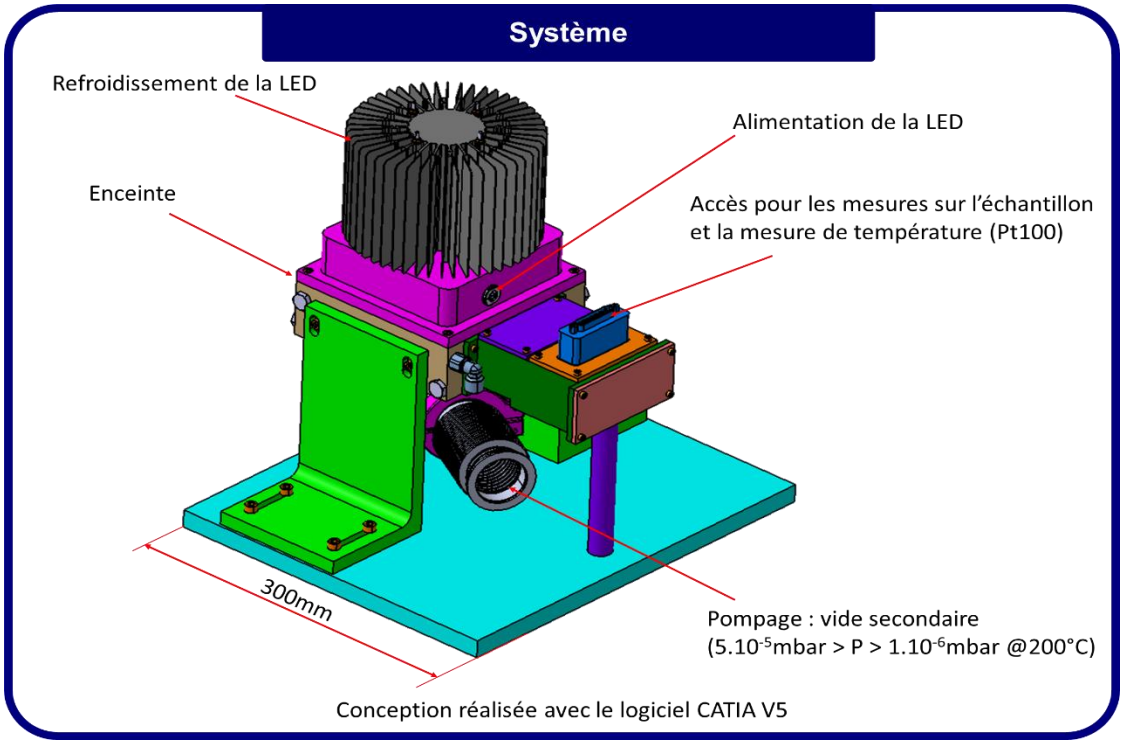


Figure 51 Design du mini four conçu pour le recuit des échantillons

Le projet reste en réflexion actuellement par Anne Denis et Claude Dodray pour trouver les matériaux adaptés.

Il est très important de ramener le point de Dirac proche de 0V (c'est-à-dire) rendre le graphène intrinsèque car lors de la détection électronique nous somme limité par les phénomènes électrochimiques qui apparaissent au-delà de [-1V,1V] d'où la nécessité de soit bien protéger le graphène ou bien faire un recuit au cas où la protection n'a pas été efficace lors de la fabrication.

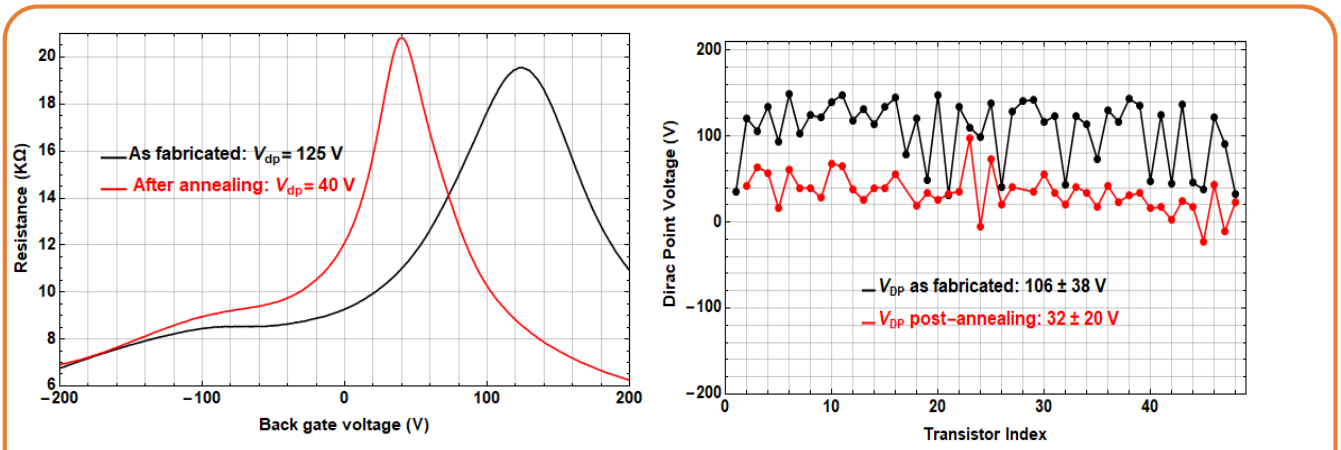


Figure 52. Mesure avant (en noir) et après le recuit (en rouge) d'un transistor individuel à gauche et de l'ensemble du réseau à droite.

V.4.1 Effet du recuit sur les contacts : contact Cr/Au et contact Ti/Au

Le choix du métal pour établir le contact électrique avec le graphène se fait en fonction de son travail de sortie. Plus le travail de sortie de métal est proche de celui du graphène plus il est facile de former un contact ohmique. Le travail de sortie du graphène, Ti, Cr et Ni sont 4.5 eV, 4.3 eV, 4.6 eV et 5.2 eV respectivement. Ces métaux sont tous de bon candidats pour établir de bon contact [97].

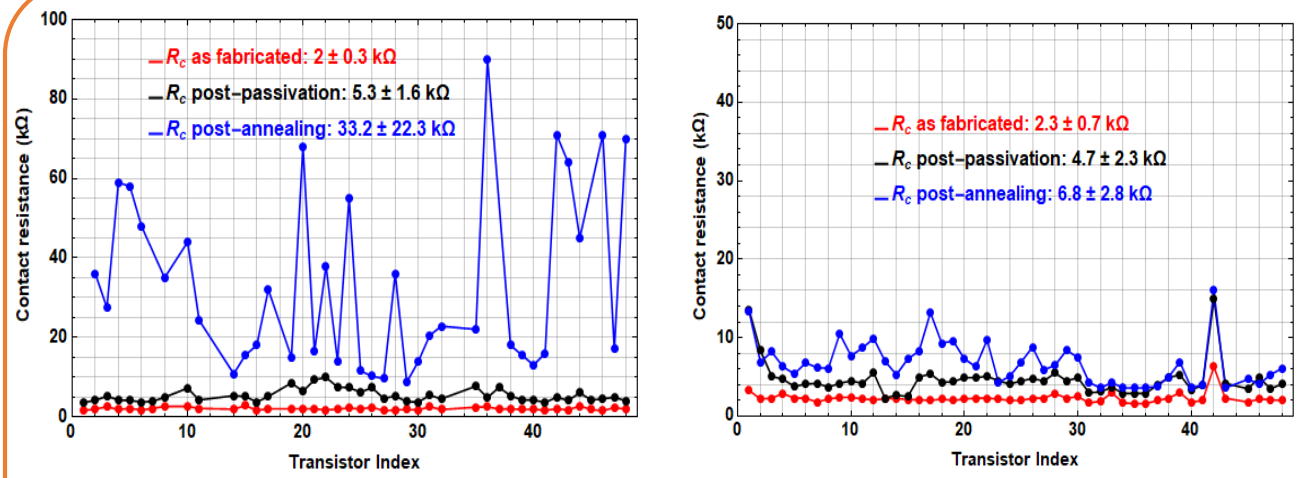


Figure 53. Etude comparative des contacts en Cr/Au à gauche et Ti/Au à droite. On peut remarquer que la valeur de la résistance de contact est 16 fois plus grande après le recuit quand on utilise les électrodes en Cr/Au avec une perte de 10% des transistors initialement qui marchaient alors qu'avec les électrodes en Ti/Au on assiste à une augmentation de lors de 3 fois la valeur initiale des résistances de contacte et tous les transistors marchent après le recuit

Si le recuit nous permet de réduire le dopage du graphène et améliorer la mobilité des transistors, il n'est pas sans effet sur les contacts. On remarque souvent la dégradation des contacts (entre le graphène et les électrodes) entrainant une augmentation de la résistance de contact après le recuit. Ceci peut parfois faire perdre certains transistors si cette dégradation est trop prononcée. Cela se produit souvent quand les électrodes sont faites en Cr/Au. Nous avons essayé d'autres types de matériaux et le problème semble être résolu si on utilise des contacts en Ti/Au. Une étude comparative des deux types de contact a été faite sur la **Figure 53**. La figure ci-dessous montre le profil de l'évolution de la température lors du recuit.

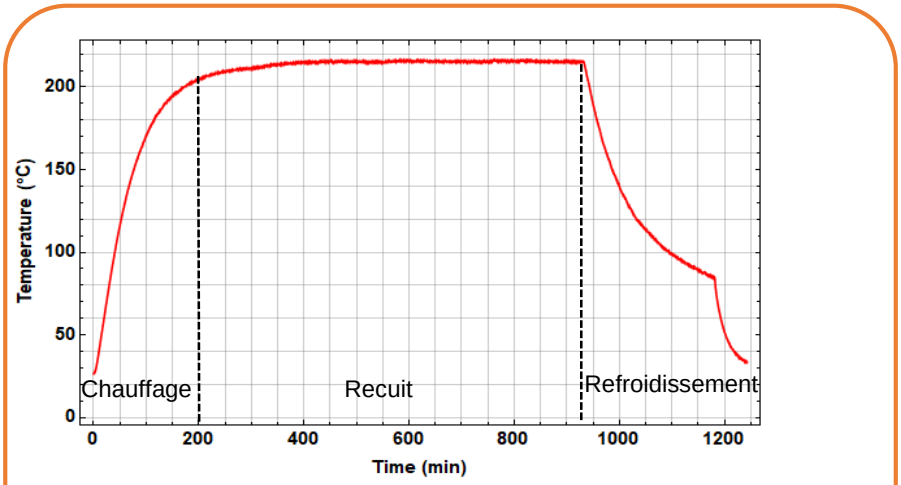


Figure 54 Profil de l'évolution de la température lors d'un recuit

V.5 Bonding manuelle de la puce

Une fois les mesures de caractérisation faites, on passe au câblage de la puce dans un connecteur en céramique. La puce est collée dans le connecteur à l'aide du PMMA chauffé pendant 5 minutes et l'ensemble monté sur la machine de bonding manuelle. La machine est dotée d'une souris multifonctions dont principalement deux :

- Contrôle du cycle de soudure : La 1ere soudure et la 2eme soudure
- Positionnement fin d'une soudure sur un pad.

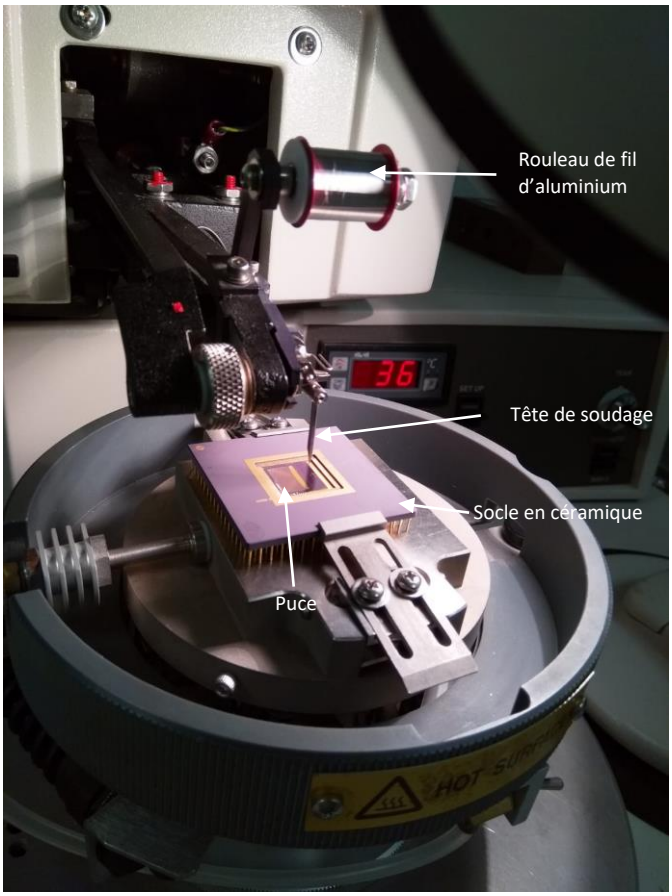


Figure 55 : Photographie de la machine de bonding manuelle « Ball & Wedge bonding antycip Technologies »

Le modèle ***« Wedge »*** est utilisé avec du fil d'aluminium, du fil d'or et du ruban. Il est particulièrement approprié pour des applications de haute qualité nécessitant un contrôle précis de la longueur du fil et de la formation de la boucle. La machine permet un contrôle individuel des paramètres de bonding et de la formation de la boucle, avec la possibilité d'utiliser une grande variété de type de fils.

Principales caractéristiques

Diamètre du fil :

- Or : 12,7 - 75 µm
- Aluminium : 17 - 75 µm

Surface de bonding : 134 mm x 134 mm (5.3" x 5.3")

Déplacement de la table: 140mm

Déplacement en Z : Motorisé, DC servo avec contrôle LVDT sur 12,7mm

Ensemble Ultrasonique avec transducer High Q 60 kHz, puissance 2,5W

Temps de bonding : 2 gammes 10 - 100 ms et 10 - 1000 ms

Force d'appui : 10 - 160 grammes

Modes de cablage: Semi-Auto, Manual Z, Stitch, Lange Coupler, Table Tear

Les potentiomètres qui définissent les paramètres de soudage sont les suivants :

SEARCH : Commande la hauteur d'approche de la tête de soudage

FORCE : Commande la force exercée par la tête de soudage au cours de la soudure

TIME : Commande la durée d'application de l'énergie ultrasonique et de la force de soudage

POWER : Commande le niveau d'énergie ultrasonique. Une plus grande puissance accroît les vibrations ultrasoniques du bout de l'outil.

LOOP : Définit la hauteur de remontée de la tête de soudage après la première soudure.

TAIL : Définit la longueur de la queue (TAIL) restante après la deuxième soudure

Le tableau ci-dessous résume les paramètres que j'utilise habituellement pour les bondings

Première soudure				Deuxième soudure					
Search	Power	Time	Force	Search	Power	Time	Force	Loop	Tail
3	4	5	3.5	3	4	5	7	3	9

V.6 Conclusion du chapitre

Nous avons développé des procédés de fabrication d'un réseau de 48 transistors à base de graphène Cu-CVD sur un substrat SiO_2. Le grand nombre de transistors et les applications prévues nous ont imposé un transfert de qualité et une protection efficace du graphène lors des différentes étapes de lithographie. Des techniques originales ont été développées pour fabriquer des réseaux homogènes avec un faible niveau de dopage du graphène. Nous avons réussi à stabiliser les caractéristiques avec une combinaison de couches de passivation biocompatible et permettant une bonne sensibilité des biocapteurs avec des épaisseurs bien choisies.

Après le bonding, un puits en plastique est monté sur l'ensemble puce-connecteur en céramique afin de contenir l'électrolyte pour des applications de détection électronique. Le chapitre suivant nous en dira plus…. !

VI Chapitre 6 : Détections électroniques avec des réseaux de GFETs

Dans la configuration où les porteurs de charge crées par effet de champ sont fournis par le silicium dopé jouant le rôle de grille métallique, nous avons pu moduler la tension de grille de [-200V,200V] vu que l'épaisseur du diélectrique (oxyde de silicium) est assez grande, pour se permettre d'appliquer une haute tension. Le dopage du graphène est alors contrôlé par les trous et les électrons crées par effet de champ à partir du silicium. Les propriétés physico-chimiques sont dans cette situation assez stables et n'affectent pas le comportement du graphène d'une mesure à une autre si la stabilisation des caractéristiques est bien faite. Nous pouvons aussi inverser les choses en utilisant la couche de passivation (40 nm Al_2O_3 déposé par ALD et 50nm SiO_x déposé par PECVD) comme diélectrique et un électrolyte déposé dessus jouant le rôle de la grille qui fournit les ions pour contrôler le dopage du graphène. Dans ce cas on peut facilement modifier les propriétés de l'électrolyte et voir comment se comporte le graphène en conséquence. Ainsi pourrons nous changer la nature des ions de l'électrolyte, sa concentration, son pH et voire même modifier la densité de charge à l'interface électrolyte-couche de passivation par dépôt local des molécules chargées comme une solution d'ADN (apport de charge négative) ou une solution de poly-L-Lysine (chargée positivement). Nous avons pu observer le shift du point de Dirac en changeant certaines propriétés de l'électrolyte. Ces observations trouvent leur explication dans les phénomènes de formation de la double couche quand on plonge un solide dans un électrolyte et d'autres sont dues au changement de la densité surfacique de charge.

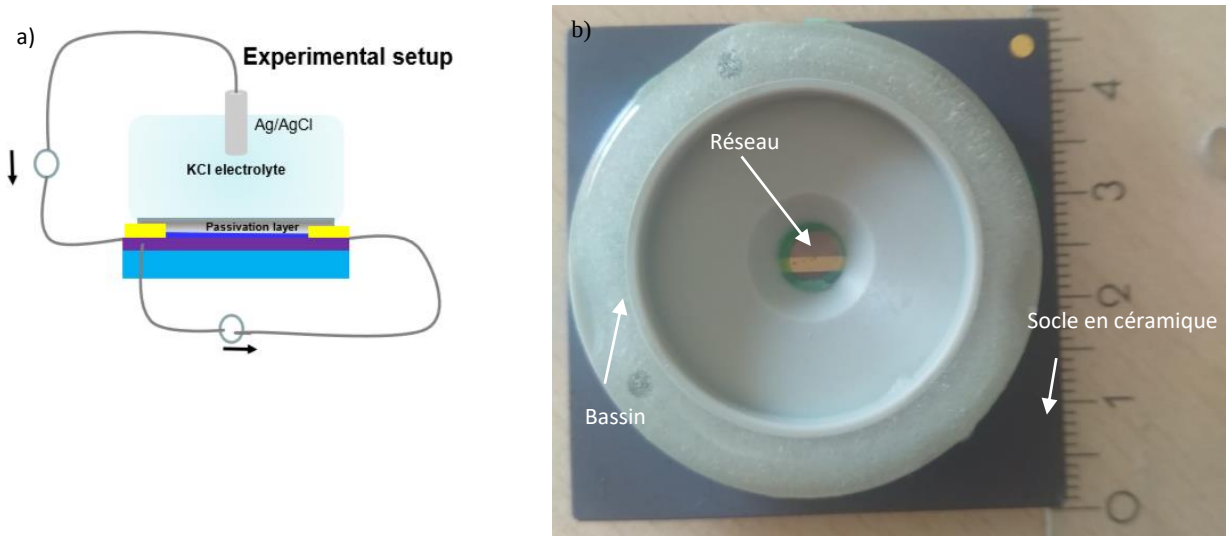


Figure 56 a)Dispositif expérimental de mesure montrant les différentes tensions appliquées à un transistor, b) Photographie d'une puce sur laquelle a été imprimés 48 transistors à effet de champ à base du graphène. La puce est collée sur un socle céramique et un bassin plexiglass permet de déposer un électrolyte de mesure.

VI.1 Description du dispositif expérimental

Le dispositif expérimental de mesure est schématiquement représenté sur la **Figure 57**. L'électronique de mesure est la même pour tous les transistors du réseau. Un premier étage permet de polariser un transistor unique et de mesurer le courant source-drain correspondant. La mesure de l'ensemble du réseau est assurée par multiplexage via des unités de commutations qui permettent de mesurer chaque transistor l'un après l'autre.

Le premier étage permet de mesurer la caractéristique $I_{DS}(U_{SE}, U_{SD})$ pour un transistor donné. Les tensions de polarisation U_{SE} et U_{SD} sont générées par une carte digitale/analogique (PCI 6052E) et sont filtrées à l'entrée du premier étage de la carte électronique pour diminuer le bruit induit par l'environnement du PC. Le circuit analogique possède un différenciateur qui permet de référencer les potentiels du drain et de la source par rapport à celui de l'électrode (on impose respectivement la tension U_{SE} à la source et la tension U_{DE} au drain). Le courant de drain est converti en tension par un convertisseur courant-tension et est mesuré par une voie analogique/digitale de la carte PCI utilisée pour générer les tensions d'entrée (PCI 6052E).

Au niveau du second étage du dispositif de mesure, un support PGA à force d'insertion nulle permet d'enficher et de connecter les réseaux de transistors. Cet étage possède un ensemble de commutateurs mécaniques et analogiques permettant d'adresser successivement l'ensemble des 48 transistors de chaque réseau. Les opérations de commutation sont contrôlées par des voies digitales d'une seconde carte PCI (PCI 6503). Le réseau ainsi que le second étage de mesure sont placés dans un boîtier métallique assurant une isolation électronique et lumineuse de l'échantillon à mesurer.

L'acquisition des caractéristiques $I_{DS}(U_{SE}, U_{SD})$ associées à chaque transistor du réseau est contrôlée par un programme écrit sous l'environnement LabWindows CVI. Ce programme génère des rampes de tension pour U_{SE} et U_{SD}. A chaque point de polarisation, c'est-à-dire pour chaque couple de tension U_{SE} et U_{SD} le courant source-drain mesuré est moyenné sur une durée d'environ 3 ms (1000 points de mesure). Lorsque l'ensemble des caractéristiques a été enregistré pour un transistor donné, on passe au transistor suivant en contrôlant le multiplexeur. Le temps de mesure complet du réseau dépend de la densité de points de polarisation souhaitée, typiquement entre 5 et 15 minutes [98].

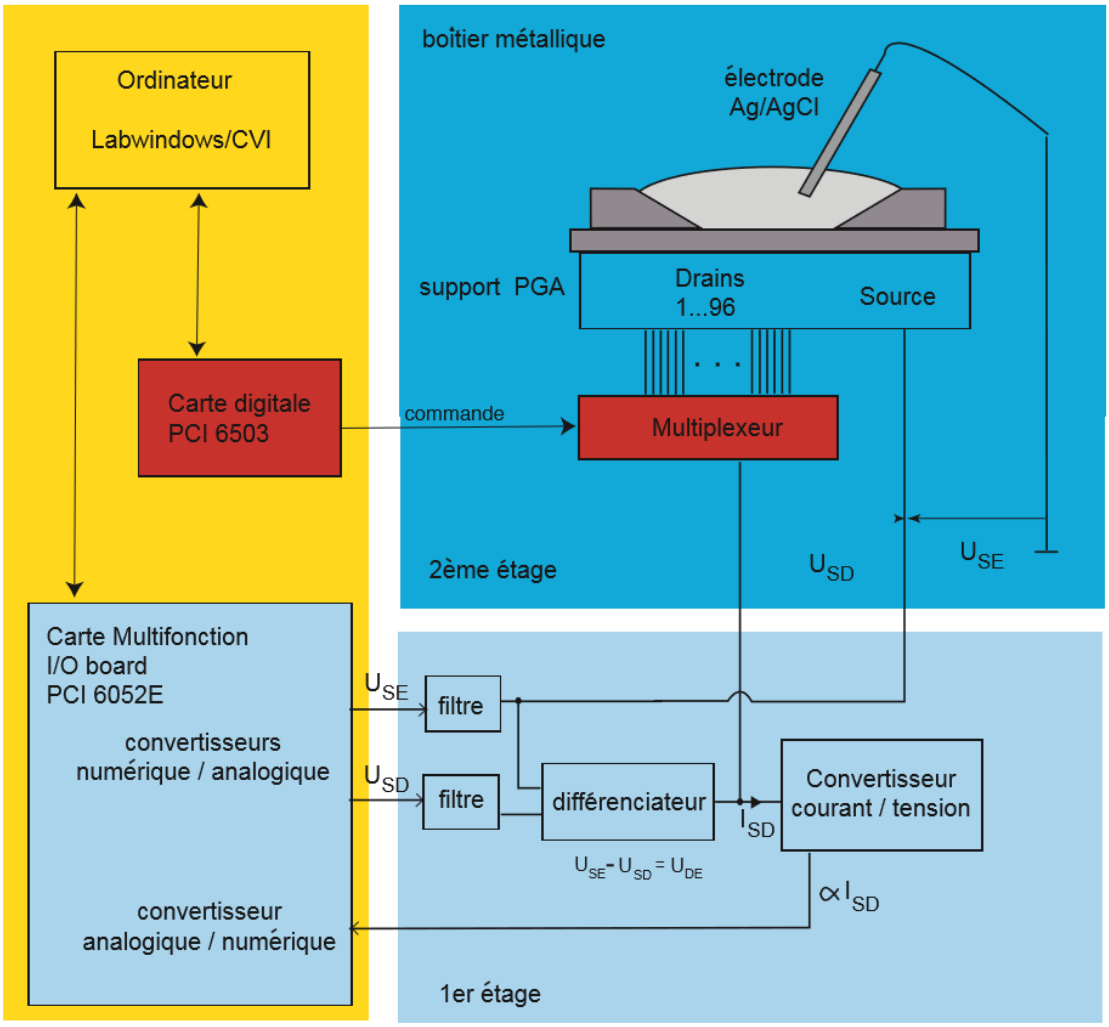


Figure 57 Dispositif expérimental de caractérisation du réseau de transistors

VI.1.1 Allure des caractéristiques courant-tension d'un transistor à base de graphène

Les données I_{DS}= f(U_{SE}, $U_{DS} = cste$) et I_{DS}= f(U_{DS}, $U_{SE} = cste$) obtenues lors d'une acquisition de données d'un transistor du réseau sont représentées sur la **Figure 58**. Les caractéristiques I_{DS}= f(U_{SE}, $U_{DS} = cste$) ont une forme en « V ». On observe une courbe de transfert bipolaire correspondant à différents types de porteurs de charge changeant continûment des trous (à gauche) aux électrons (à droite) en passant par un minimum de courant appelé point de Dirac. Ce point est très sensible aux apports de charges dans le graphène. Pour un graphène intrinsèque, le minimum de courant est nul au point de Dirac. Mais en pratique, ce courant n'est pas nul car le graphène reste toujours dopé à cause des impuretés organiques, les techniques de transfert, la protection inefficace lors de la nanofabrication etc…. La caractéristique I_{DS}= f(U_{DS}, $U_{SE} = cste$) au point de Dirac montre un comportement ohmique alors que la tension au point de Dirac ne change suivant les différentes valeurs de V_{DS}. Nous allons focaliser nos analyses sur les décalages en tension de ce point dans nos prochaines expériences.

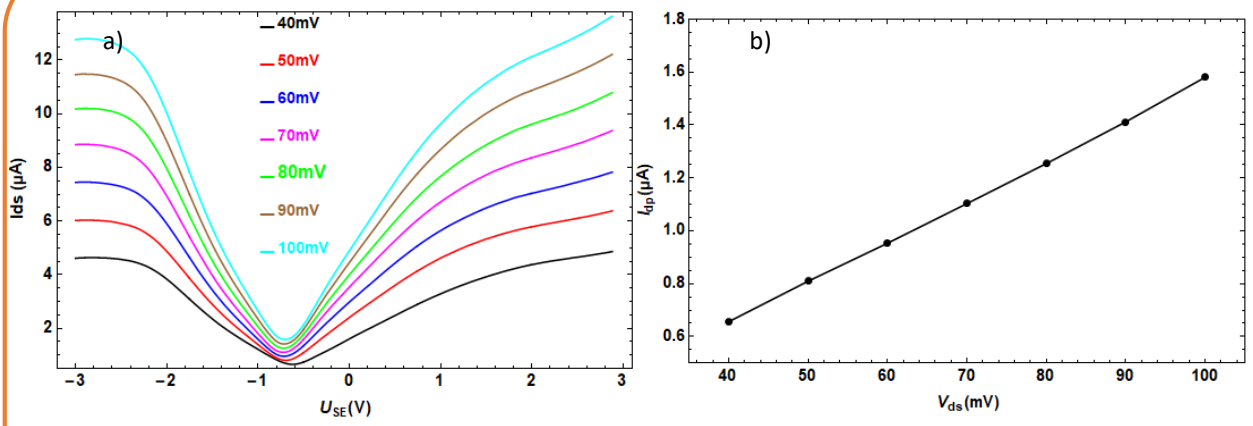


Figure 58 a) Caractéristiques courent-tension d'un transistor à effet de champ à base du graphène dont le dopage du graphène est contrôlé par un électrolyte [KCl]=25mM. La tension au point de Dirac V_{DP} reste constante en fonction du V_{DS} alors que le courant en ce point montre un comportement ohmique.

VI.1.2 Dérives temporelles dans le réseau

Bien que la puce soit fabriquée dans les mêmes conditions et à partir d'une même feuille de graphène, les transistors d'un même réseau présentent une grande inhomogénéité non seulement sur la position du point de Dirac mais aussi dans leur comportement suite à une série de mesures à intervalle de temps régulier. Nous avons réussi à stabiliser les caractéristiques dans les expériences de mesures à sec, mais parfois les dérives apparaissent lorsqu'on se place dans les conditions humides. Certaines dérives s'expliquent par le choix des paramètres de mesure tels que le temps d'acquisition des données et le temps de relais d'un transistor à un autre. Ce type de dérives est maitrisé une fois que ces paramètres sont bien fixés. Par ailleurs, Shu-Kai Hu et al. [99] expliquent que ces dérives sont dues à l'accumulation d'une couche d'eau entre le graphène et le substrat. On arrive à la stabilisation une fois qu'une certaine hauteur d'eau est atteinte (à partir de 2.3nm). Dans notre cas, cela peut s'expliquer. Si la couche de passivation n'est pas assez étanche, l'eau peut s'infiltrer et s'accumuler à l'interface du graphène-couche de passivation et produire les dérives. Sur la **Figure 59**, le transistor (FET1) est un exemple de cas typique. On voit des dérives en courant et en tension au point de Dirac. Ces dérives persistent au-delà de 12 minutes et ne semblent pas se stabiliser. Le transistor (FET2) semble se stabiliser au bout de 9 minutes de mesure. Le FET3 ne présente pas de dérive temporelle lors de toute l'expérience. Par contre le stabilité du FET4 n'est pas un bon signe. Ces genres de dispositifs sont généralement insensibles mêmes aux apports de charges sur la puce. Il est important de caractériser les dérives de chaque transistor avant toute mesure de détection. Des dérives mal maitrisées peuvent augmenter ou diminuer l'intensité du signal détecté selon que ces dernières vont dans le même sens ou dans le sens contraire du décalage induit par un apport de charges. Si les dérives sont bien caractérisées, on peut corriger les données après les mesures.

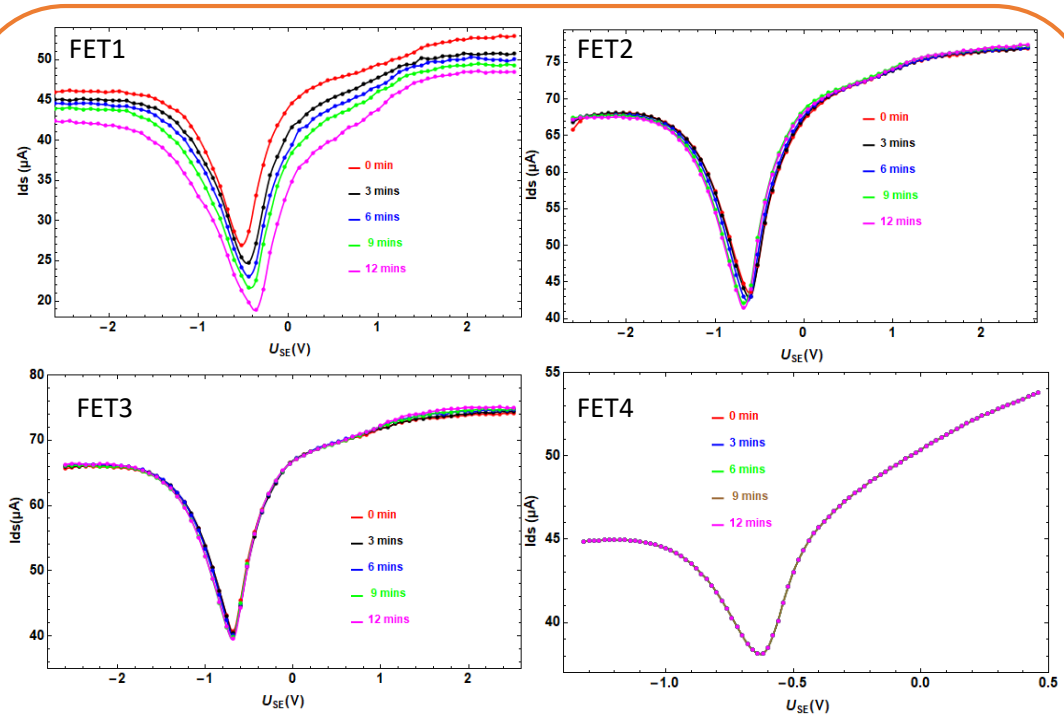


Figure 59 Exemples de cas de dérives temporels observés sur un même réseau. Des dispositifs instables (FET1), dont les dérives ne s'arrêtent ou ne tendent pas à disparaitre. Le FET2 devient stable au bout de quelques mesures. Le FET3 est stable au cours de toute l'expérience. Le FET4 semble insensible à tout instant. [KCl]= 25mM, V_{DS}= 0.8V

VI.1.3 Formation de la double couche

Lorsqu'un métal est en contact avec un électrolyte, on observe une séparation des charges électriques. Leur distribution à l'interface dépend alors en plus de l'adsorption de molécules d'eau ou de cations hydratés ainsi que de l'adsorption chimique d'anions à la surface du métal. Suivant le potentiel éventuellement appliqué, la charge du métal peut être positive ou négative par rapport à celle de l'électrolyte. La formation de la double couche a été expliqué par 3 modèles (Figure60).

a) Helmholtz, à l'origine de la découverte des doubles couches électriques, a supposé que

tous les ions étaient spécifiquement adsorbés sur la surface de l'électrode et modélisait donc la double couche électrique à l'aide d'un simple condensateur à plaques parallèles [100].

b) Le modèle de Gouy-Chapman est un modèle à double couche électrique diffuse, qui prend

en compte le fait que les ions sont soumis à des forces de diffusion et électrostatiques au sein de l'électrolyte.

c) Le modèle de Gouy-Chapman-Stern combine les deux modèles précédents pour permettre

une couche d'ions spécifiquement adsorbés ainsi qu'une région de diffusion. La Figure60 décrit les trois modèles de double couche électrique différents [101].

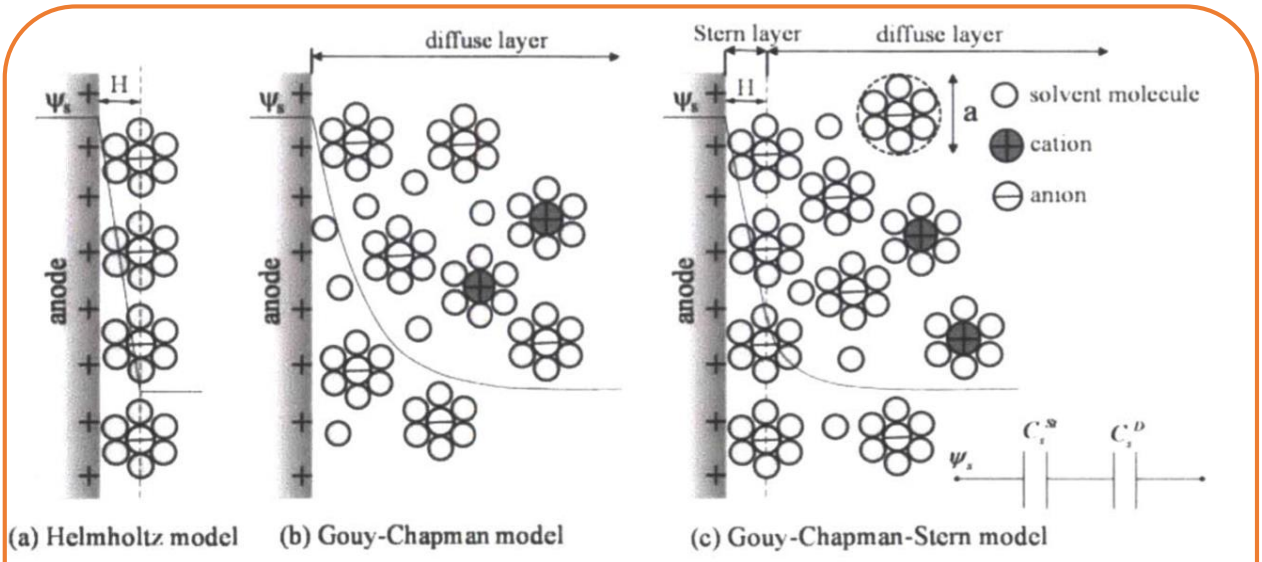


Figure60 ***Modele de helmholtz (a), de Gouy-Chapman et (c) de Gouy-Chapman-Sterm pour la formation de la double***

VI.1.4 Analogue électrique de la double couche

La double couche correspond par définition à l'interface électrode - électrolyte où se produit une séparation des charges. Son comportement électrique peut être assimilé à celui d'une capacité C (appelée capacité de double couche) en parallèle avec une résistance R_t (appelée résistance de transfert) selon le schéma simple ci-dessous.

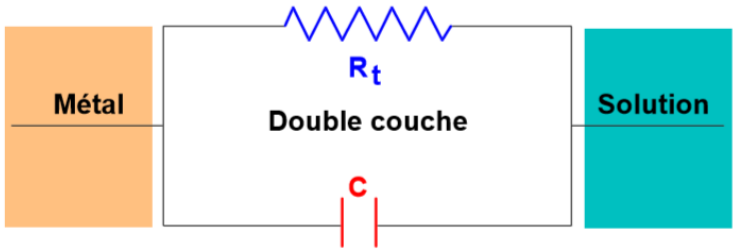


Figure 61 ***Circuit électrique équivalent à l'interface électrode-solution. Le schéma montre qu'un courant continu peut traverser l'interface électrode-solution. Ce courant, appelé courant de transfert de charge ou courant faradique, traduit la réaction électrochimique qui se produit à l'interface***

VI.2 Concentration de l'électrolyte

VI.2.1 Expérience

Nous avons fait une série de mesure de dérive. Cette étape permet de voir si les transistors avec lesquels nous travaillons sont stables ou pas. Si le transistor n'est pas stable on peut caractériser les dérives et corriger les données après. Mais les mesures suivantes sont faites avec des FETs dont la dérive est quasiment nulle. Des solution de KCl de différentes concentrations sont alors préparées. L'électrode et la puce sont rincées à l'eau DI puis séchées à l'air comprimé après chaque expérience.

VI.2.2 Observation

Nous avons remarqué que les FETs sont insensibles aux faibles concentrations et réagissent linéairement aux fortes concentrations.

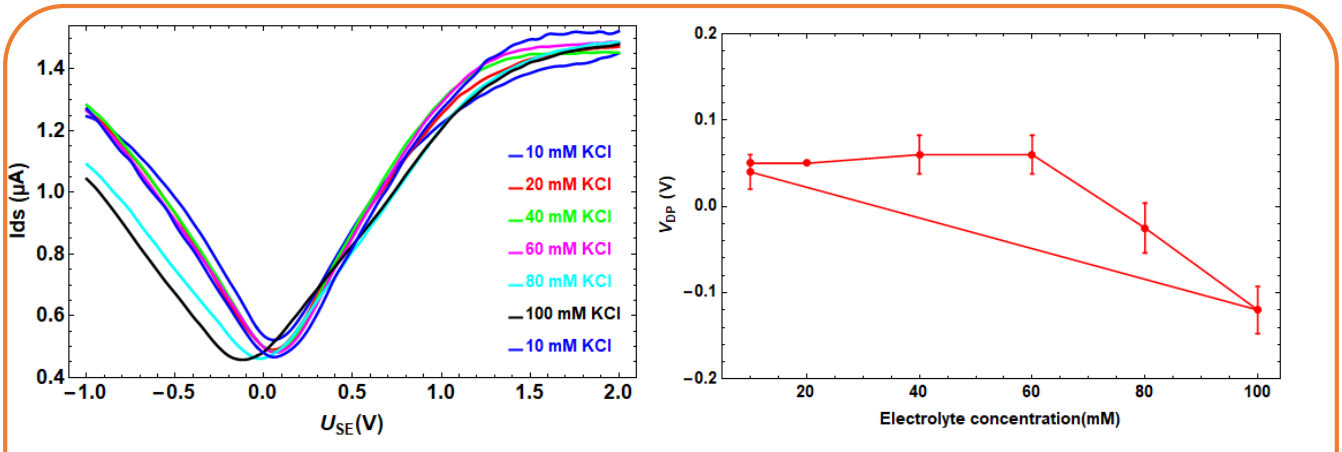


Figure 62. Réponse d'un transistor aux variations de la concentration de l'électrolyte. A gauche, nous avons les caractéristiques Ids(Vg) puis à droite les shifts du point de Dirac

VI.2.3 Conclusion

L'épaisseur de la double couche dépend de la concentration des ions dans l'électrolyte. Pour de faibles concentrations (10 à 60mM), l'épaisseur reste constante ce qui n'est le cas des concentrations un peu plus élevée. Ceci explique pourquoi les transistors sont insensibles aux faibles concentrations. Nos mesures sont faites à 25mM. Ce qui veut dire que nous sommes dans la gamme de concentrations ou de petites variations de la teneur en sels de l'électrolyte n'affectent pas le niveau de dopage du graphène.

VI.3 Nature des ions dans l'électrolyte

VI.3.1 Expérience

Le courant électrique, induit par une différence de potentiel, résulte du déplacement d'électrons dans les métaux et d'ions dans les solutions. Selon leur taille et leur concentration, les ions n'ont pas la même mobilité dans un électrolyte. Pour voir l'effet de la nature des ions en solution sur la localisation du point de Dirac, nous avons fixé la concentration des ions en solution et changer leur nature. Des mesures sont faites avec une solution de 20 mM KCL (K^+ , Cl^-) et une autre mesure avec une solution de 20mM de NaCl (Na^+ , Cl^-).

VI.3.2 Observation

Nous observons un léger shift du point de Dirac vers les tensions positives si on prend comme référence la première mesure avec KCl. **Figure 63**b.

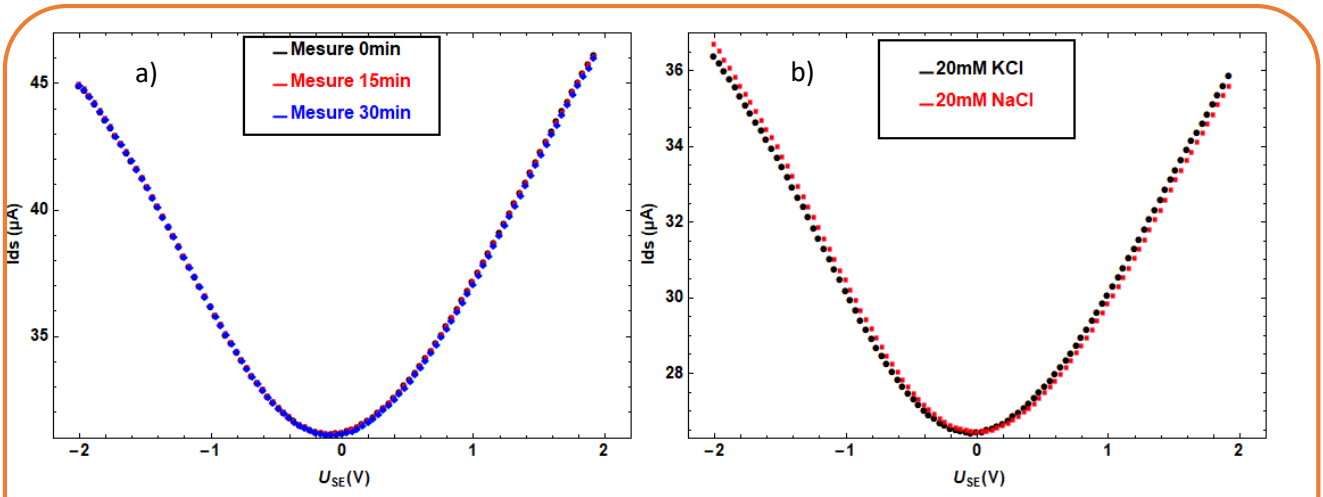


Figure 63. a) Mesure de dérive dans [KCl]=20mM,Vds=1V, b) Variation de la nature des ions en solution. Vds = 0.8 V

VI.3.3 Conclusion

Dans un électrolyte, contrairement aux métaux où le courant est produit par les déplacement des électrons, le courant est assuré par des ions. Ces ions n'ont pas la même taille ni la même mobilité. Par exemple à température ambiante et à 20mM, les ions Na^+ ont une mobilité de 5.10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$ alors que les ions Cl^- ont une mobilité de 7.10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$. La mobilité d'un ion en solution est inversement proportionnel à son rayon et à la viscosité de la solution. Elle dépend également de la température. L'intensité du courant est fonction de la tension imposée mais aussi des espèces chargées présentes dans la solution. Cette expérience met en lumière la différence d'influence des ions Na^+ et K^+ sur la localisation du point de Dirac. Les ions Na^+ ont un effet dopant plus important que K^+ à la même concentration. Ceci s'explique par le fait que les ions potassium sont de gros cations (rayon atomique de 1.52 A°) et donc auront une mobilité réduite par rapport aux cations sodium (rayon atomique de 1.16 A°).

VI.4 pH de l'électrolyte

VI.4.1 Expérience

Dans cette expérience nous avons ajusté le pH d'une solution KCl de 25mM par une solution basique de KOH pour avoir des solutions de pH différents. Des mesures ont été faites avec chacune des solutions à pH bien connu. Entre deux mesures, la puce et l'électrode sont rincées. Chaque caractéristique est la moyenne sur cinq mesures.

VI.4.2 Observation

Nous avons observé un shift du point de Dirac vers les tensions négatives pour les valeurs de pH croissant.

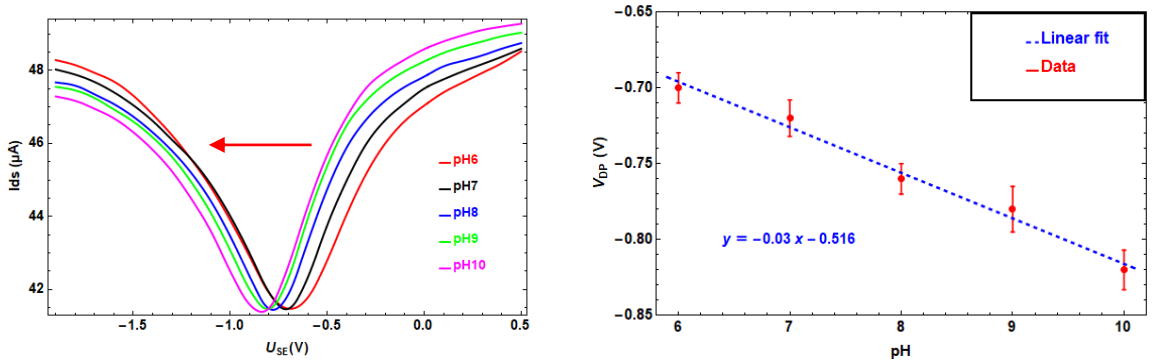


Figure 64. Réponse d'un transistor à la variation du pH de l'électrolyte. Les courbes de transferts sont décalées légèrement vers des tensions négatives avec l'augmentation du pH de l'électrolyte. Une sensibilité de -30mV/pH est déduite de cette mesure.

VI.4.3 Conclusion

Le pH d'une solution est la mesure de l'activité de ses protons H^+ ou des ions hydroxyles OH^-. Plus on augmente le pH, plus la solution s'enrichit en OH^- et s'appauvrit en H^+ et vice versa. Les groupes SiO à l'interface de l'électrolyte et la couche de passivation sont hydratés et deviennent des groupements silanol Si-OH en présence de l'électrolyte. On assiste à deux types de réactions: la déprotonation suivant la réaction

$$Si-OH \longleftrightarrow SiO^- + H^+ \qquad \text{(a)}$$

et la protonation selon la réaction suivante

$$Si-OH + H^+ \longleftrightarrow Si-OH_2^+ \qquad \text{(b)}$$

Lorsqu'on augmente le pH, la réaction (b) est limité puisque la solution s'appauvrit en protons H^+. L'interface électrolyte-couche de passivation devient de plus en plus riche en groupements silanolate (SiO^-) [102] et change la densité de charge en surface ce qui conduit au décalage du point de Dirac vers les tensions négatives que nous observons. Sur ce transistor la sensibilité est de -30mV/pH. Cette valeur est de l'ordre de 98mV/pH pour le graphène bicouche et 99mV pour le graphène 3-4 couches sans passivation (voir IV.2.2.3). Ces sensibilités ne sont pas comparables avec la nôtre car nous ne sommes pas dans les mêmes configurations. Par contre pour les ISFETs (Ion-Sensitive Field Effect Transistors) à base de silicium, Yu Chen et al. [103] ont rapporté une sensibilité de 20 mV/ *p*H à V_g=-0.4V et 60 mV/ *p*H à V_g=0.6V à température ambiante. La sensibilité au pH de nos capteurs (-30mV/pH) paraît convenable au vu de ces résultats.

VI.5 Détection de l'adsorption de la poly-L-lysine (PLL)

La poly-L-lysine est un polymère largement utilisé dans la technique de fixation des molécules d'ADN sur les biopuces [104]. Elle est positivement chargée et adhère facilement à des surfaces chargées négativement comme l'oxyde de silicium. La poly-L-lysine est un composé synthétique qui améliore l'adhésion cellulaire et l'absorption des protéines en modifiant les charges de la surface sur le substrat de culture [105]. Les traitements de surface en PLL permettent des applications telles que l'adhésion et l'étalement de diverses lignées cellulaires, la différenciation cellulaire et l'excroissance de neurites, l'adhésion des lignées de cellules transfectées et la survie de neurones primaires dans la culture. La

PLL étant des molécules synthétiques, elles ne stimulent pas l'activité biologique des cellules en culture et n'introduisent aucune impureté véhiculée par les polymères naturels.

VI.5.1 Expérience

On fait une mesure de référence sur une puce nettoyée et on l' incube dans une solution de polylysine de concentration C_o /2 (avec C_o = 85 µM) pendant 30min puis on laisse sécher pendant une journée à température ambiante puis on fait une mesure de détection. La puce est à nouveau incubée dans une solution de PLL de concentration C_o puis on laisse sécher de nouveau pour une deuxième mesure de détection.

VI.5.2 Observation

Nous observons un shift positif du point de Dirac et proportionnel à la concentration de la solution de PLL. L'intensité du signal induit par l'adsorption de la PLL est donnée par la différence entre la position du point de Dirac après adsorption de la PLL et l'état de référence (puce nue). Il est à noter que les mesures de dérive temporelle sur cette puce sont quasiment nulles (voir **Figure 63**a)

$$\Delta U_{DP,PLL} = U_{DP,PLL} - U_{DP,\mathrm{Re}\,f}$$

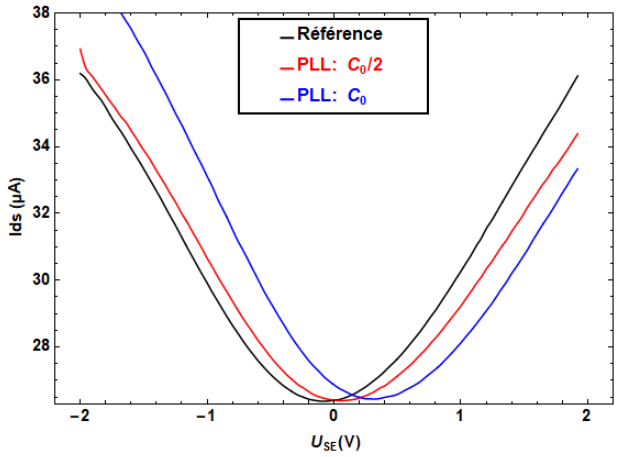


Figure 65. Réponse d'un transistor lors de l'adsorption de la poly-L-lysine. Les décalages du point de Dirac sont proportionnels à la concentration de la PLL. C_0=85µM. Vds = 0.8 V

VI.5.3 Conclusion

Un apport de charge positive produit un shift positif du point de Dirac. Cette réponse est proportionnelle à la concentration de la PLL. La sensibilité de ce transistor est estimée à 5 mV/µM . Une étude résumée dans le tableau ci-dessous sur 14 transistors d'une autre puce a montré que la sensibilité est de l'ordre de 24 ± 5 mV/ µM.

N°FET	1	4	5	7	8	9	18	32	36	40	41	42	43	47	Moyenne
PLLShift(mV),C_0	20	80	20	140	240	240	240	200	40	240	280	320	280	300	+185±104

VI.6 Fixation des sondes

Le couplage d'une biomolécule à un transducteur nécessite la mise en œuvre de méthodes qui font l'objet d'une abondante littérature [105], [106]. La conservation de la structure fonctionnelle de ces biomolécules est indispensable à leur fonctionnement. Il est donc nécessaire de les immobiliser sur le

capteur dans un environnement approprié. Cette immobilisation est réalisée par des couplages chimiques plus ou moins complexes mettant en jeu des fonctions chimiques fréquemment trouvées dans ces macromolécules. Des réactifs bifonctionnels tels la glutaraldéhyde ou les carbodiimides sont utilisés pour réaliser des couplages covalents. Les propriétés propres de certaines molécules peuvent également être utiles à ces couplages : protéine lectines et polyosides, biotine et avidine. Une interface membranaire est souvent requise pour réaliser l'immobilisation [107]. Les membranes filtreuses de nitrocellulose, de nylon ou de tout autre matière sont des supports précieux pour de nombreuses applications [108]. Des bicouches lipidiques (BLM) constituées de phospholipides ou de cholestérol oxydé [109] ou formées de lécithine di-acétylène [110] sont des membranes quasi physiologiques dans lesquelles peuvent être immobilisées ces biomolécules.

VI.6.1 Fixation par la polylysine (PLL)

Il existe de nombreuses possibilités pour greffer les ADN sondes dans la technologie des puces à ADN, la fixation électrostatique via la polylysine fut une des premières stratégies envisagées. L'équipe de Pat Brown, à Stanford a développé cette méthode dont on peut trouver les protocoles dans [111], [112] et [113] . Le principe de cette fixation est basé sur l'interaction de la charge positive de la polylysine et les groupements (SiO^-). La première étape consiste à fixer la polylysine sur la surface de verre. A pH neutre ou basique, le verre est négativement chargé car une partie des groupes silanol (SiOH) sont dissociés (SiO^-). En effet la présence des groupements (SiO^-) à la surface du verre, ainsi que les groupements positivement chargés ($-NH_3^+$) de la polylysine, permettent d'immobiliser de manière électrostatique une couche de ce polymère à la surface du verre. L'oxyde de silicium possédant similairement au verre des groupements silanol ionisés, la fixation d'une couche de polylysine peut donc être réalisée de manière équivalente sur nos réseaux. La seconde étape du protocole correspond à la fixation des ADN sondes sur cette couche chargée positivement. Cette fixation est, elle aussi, assurée par des interactions électrostatiques entre les groupements amines positifs de la polylysine et les groupements phosphates négativement chargés le long de l'ADN.

VI.6.1.1 Expérience

Après l'adsorption de la PLL, nous immobilisons les oligonucléotides sondes (1µM) sur la puce par macrodépôt local (voir II.4.4). Cette fixation est établie par des interactions électrostatiques entre les groupements amines positifs de la polylysine et les groupements phosphates négativement chargés le long de la chaine de l'ADN. Après 45 minutes de séchage, on fait une mesure de détection.

VI.6.1.2 Observation

La fixation des sondes qui est synonyme d'un apport de charge négative induit un shift négatif du point de Dirac (**Figure 66**). La valeur de l'intensité du signal induit par la fixation des sondes est donnée par la différence entre la localisation du point de Dirac après la fixation des sondes et après l'adsorption de la PLL.

$$\Delta U_{DP,Sonde} = U_{DP,Sonde} - U_{DP,PLL}$$

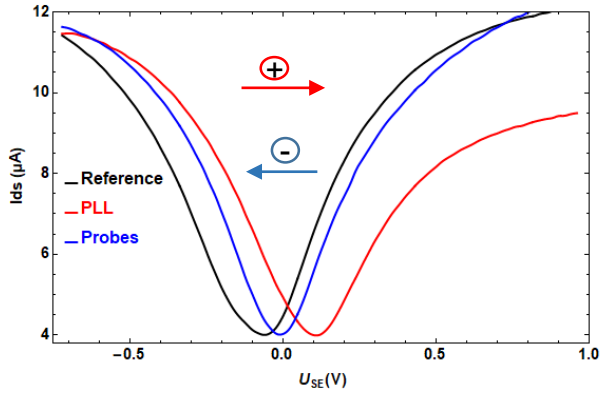


Figure 66. Réponse d'un transistor suite à l'adsorption de la PLL (rouge) et à la fixation de des sondes (bleu)

VI.6.1.3 Conclusion

Un apport de charge négative produit un shift du point de Dirac vers des tensions négatives. Généralement la totalité de la PLL n'est pas fixée par les sonde ce qui explique les shifts opposés mais pas de même ordre de grandeur qu'on observe. Pour l'ensemble des transistors (ici, 14 transistors) de la puce, l'adsorption de la PLL a induit un shift de +1.003 ± 0.2 V. La fixation des sondes a induit un décalage de -0.9 ± 0.3 V sur les transistors visés.

N°FET	4	14	16	18	20	40	44	54	60	64	84	88	90	92
PLL (V)	0.96	0.96	0.9	0.96	0.96	0.96	1.56	0.84	0.9	0.96	1.02	0.96	1.02	1.08
Sonde (V)	X	-0.78	-0.84	-0.84	X	X	-1.5	-0.84	-0.84	-0.42	X	X	X	X

VI.6.2 Densité d'oligomère sondes adsorbés sur une surface de poly-L-lysine

La surface de la couche de passivation externe (SiO_x) recouverte de PLL a la capacité d'adsorber les biomolécules, notamment l'ADN [104]. Il existe un niveau de saturation pour lequel un excès de sondes n'est plus adsorbés. Une augmentation de la densité surfacique de sondes adsorbées peut potentiellement augmenter la densité surfacique de cibles hybridées et induire un signal d'amplitude plus élevée. La connaissance de la densité saturante de sondes nous permet de ne pas déposer trop d'ADN sonde. Ceux-ci peuvent se fixer, lors du rinçage sur d'autres transistors autours de la goutte et induire des signaux parasites. Soit un dépôt de volume V_{Sonde} et de concentration C_{Sonde} projeté sur une surface $S = \pi(\frac{d}{2})^2$. On peut déduire la densité surfacique des sondes déposés par la relation

$$\sigma_{sonde} = \frac{C_{sondes} V_{sonde} N_a}{\pi(\frac{d}{2})^2}$$

où N_a désigne le nombre d'Avogadro ($6.02.10^{23}$mol^{-1}), et d le diamètre de la goutte. Les travaux de Antoine Blin [98] ont montré que la densité surfacique de saturation est de l'ordre de σ_{Sat} = $2.82.10^4$ molécules/µm^2 en admettant que la densité surfacique d'oligomères est une fonction linéaire de l'intensité de fluorescence . On peut alors prévoir la quantité de sondes fixés connaissant le diamètre de la goutte. Il est à noter qu'à volume constant, le diamètre d'une goutte dépend de l'hydrophobicité de la surface. Dans nos études où la surface active d'un transistor est de 250 µm^2, la densité surfacique maximale peut être estimée à 7.10^6 molécules. Cette densité initiale diminue avec les différents traitements de la puce.

En macrodépôt, une goutte de 0.1µL couvre environ 10 transistors d'une puce recouverte de PLL. Ce qui équivaut à un diamètre d'environ 900 µm. En microdépôt, le volume minimum des gouttelettes est de 40 pL. Une étude sur diamètre des spots en fonction du nombre de gouttes faite à la section II.4.5 nous donne un diamètre de 170 µm pour un spot de 10 gouttes. Avec ces données on peut évaluer la densité surfacique de molécules dans les deux types de dépôts.

	Macrodépôt	Microdépôt
Volume	0.1µl	400pL
Diamètre	900µm	170µm
Concentration	1µM	10µM
σ_{sonde}	9.5 10^4molécules/µm^2	10.6 10^4molécules/µm^2

La densité de charge surfacique est de même ordre de grandeur que ce soit en macrodépôt ou en microdépôt.

VI.7 Détection de l'hybridation

Avant de passer à l'hybridation, nous faisons deux types de blocage de surface. Bien que nos analyses de données ne sont plus basées sur le rapport signal sur bruit (SNR), ces blocages s'avèrent très importants. L'intérêt de ces blocages est d'éviter l'adsorption non spécifique des cibles sur la PLL non fixée par les sondes sur la partie active du réseau (ce qui peut donner des signaux parasites) et en dehors.

VI.7.1 Blocage chimique et physique

Le blocage de la surface de PLL peut être réalisée d'une part par voie chimique, avec par exemple l'anhydride acétique sur la surface [114]. Cette réaction peut transformer les groupements amine de la PLL en groupements amide. L'acétylation de l'anhydride acétique sur un groupement amine lie la PLL à un groupement acide carboxylique: La charge initialement positive est neutralisée. Ceci permet d'éviter les adsorptions non spécifiques par l'attraction électrostatique entre les cibles négativement chargées et la PLL chargée positivement. L'incubation d'un réseau de transistors à base de graphène dans une solution d'anhydride acétique recouvert de PLL entraine une variation négative de la tension au point de Dirac. $\Delta U_{Anhydride} < 0$ comme on peut le voir sur la **Figure 67**. Ce shift est dans le même sens mais moins prononcé quand on a déjà fixé des sondes sur la surface active du transistor.

N°FET	8	16	18	36	60	70	72	78	80	82
Blocage chimique (V)	-0.1	-0.6	-0.6	-0.3	-0.05	-0.1	-0.1	-0.8	X	-0.4
Blocage physique (V)	-0.05	-0.2	-0.1	-0.2	0	0	-0.1	X	X	-0.2

Le tableau ci-dessus montre les décalages induits par les différents blocages sur 10 transistors d'un même réseau. On voit que le blocage chimique induit plus de décalage que le blocage physique. Ces différents blocages induisent beaucoup de variabilité dans le réseau. Parfois le point de Dirac peut sortir de la fenêtre de tension de mesure comme le cas des FETs N° 78 et 80.

Après le blocage chimique, la totalité de la PLL peut ne pas être acétylée. On incube alors le réseau dans une solution d'oligomère Lprime de 21 bases dont la séquence est différente de celle de des sondes initialement immobilisées. L'idée est de fixer la PLL résiduelle et créer davantage d'effet électrostatique répulsif et orienter les cibles vers les sondes lors de l'hybridation. L'arrivée de ces charges

négatives supplémentaires entraine un shift négatif supplémentaire comme on peut le voir sur la **Figure 67**.

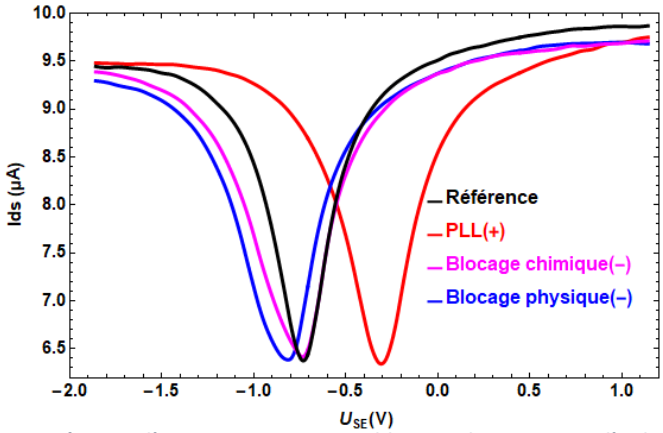


Figure 67. Réponse d'un transistor suite au blocage chimique avec l'anhydride acétique et physique avec une solution de Lprime

Certaines expériences ont montré que l'omission de cette dernière étape ne change pas le signal détecté lors de l'hybridation. Cela veut dire que le blocage chimique seul suffirait. Une fois ces étapes de blocage faites, on passe à l'hybridation. La mesure de référence pour l'hybridation est la dernière étape (blocage chimique ou physique) avant d'incuber la puce avec les cibles.

VI.7.2 Expérience

Après la fixation des sondes, on procède à la neutralisation des résidus de PLL sur les transistors étudiés.

- Blocage chimique : C'est une étape qui consiste à incuber la puce pendant 30mins dans une solution d'anhydride acétique.
- Blocage physique : La puce est ensuite incubée pendant 30 minutes dans une solution contenant des oligonucléotides (Lprime) de séquence différente de celle des cibles complémentaires des sondes préalablement fixés.
- On fait alors une mesure de référence avant de passer à l'hybridation (30 min, PBS1X, température ambiante) en incubant la puce dans le tampon physiologique PBS contenant les cibles complémentaires (de concentration 10nM) des sondes initialement immobilisés.
- Mesure de détection.

VI.7.3 Observation

Après hybridation on observe un décalage du point de Dirac de l'ordre de -30mV sur le transistor sur lequel a été immobilisées les sondes alors que le transistor témoin reste insensible.

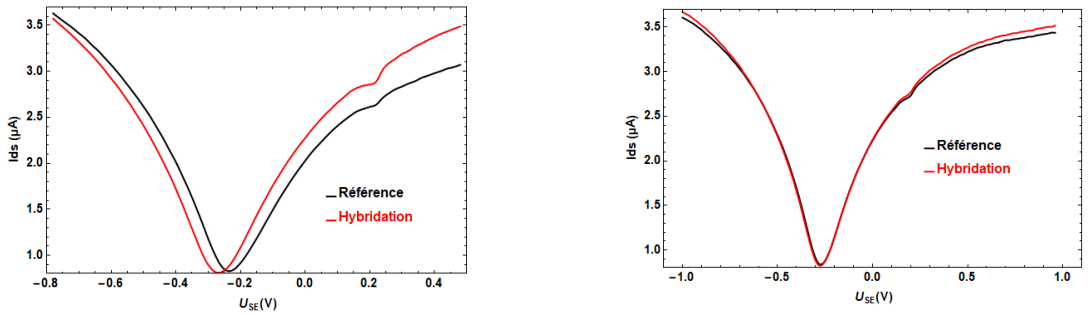


Figure 68. Réponse de deux transistors après hybridation. A gauche, le transistor visé: on a un shift de -30 mV et à droite un transistor témoin sur lequel on n' a pas fixé les sondes. [cible]= 10nM, Vds =10 mV, [KCl]=25mM.

VI.7.4 Conclusion

L'ordre de grandeur du shift sur le dispositif visé par rapport à la concentration en cible et la non sensibilité du transistor témoin nous permet de conclure que le shift que nous observons est réellement dû à l'hybridation entre les sondes et les cibles. Mais parfois on remarque qu'il y a des transistors visés qui ne réagissent pas après l'hybridation. Ceci peut s'expliquer par un problème de fixation des sondes ou l'insensibilité du transistor. Les résultats d'une expérience d'hybridation sont consignés dans le tableau ci-dessous.

N°FET	2	4	5	7	8	9	18	36	39	41	42	47	Moyenne
Hyb(mV)	0	0	0	-20	-60	0	-70	0	-80	-60	0	0	-50±22.8

La valeur moyenne -50±22.8mV calculée dans le tableau ci-dessus ne tient pas compte des transistors insensibles. Ces résultats sont cohérents avec ceux trouvés par Chen et al. [115] décrits dans la section IV.2.2.4.2 (**Figure 33**). Nous avons fait beaucoup d'expériences sur la détection de l'hybridation dans la suite pour optimiser les résultats ci-dessus. On change alors un paramètre d'une expérience à la suivante. Dans ces conditions, on ne peut pas faire une étude statistique objective sur un grand nombre de transistors. Cette étude sera une perspective pour la suite du projet.

VI.8 Spécificité de la détection

La réaction spécifique ou l'hybridation spécifique est définie comme la réaction entre les sondes et leurs cibles complémentaires. Cette réaction est synonyme d'apport de charge négative supplémentaire qui induit le décalage observé lors de l'expérience précédente. Pour s'assurer que le signal détecté est réellement dû à l'hybridation entre les sondes et leurs complémentaires et non une adsorption non spécifique sur la PLL résiduelle, il est normal de faire un contrôle. Après l'hybridation spécifique et la mesure de détection, la puce est à nouveau incubée dans une solution contenant cette fois ci les cibles non complémentaires. Les conditions expérimentales sont les mêmes que lors de la détection spécifique.

Conditions expérimentales:

- Sonde : ARS3 (1µM) et 45min de séchage
- Blocage Chimique : 30min
- Blocage physique : 30min
- Hybridation spécifique : ARS3sens (20nM), 30min et rinçage à l'eau DI
- Hybridation non spécifique : ARS5sens (20nM), 30min

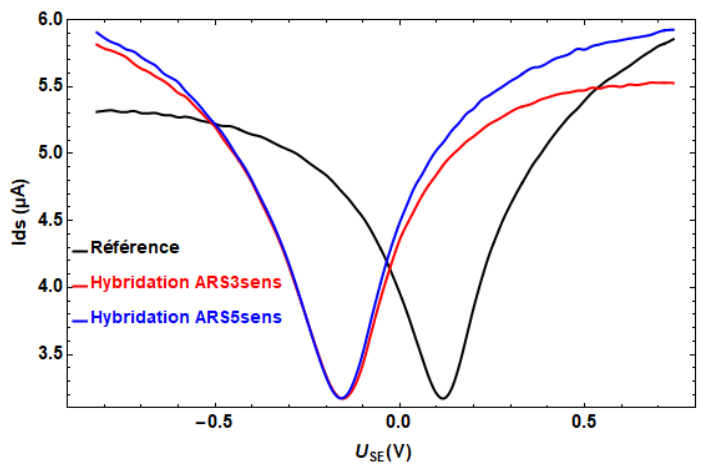


Figure 69. Détection de l'hybridation spécifique (ARS3sens) et non spécifique (ARS5sens). V_{ds}=90mV, [Ars3sens]=20nM, [Ars5sens]=20nM, [KCL]=10mM

VI.8.1 Observations expérimentales

L'hybridation spécifique a induit un décalage du point de Dirac dans la direction des tensions négatives comme on l'avait observé précédemment. Après l'hybridation non spécifique, on a observé un léger décalage toujours dans le même sens mais d'intensité négligeable. La même observation est faite sur les 27 transistors du réseau étudié.

VI.8.2 Conclusion

L'hybridation spécifique a induit un décalage de -131.2 ± 90 mV avec ARS3sens et l'hybridation non spécifique a produit un signal d'intensité -0.8 ± 0.03 mV avec ARS5sens. Ces observations prouvent que le signal détecté est réellement dû à l'hybridation entre les sondes et leurs complémentaires.

VI.9 Effet de la concentration en cible et saturation du signal

L'expérience de l'hybridation a été faite dans les mêmes conditions que précédemment en variant la concentration des cibles. Nous avons fixé une grande quantité de sonde (5µM) afin de pouvoir faire ces séries d'expériences après. Nous avons procédé de la façon suivante :

- Incubation de la puce avec 10nM de cibles complémentaires pendant 30 minutes.
- Rinçage de la puce avec l'électrolyte de mesure [KCL]=10mM.
- Mesure de détection.

Ces étapes sont reproduites pour chacune des incubations avec les différentes concentrations des cibles. Les résultats de la cinétique nous ont permis de savoir qu'au bout de 16 minutes au plus la totalité des cibles sont hybridées. Ce qui veut dire qu'au bout des 30 minutes toutes les cibles pour une concentration de l'ordre de quelques dizaines de nanomolaires sont épuisées. Le signal est important au début des séries d'hybridation (10nM, 20nM, 30nM) et diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration. Ceci s'explique par le fait qu'au début les cibles atteignent facilement les sondes mais au fur et à mesure que les sondes à hybrider diminuent, même si on augmente la quantité des cibles, on assiste à une saturation et un effet répulsif des cibles déjà hybridées vis-à-vis des nouvelles cibles.

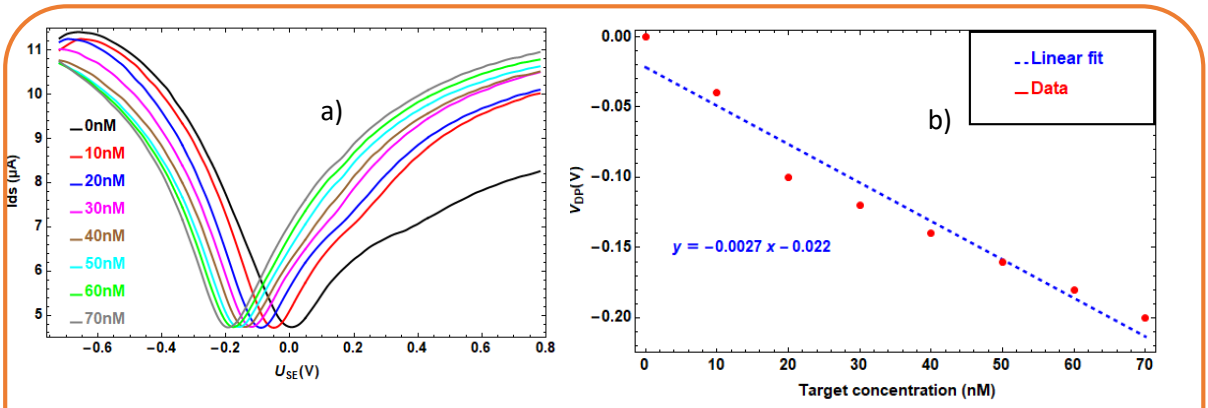


Figure 70. Réponse d'un transistor suite à la variation de la concentration des cibles. a) L'allure des courbes de transfert pour chaque valeur de la concentration des cibles. Observe un décalage vers les tensions négatives lorsqu'on augmente la concentration des cibles. b) Position du point de Dirac en fonction de la concentration des cibles. Vds = 10 mV, [KCl]= 10mM.

VI.9.1 Conclusion

Avec cette expérience nous avons remarqué que les transistors sont sensibles à la variation de la concentration des cibles. Les shifts observés sur les dispositifs étudiés sont proportionnels à la concentration des cibles.

VI.10 Seuil de détection

L'idée dans cette expérience est de savoir quelle peut être la plus faible concentration de cibles que l'on peut détecter. Vu que la sensibilité des transistors diminue avec le nombre de recyclages, nous avons fait cette expérience avec une puce neuve pour avoir une meilleure sensibilité. Les étapes de blocage sont faites pour éviter les adsorption non spécifiques ce qui ferait perdre le peu de cible que nous avons. De même le nombre de capteurs visés était deux à cause des raisons précitées. La concentration des cibles était fixée à 50pM. Après incubation de la puce avec les cibles pendant 30 minutes, nous avons procédé au rinçage puis à la mesure de détection. Les décalages observés sur les dispositifs visés sont respectivement -10mV et -50mV.

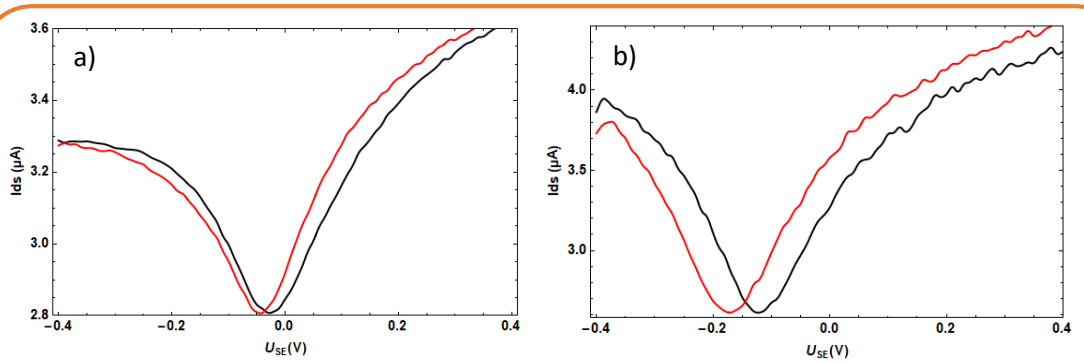


Figure 71. Réponse des deux transistors visés lors de l'expérience. a) Le transistor montre un décalage de -10mV le transistor b) un décalage de -50mV : Vds = 50mV, [KCl]= 10mM

VI.10.1 Conclusion

Cette expérience montre qu'on peut détecter moins que 50pM de concentration en cible. Le faible signal détecté sur le dispositif a) de la **Figure 71** serait dû au manque de cible dans la solution d'hybridation ou à sa sensibilité intrinsèque. L'intensité des décalages mesurés à cette faible concentration montre qu'on peut détecter des cibles de plus faible concentration.

VI.11 Effet d'écrantage des charges

La répartition des charges à proximité immédiate de la grille (couche de passivation) joue un rôle essentiel dans le transfert du signal induit par une charge moléculaire aux capteurs. Ils sont capables de détecter les apports de charges au voisinage de la surface ou situées à une distance inférieure à l'épaisseur de la double couche. L'épaisseur caractéristique de la double couche électrique peut être assimilée à la longueur de Debye. Par conséquent, la longueur de Debye est évidemment l'un des facteurs importants pouvant affecter de manière significative les performances (variation du signal de sortie, sensibilité, limite de détection, etc.) des FETs pour la détection de l'adsorption des macromolécules chargées sur la couche de passivation [116], [117] La charge des macromolécules est écrantée par les petits contre-ions dissous dans la solution: les macromolécules chargées positivement, telles que la PLL, seront entourées par des anions en raison des interactions électrostatiques tandis que les espèces chargées négativement, telles que l'ADN, seront entourées de cations. Le potentiel électrostatique résultant des charges intrinsèques des molécules décroît de façon exponentielle avec la distance qui les sépare de l'interface électrolyte/grille [118], [119], [120]. La longueur de Debye est donnée par la relation suivante

$$\lambda_D=\sqrt{\frac{\varepsilon_0.\varepsilon_r k_B T}{\sum_i C_i {Z_i}^2 e^2}}$$

où $\varepsilon_0.\varepsilon_r$ est la permitivité diélectrique du solvant (ε_0 étant la permitivité diélectrique du vide), k_B la constante de Boltzmann, e la charge d'un proton, Z la valence de l'ion et C_i la concentration en ions au cœur de l'électrolyte exprimée en ions/m^3. La relation précédente montre que plus la force ionique

$I_s=\frac{1}{2}\sum_i Z_i^2 C_i$ est élevée, plus la double couche est comprimée.

Nous avons étudié cet effet sur la réponse d'un transistor dans trois électrolytes de concentrations différentes ([KCl] 10µM, 10mM et 25mM) de volume 1mL chacun. Nous représentons la sensibilité d'un FET individuel suite à la modification de la concentration de l'électrolyte au cours de la détection de l'hybridation sur la **Figure 72**. Nous avons effectué des mesures de référence avec chaque électrolyte après le processus de blocage de surface. Les mesures de détection ont été faites avec les mêmes électrolytes que lors des mesures de référence après 30 minutes d'hybridation dans du PBS1X.

Nous avons constaté que l'effet d'écrantage est crucial pour la performance de détection du transistor. Comme prévu, l'amplitude du signal décroit linéairement avec l'augmentation de la force ionique de l'électrolyte de mesure.

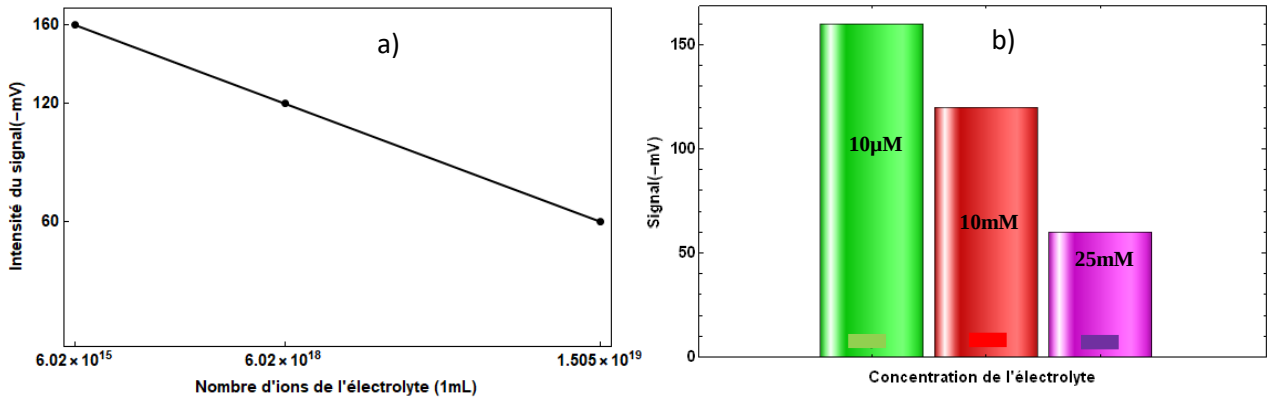


Figure 72 a) Effet de la force ionique de l'électrolyte sur l'intensité du signal détecté. b) les mesures de référence et de détection sont faites dans des électrolytes de différentes concentrations. L'intensité du signal détecté décroit avec l'augmentation de la concentration de l'électrolyte de mesure.

VI.11.1 Conclusion

La concentration en sel affecte significativement l'intensité du signal détecté. Plus l'électrolyte est chargé en sels plus des phénomènes d'écrantage sont observés et cela diminue considérablement le signal électrique.

VI.12 Hybridation sens et anti-sens

VI.12.1 Expérience

Dans les conditions réelles d'utilisation d'un biocapteur, l'analyte d'intérêt se trouve souvent dans un environnement complexe (eau, plasma sanguin, liquide biologique etc….) et le biocapteur se doit de le reconnaitre de façon spécificique. Nous avons créé un environnement analogue en fixant trois types de sondes sur le réseau: ARS3, ARS5 et ARS7 de concentration 1µM chacun (voir IV.2.1.2.1). Après les séries de blocage chimique et physique, on fait une mesure de référence (10mM KCl). Nous avons procédé à deux réactions d'hybridation de 30 minutes chacune à température ambiante (25°C). La première avec les cibles ARS5sens (10nM, PBS1X) complémentaires de ARS5 (courbe bleue) et la deuxième avec les cibles ARS3sens (10nM, PBS1X) complémentaires de ARS3 (courbe rouge). La partie du réseau recouverte par ARS7 étant restée témoin.

VI.12.2 Observation

Nous avons remarqué que certains transistors recouverts de ARS3 et ARS5 sont restés insensibles lors des deux séries d'hybridation en plus ceux de ARS7 (ce qui est normal pour ces derniers). Par ailleurs, nous avons des transistors qui ont réagi sélectivement lors des hybridations comme on peut le voir sur la **Figure 73**. On peut aussi voir que les shifts sont moins prononcés lors de la deuxième hybridation.

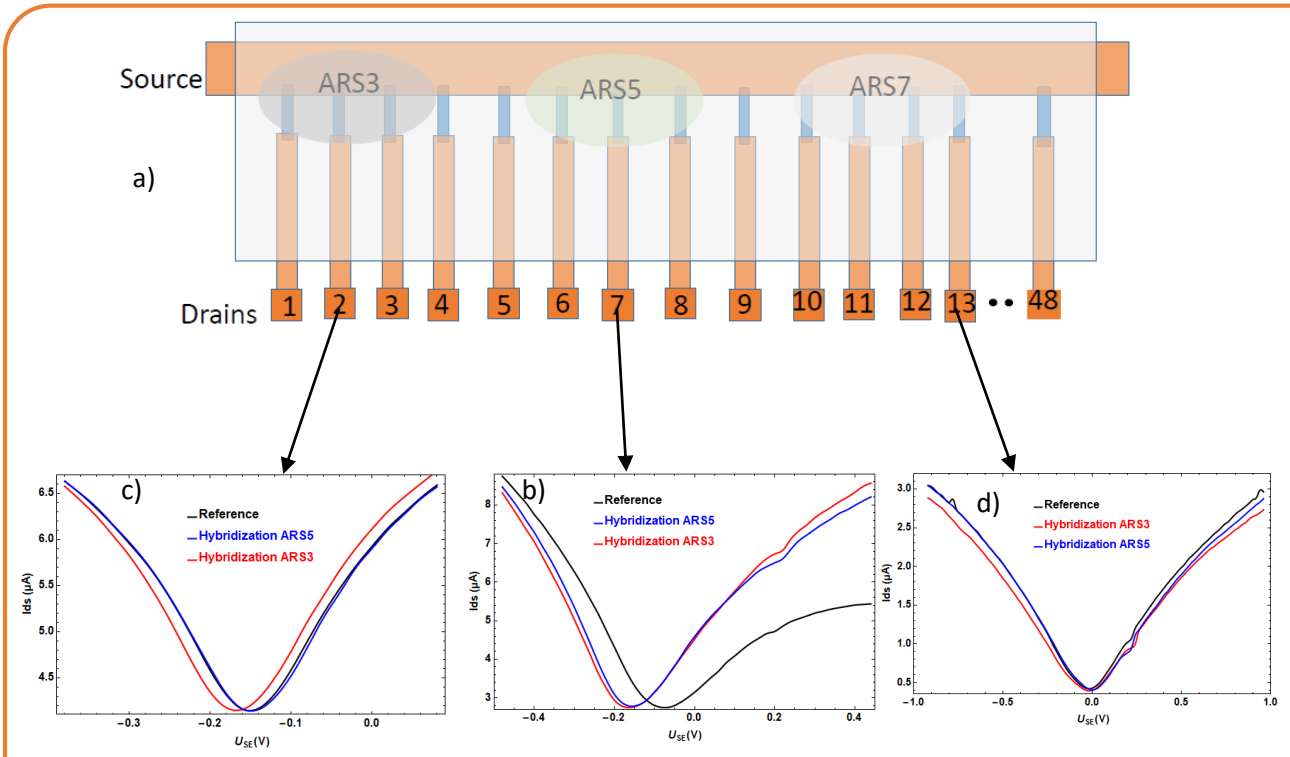


Figure 73 a) Schéma illustratif du réseau de transistors montrant les gouttes de sondes adsorbées. b) Réponse typique d'un transistor se situant dans la zone où on a été déposé ARS5. Ce transistor réagit suite à l'hybridation de ARS5sens mais pas suite à l'hybridation de ARS3sens. c)Le transistor ne réagit pas dans un premier temps quand l'hybridation a eu lieu avec les cibles ARS5sens mais réagit quand il s'agit de ARS3sens lors de la deuxième hybridation. d) Le transistor ne réagit pas suite aux deux séries d'hybridation. Vds = 90mV, [KCl]=10mM.

VI.12.3 Conclusion

Cette expérience vient prouver que les shifts que nous observons lors de l'hybridation ne sont pas aléatoires. Des transistors qui réagissent spécifiquement vis-à-vis des cibles complémentaires ou non complémentaires. Les dispositifs qui n'ont pas réagi ont probablement un problème de fixation des sondes ou sont insensibles (voir VI.1.2). La décroissance du signal avec la deuxième hybridation peut s'expliquer par le fait qu'on a des pertes de sondes lors des traitements de rinçage et de séchage à l'air comprimé après la première hybridation.

VI.13 Cinétique de l'hybridation

VI.13.1 Expérience

Afin de voir comment se comportent les transistors en temps réel lors de l'hybridation, nous avons lancé une série de 10 mesures à toutes les 4 minutes pendant la réaction. Le tampon d'hybridation est du 0.1XPBS. Le défi dans cette expérience est de trouver une concentration de l'électrolyte qui peut à la fois jouer le rôle de tampon où l'hybridation et les mesures électriques sont possibles. En effet nous avons fait cette expérience dans du 1XPBS et du 0.5XPBS sans succès. L'hybridation pourrait avoir lieu mais les phénomènes d'écrantage ne nous permettent pas de détecter les signaux avec de telles concentrations du tampon. A la fin de l'expérience, un test de contrôle est fait avec le même tampon avec et sans les cibles non complémentaires **Figure 74** et **Figure 75**.

VI.13.2 Observation

Nous avons observé des décalages progressifs au cours des 16 premières minutes. Ces décalages sont assez marqués au début et diminuent avec le temps et finissent par s'estomper. Par ailleurs ces décalages ne sont jamais apparus lors des mesures sans les cibles complémentaires.

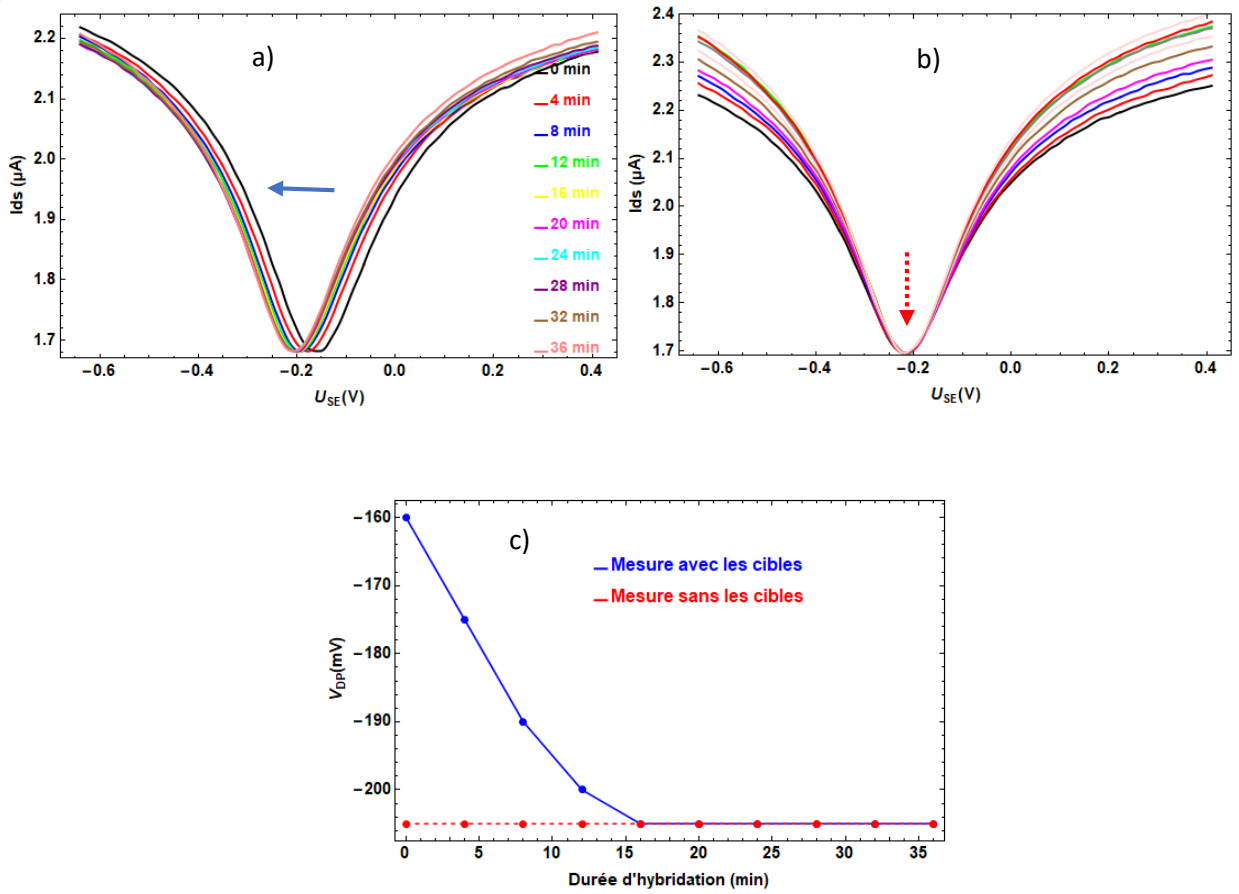


Figure 74 Comportement d'un transistor en temps réel lors de l'hybridation. Les déplacements du point de Dirac avec les cibles complémentaires (a) et sans les cibles (b) et c) les shifts du point de Dirac avec les cibles (en bleu) et sans les cibles en rouge pointillé. Vds = 50mV, 0.1XPBS

La même expérience est reprise et le test de contrôle est fait avec les cibles non complémentaires. Les résultats sont représentés sur la **Figure 75**. La grande sensibilité de ce dernier transistor s'explique par le fait que la puce était neuve. La sensibilité des transistors n'est pas encore affectée par le nombre de recyclage comme expliqué au paragraphe VI.15.

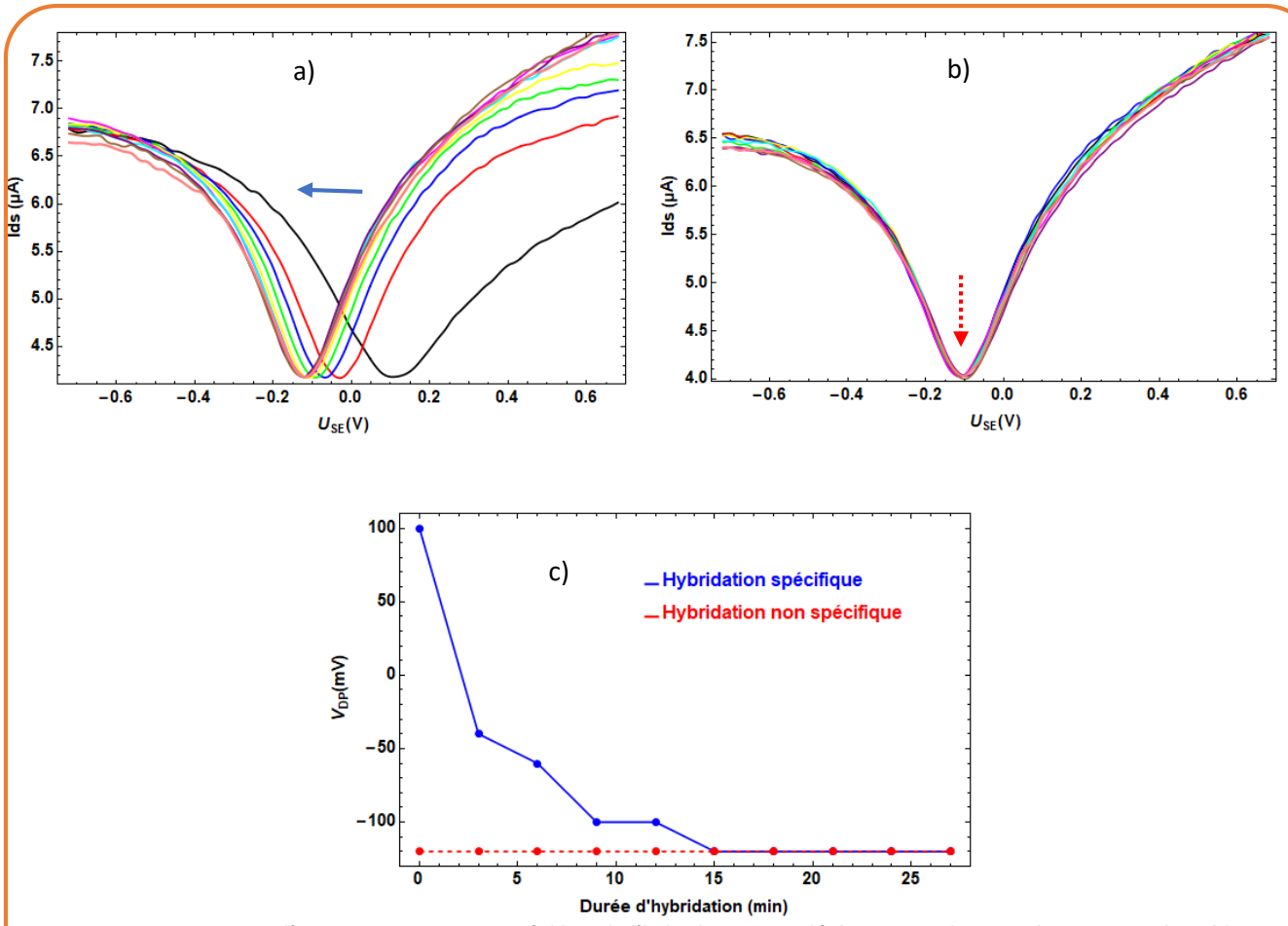


Figure 75 Comportement d'un transistor en temps réel lors de l'hybridation. Les déplacements du point de Dirac avec les cibles complémentaires (a) et avec les cibles non complémentaires (b). et c) les shifts du point de Dirac avec les cibles (en bleu) et les cibles non complémentaires en rouge pointillé Vds = 50mV, 0.1XPBS

VI.13.3 Conclusion

Avec cette expérience, nous avons pu observer l'évolution du point de Dirac en temps réel lors de l'hybridation. La durée de l'hybridation est estimée à 16 min étant donné qu'au-delà de cette période aucun shift n'est observé. On peut alors calculer la vitesse de déplacement du point de Dirac en calculant la pente de la courbe en bleu sur la deuxième figure. Cette vitesse est de -2.8 mV/ min. Une autre expérience lors de laquelle on a utilisé les cibles non complémentaires après l'hybridation spécifique a donné le même résultat. Le déplacement du point de Dirac est estimé à -14.7mV/min. Cette deuxième expérience confirme que le signal détecté n'est pas dû à l'adsorption non spécifique des cibles. Il s'agit bien d'une réaction entre les sondes et leurs complémentaires. L'étude faite sur 8 dispositifs donne un temps moyen d'hybridation de 14 ± 3 minutes et une vitesse de déplacement du point de Dirac de l'ordre de -3mV/min.

VI.14 Détection des produits THRCA

Les produits THRCA (Tagged Hyperbranched Rolling Circle Amplification) sont des molécules complexes constituées d'une partie simple brin dont la séquence peut être celle de ARS3 ou ARS5 et une partie double brin de séquence périodique. Ce sont des molécules qui devraient apporter beaucoup de charges sur les puces. L'hybridation de ces molécules est un peu plus compliquée que celle des

oligonucléotides. La partie double brin étant très longue(100 à 10000bp), ces molécules diffusent plus lentement en solution, ce qui demande un temps d'hybridation plus long qu'avec les oligonucléotides. D'après les résultats que nous avions obtenus en détection par fluorescence, il faut un temps de blocage chimique beaucoup plus long (3 heures) pour neutraliser suffisamment la PLL (voir II.7). En effet, nous avons remarqué que le bruit de fond était très élevé avec les produits THRCA ce qui réduisait considérablement le rapport signal sur bruit. Ceci est dû au fait que ces molécules possèdent plusieurs sites de fixation sur la partie de double brin et peuvent se fixer facilement avec la PLL résiduelle si cette dernière n'a pas été bien bloquée. Un autre paramètre qu'on a pu contrôler lors de la détection par fluorescence était la température. L'hybridation à une température de 50°C avait considérablement réduit les hybridations non spécifiques. Mais avec les transistors à base de graphène, le contrôle en température est beaucoup plus compliqué à faire d'autant plus que le graphène lui-même est très sensible à des variations de température. Une autre possibilité est de caractériser les décalages induits par l'effet de la température et corriger les données après l'hybridation. Mais ces décalages sembles être irréversibles et on risque de sortir de la fenêtre de mesure de la tension V_{SE}. Le principe de la technique THRCA est représenté sur la Figure 76.

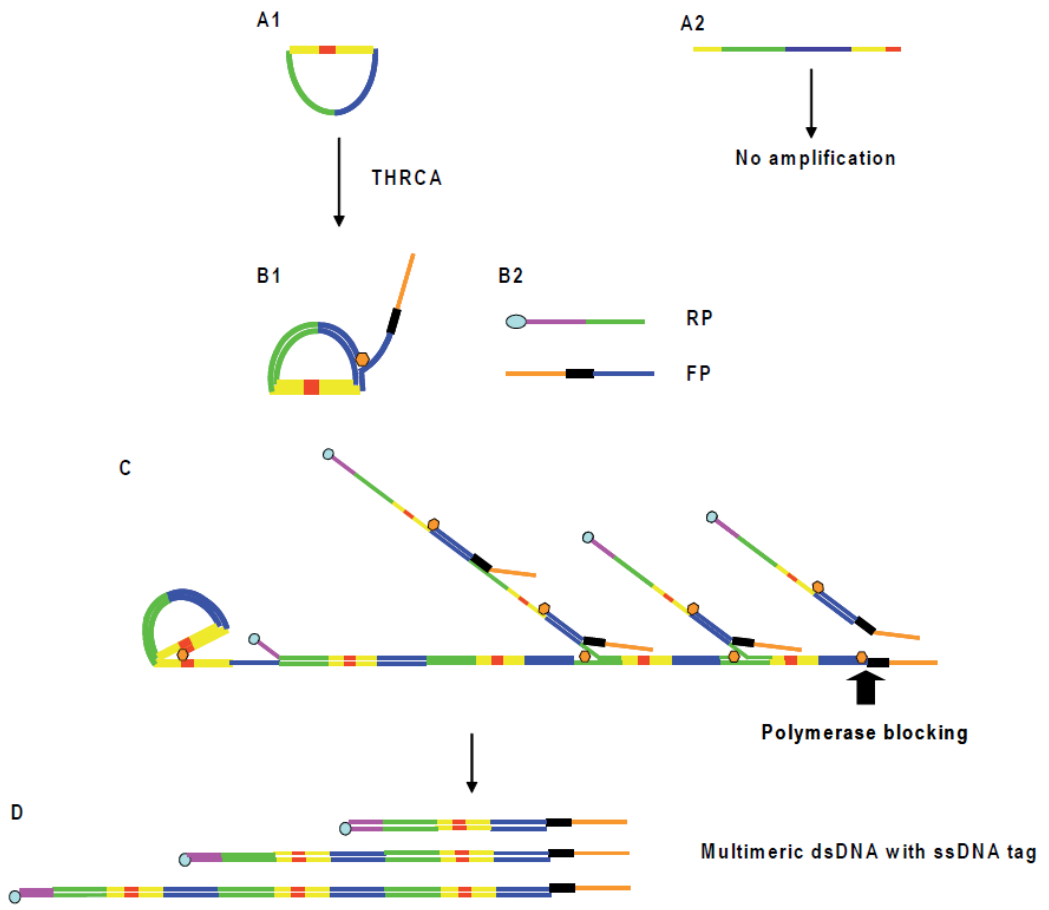


Figure 76 ***Principe de l'amplification par THRCA*** *[121]*

L'importance de ces produits est leur utilisation pour la détection de mutation. La détection de mutation par THRCA repose sur une étape initiale de reconnaissance de la mutation et une étape d'amplification à l'issue de laquelle on génère des molécules que l'on peut hybrider sur une puce à ADN ou sur un transistor.

L'amplification se fait à partir d'un substrat matrice circulaire A_1. Une fois que le substrat circulaire est formé, on désir l'amplifier afin de pouvoir réaliser la détection de la mutation. La THRCA est une technique d'amplification isotherme de l'ADN qui nécessite :

- Un substrat circulaire
- Deux amorces : ForwardPrimer (FP) et ReversePrimer :(RP)

Habituellement chaque amorce s'hybride totalement à sa séquence cible. Or ici, il n'y a qu'une hybridation partielle et nous disposons d'un espaceur qui bloque la polymérisation. Ainsi on obtient en sortie des molécules avec une extrémité portant un code-barres. En ajoutant un fluorophore au ReversePrimer, on peut marquer la molécule synthétisée. La description complète de la technique se trouve dans [121] et fait objet de dépôt d'un brevet par U. Bockelmann et al. [122]

VI.14.1 Expérience

Des sondes ARS3 de concentration 2µM ont été fixés par la PLL comme dans un processus normal d'hybridation des oligonucléotides. La puce est alors séchée pendant 45 minutes et incubée dans de l'anhydride acétique pendant trois heures et rincée à l'eau DI. Ce blocage reste nécessaire même si nous ne sommes pas en analyse de rapport signal sur bruit. En effet nous avons remarqué que toute la PLL n'est pas fixée par les sondes et en plus il faut bloquer la PLL environnant pour éviter la réaction préférentielle c'est-à-dire l'attraction entre les charges positives de la PLL et les charges négatives des molécules THRCA. Une solution des cibles (THRCA) est alors préparée (12 µL de produit dans 1mL de PBS final, ceci correspond à une concentration molaire de l'ordre de 5 à 10nM) et hybridé pendant une heure.

VI.14.2 Observation

Nous avons observé des décalages importants après hybridation sur les cinq dispositifs utilisés.

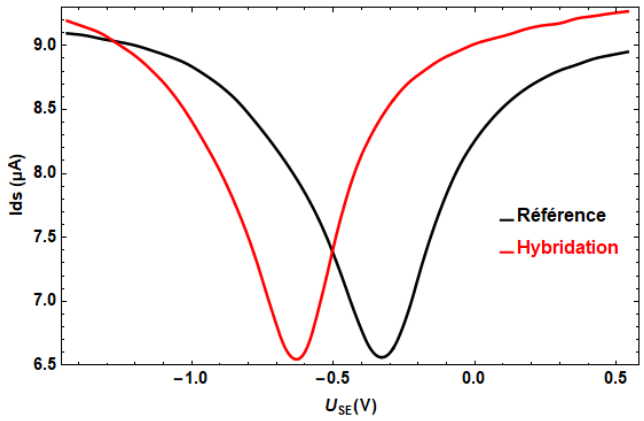


Figure 77. Détection de l'hybridation des produits THRCA, le signal détecté est beaucoup plus prononcé que ce qu'on a l'habitude de voir avec les oligonucléotides

VI.14.3 Conclusion

Les produits THRCA sont des molécules longues et par conséquent apportent plus de densité de charge sur les capteurs. L'intensité moyenne du signal détecté sur cinq transistors est de -228 ± 95 mV. Dans les mêmes ordres de concentration avec les oligonucléotides (10nM), nous avons observé des décalages de -50 ± 22.8mV (voir VI.7.3). Ce signal est d'amplitude cinq fois moins que celui observé

avec les produits THRCA. Ce qui montre que ces produits apportent beaucoup plus de charges sur les transistors.

VI.15 Recyclage des puces

Les biocapteurs sont souvent conçus comme des produits jetables pour une mesure à usage unique. A la différence de ceux décrits dans la littérature où les molécules sont directement fixées sur le graphène, nos puces sont passivées. Le retrait des molécules sur la couche de passivation après utilisation n'altère pas les propriétés électroniques du graphène. Pour que les puces d'ADN soient réutilisables, l'interface électrolyte / couche de passivation doit être régénérée après son utilisation. Cela est possible en éliminant les molécules d'ADN avec le moyen d'attache sous-jacent de la surface du capteur et en remodifiant la surface pour une nouvelle mesure. Jürgen Fritz et al. [123] ont réussi à régénérer cinq fois leurs puces à base de silicium avec une succession d'adsorption de PLL-oligonucléotide. Ils ont remarqué qu'à chaque recyclage, l'épaisseur de la PLL-oligonucléotide augmente de 0.4nm (voir Figure 78a). L'adsorption de la PLL induit un décalage du point de fonctionnement de +16mV et celle de de l'ADN induit un shift de -14mV (voir Figure 78b). Les mêmes auteurs ont essayé de recycler les puces en les nettoyant avec du piranha. Les puces peuvent être réutilisées dix fois mais ils ont remarqué que les transistors perdent leur sensibilité de 10 à 20% à chaque cycle.

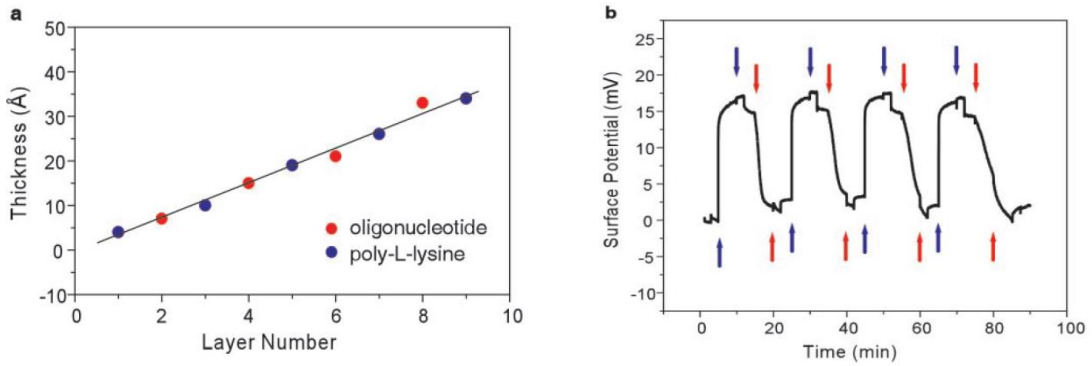


Figure 78 Recyclage des puces: a) Evolution de l'épaisseur de des multicouches PLL-oligonucléotide au cours du recyclage, b) changement du potentiel surfacique suite à l'adsorption de la PLL (chargée positivement) et des oligonucléotides (chargés négativement) [123]

Nous avons essayé plusieurs méthodes de régénération de surface en utilisant une solution de Brown, H2SO4 (1M) et HCl (1M), mais la couche de passivation est légèrement endommagée. Certains dispositifs peuvent ne plus fonctionner après la régénération et des mesures non reproductibles ont été observées. Nous avons également essayé d'ajouter une nouvelle couche de PLL après chaque utilisation, sans aucun traitement de surface préalable. Dans ce cas, nous avons observé que les FETs perdent légèrement leur capacité de sensibilité lors de la détection suivante. A titre d'exemple, dans les mêmes conditions d'hybridation, un FET a une sensibilité de -220mV, -160mV,-80mV et -40mV pour la première, la deuxième, la troisième et quatrième utilisation respectivement. Dans ces conditions, une puce ne peut être recyclée qu'au maximum cinq fois. Mais généralement le facteur limitant est beaucoup plus la fragilité des transistors du réseau. En effet, avec des séries de mesures à chaque étape de l'expérience, le nombre de dispositifs fonctionnels diminue suite à la perte de certains qui ne marchent plus. Ce problème est souvent observé après le blocage chimique. Ceci fait que parfois on ne peut pas aller au bout de certaines expériences et on est obligé de retourner en salle blanche pour reprendre la nanofabrication.

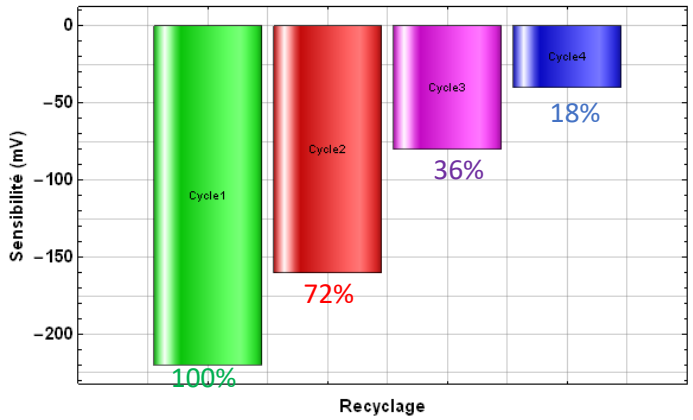


Figure 79. Evolution de la sensibilité d'un transistor avec le nombre de recyclage. On voit que les capteurs perdent de leur sensibilité au fur et à mesure des recyclages.

VI.16 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons fait plusieurs applications avec les puces que nous avons fabriquées: (le pH et la concentration de l'électrolyte, la nature des ions dans l'électrolyte, la détection de l'adsorption de la PLL et de l'hybridation). Les FETs sont insensibles aux faibles concentrations de l'électrolyte mais montrent un déplacement linéaire du point de Dirac pour des concentrations plus élevées. Nous avons observé qu'un apport de charge positive (PLL) sur les puces induit un décalage dans le sens des tensions source-électrolyte positives alors qu'un apport de charge négative (ADN sonde) produit un décalage dans le sens opposé. Les phénomènes d'hybridation synonyme d'apport de charge négative supplémentaire ont produit un déplacement négatif du point de Dirac. Les tests de contrôle nous ont permis de conclure que ces décalages sont réellement dus à l'hybridation entre les sondes et leurs cibles complémentaires. L'hybridation des produits THRCA (molécules beaucoup plus longues et donc beaucoup plus chargées) est fortement marquée par de larges décalages du point de Dirac. L'hybridation sens et anti-sens nous a permis de détecter sélectivement plusieurs types de produits en parallèle. Avec l'étude cinétique de l'hybridation, nous avons observé le comportement des FETs en temps réel lors de l'hybridation. Cette étude permet de connaître la durée et la vitesse moyenne d'hybridation entre les sondes et les cibles étudiées. Le recyclage des puces a montré que les transistors perdent leur sensibilité au fur et à mesure avec le nombre de recyclages.

VII Conclusion générale et perspectives

La rencontre d'un physicien et un biologiste peut donner naissance à de nouvelles idées qu'on a hâte de mettre en pratique. Ainsi quand un physicien analyse de près une molécule d'ADN, il voit plutôt un fil uniformément chargé négativement alors que le biologiste lui dira que c'est le support d'informations génétiques. Entre les résultats escomptés et les idées théoriques se trouve un grand fossé qui est le monde l'expérimentation.

Dans cette thèse, nous avons développé une approche originale pour détecter électroniquement des biomolécules par un réseau de transistors à effet de champ à base de graphène. Une grande partie de la thèse est consacrée à la fabrication des puces en salle blanche. Des procédés originaux de transfert de graphène Cu-CVD et de photolithographie ont été mis en place pour fabriquer des transistors. Des études comparatives des matériaux pour les électrodes de contact ont permis de faire des recuits pour réduire le dopage et améliorer la mobilité des transistors sans dégrader les contacts. Nous avons étudié différents types et d'épaisseurs de couches de passivation pour trouver un compromis entre la stabilisation des caractéristiques et leur sensibilité aux biomolécules.

Avant de passer à la détection électronique avec nos puces, nous avons tout d'abord étudié la détection par fluorescence. Une technique classique qui nous a permis d'obtenir des résultats satisfaisants que nous avons appliqués lors de la détection électronique.

Pour la détection électronique, des mesures différentielles et des mesures en temps réel in situ nous ont permis de détecter l'apport de charges positives ou négative à l'interface couche de passivation/électrolyte du réseau. Les molécules d'ADN sondes sont immobilisées sur le réseau par un dépôt local sur une couche de polymère (PLL) par effet électrostatique. L'adsorption de ce polymère chargé positivement induit des déplacements positifs du point de Dirac. L'effet contraire est observé lorsque nous fixons les sondes. Ceci est cohérent puisque ces derniers apportent une densité de charges négatives. La réaction d'hybridation entre les sondes et les cibles complémentaires provoque un décalage négatif vu que c'est un apport de charges négatives supplémentaires. Les tests de contrôle nous ont permis d'affecter la variation du signal électrique mesuré (variation du niveau de dopage du graphène) à la détection de l'hybridation. Nous avons remarqué que les signaux mesurés sont proportionnels à la concentration des cibles. La plus faible quantité de cible que nous avons pu détecter était de l'ordre de 50pM. Mais l'intensité du signal mesurée à cette concentration laisse présager qu'on peut détecter des quantités encore plus faibles. Avec l'hybridation sens et anti-sens, nous avons détecté différents types de sondes immobilisées. Ceci prouve la sélectivité de nos capteurs. L'étude cinétique nous a permis de voir le comportement des capteurs en temps réel lors de l'hybridation. Cette étude nous a donné une idée de la durée et de la vitesse moyenne de la réaction d'hybridation entre les oligonucléotides étudiés.

Les transistors sont aussi utilisés pour détecter la variation du pH de l'électrolyte. L'hydrolyse des groupements silanol ($Si-OH$) de l'interface solide/liquide en ions silanolate (SiO^{-}) enrichit négativement l'interface et conduit à des déplacements du point de Dirac vers les tensions de grille négative. Ces décalages sont estimés à -30mV/pH.

Ces études ne seront jamais finies si ce n'est le temps imparti qui arrive à échéance. Cela veut dire qu'il reste des idées non abouties. Pour avoir un grand nombre de transistors opérationnels sur la puce lors de la détection électronique, il faudra améliorer la fabrication. L'utilisation d'un substrat comme le hBN dont la structure est proche de celle du graphène, de surface lisse et dépourvue de charge pourrait améliorer les performances des dispositifs. Avec les travaux récents de Li Wang et al [124] on peut

avoir du hBN de taille de 10cm X 10cm. Ceci permettra d'avoir des dispositifs de bonne mobilité et un réseau homogène.

La détection de l'hybridation avec les transistors à base de graphène reste une alternative incontournable fort de la grande mobilité de ses porteurs de charge et sa forme bidimensionnelle offrant une grande surface de contact. Cette technique reste tout de même limitée lorsqu'on veut augmenter la température et la force ionique du milieu réactionnel, le graphène lui-même étant très sensible aux variations de température et la détection du signal limitée par les phénomènes d'écrantage quand on augmente la concentration en sels.

Appendice A

Procédé de fabrication

Etape	Description	Outils	Notes
1	Découpe(1.2cmX1.2cm) et net-toyage du substrat	Acétone & IPA & ultrason	5min X2
1b	Gravure SiO_2 (1µm) back side	RIE, SiO_2, CHF3 & O_2	10nbar, 16min
1c	Litho croix d'alignement	Spin coating AZ5214E, 1.2µm AZ726MIF, 35s	Baked 110°C, 2min, align expose 2s et Reverse-baked 125°C, 2 min, Flood exposure 15s
1d	Métallisation	Cr10/Au150	Lift-off 15min, acétone @ 50°C
1e	Plasma cleaner	O_2	4min
2	Ajout PMMA	Spin coating PMMA	30 s @ 4000 rpm, 160°C, 6min
2b	Back side graphene etching	RIE : Stripping (O_2)	10nbar, 2min
2c	Cu etching	$(NH_3)_2S_2O_8$, 50mM	Une nuit
2d	Transfert	Rinçage à eau dégazée	3 à 4 fois + péchage + séchage 30min
2e	Dissolution PMMA	Acétone + IPA	15min @ 50°C
3	Protection du graphène	1nm Al_2O_3 ALD	10 cycles, 175°C, 300mTorr
4	Litho canal	Spin coating AZ5214E, 1.2µm AZ726MIF, 22s	Baked 110°C, 2min, align expose 15s
4b	Gravure Al_2O_3	H_3PO_4	50°C, 3min, rinçage à l'eau 2min
4c	Gravure du graphène	RIE: Stripping (O_2)	10nbar, 2min
5	Litho contact	Spin coating AZ5214E, 1.2µm AZ726MIF, 60s	Baked 110°C, 2min, align expose 2s et Reverse-baked 125°C, 2 min, Flood exposure 15s
5b	Métallisation	Ti10/Au180(evap thermique)	Lift-off 15min, acétone @ 50°C
6	Passivation	40nm Al_2O_3, ALD	400 cycles, 175°C, 300mTorr
6b	Passivation	50nm SiO_x, PECVD	280°C, Surface preparation: 10s, Go to deposition: 5s, Send SiH_4: 5s, Deposi-tion: 1min 53 s
7	Découpe couche passivation	Spin coating AZ5214E, 1.2µm AZ726MIF, 35s	Baked 110°C, 2min, align expose 15s
7b	Al_2O_3 + SiO_x etching	RIE, SiO_2, CHF3 & O_2	10nbar, 6min + Lift-off 15min, acétone @ 50°C
8	Wire bonding and packaging	(voir V.5)	

Appendice B

Liste des Accronymes

AFM:	Atomic Force Microscopy
ALD:	Atomic Layer Deposition
CNP:	Charge Neutrality Point
CVD:	Chemical Vapor Deposition
DC:	Direct Current
ENS:	Ecole Normale Supérieure
ESPCI :	Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris
GFET :	Graphene Field Effect Transistor
hBN :	Hexagonal Boron Nitride
IPA:	Isopropanol
GoBN:	Graphene on Boron Nitride
GoAL:	Graphene on Aluminium
HEMT:	High Electron Mobility Transistor
LPA:	Laboratoire Pierre Aigrain
MOSFET:	Metal-Oxide-Semiconductor Field Effect Transistor
NBP:	Laboratoire NanoBioPhysique
PECVD :	Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition
PMMA:	Poly Metyl Methacrylate
PLL :	Polylysine
RIE:	Reactive ion Etching
TMA:	TriMéthylAluminium

Bibliographie

[1] L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. H. Kent and L. E. Hood, "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis," *Nature,* vol. 5, no. 321, pp. 674-679, 1986.

[2] A. Bajaj, O. R. Miranda, I.-B. Kim, R. L. Phillips, D. J. Jerry, U. H. F. Bunz and V. M. Rotello, "Detection and differentiation of normal, cancerous, and metastatic cells using nanoparticle-polymer sensor arrays," *PNAS,* vol. 106, no. 27, pp. 10912-10916, 2009.

[3] M. A. Shannon, P. Bohn, M. Elimelech, J. Georgiadis, B. Mariñas and A. Mayes, "Science and technology for water purification in the coming decades," *NATURE,* vol. 7, no. 20, pp. 301-308, 2008.

[4] A. Toqeer, S. Imdad, K. Yaldram, M. N. Butt and A. Pervez, "Emerging nanotechnology-based methods for water purification," *Desalination and Water Treatment,* vol. 52, pp. 4089-4101, 2014.

[5] D. Ralf, "Friedrich Miescher and the discovery of DNA," *Developmental Biology 278,* vol. 278, no. 2, pp. 274-288, 2005.

[6] J. Marmur and P. Doty, "Determination of the Base Composition of Deoxy ribonucleic Acid from its Thermal Denaturation Temperature," *J. Mol. Biol,* vol. 5, no. 1, pp. 109-118, 1962.

[7] F. Tajima, "Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism," *Genetics,* vol. 123, no. 3, pp. 585-595, 1989.

[8] T. Weihong, K. Wang and T. Drake, "Molecular beacons," *Current Opinion in Chemical Biology,* vol. 6, no. 4, pp. 547-553, 2004.

[9] F. Caruso, E. Rodd and N. Furlong, "Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization and Hybridization for Nucleic Acid Sensor Development," *Analytical Chemistry,* vol. 69, no. 11, pp. 2043-2049, 1997.

[10] J. I. A. Rashida and A. N. Yusofb, "The strategies of DNA immobilization and hybridization detection," *Sensing and Bio-Sensing Research,* vol. 16, pp. 19-31, 2017.

[11] V. Huss, H. Festl and H. K. Schleifer, "Studies on the Spectrophotometric Determination of DNA Hybridizationfrom Renaturation Rates," *System. Appl. Microbiol.,* vol. 4, no. 2, pp. 184-192, 1983.

[12] J. G. Wetmur, "DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridization," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology,* vol. 3, no. 26, pp. 227-259, 1991.

[13] O. Yoshio, K. Masanori , K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa and Y. Ebara, "Kinetic Measurements of DNA Hybridization on an Oligonucleotide-Immobilized 27-MHz Quartz Crystal Microbalance," *Analytical Chemestry,* vol. 7, no. 70, pp. 1288-1296, 1998.

[14] D. Erickson, D. Li and U. Krull, "Modeling of DNA hybridization kinetics for spatially resolved biochips," *Analytical Biochemistry,* vol. 317, no. 2, pp. 186-200, 2003.

[15] P. R. Wallace, "The Band Theory of Graphite," *Phys. Rev,* vol. 71, no. 9, p. 337, 1947.

[16] A. H. C. Neto, F. Guinea, N. M. Peres, K. S. Novoselov and K. A. Geim, "The electronic properties of graphene," *Reviews of Modern Physics,* vol. 81, no. 1, pp. 110-162, 2009.

[17] A. K. GEIM and K. S. NOVOSELOV, "The rise of graphene," *Nature Materials,* vol. 6, pp. 183-191, 2007.

[18] S. D. Sarma, S. Adam, E. H. Hwang and E. Rossi, "Electronic transport in two-dimensional graphene," *Reviews of Modern Physics,* vol. 83, no. 2, pp. 407-470, 2011.

[19] J.-H. Chen, W. G. Cullen, C. Jang, M. S. Fuhrer and E. D. Williams, "Defect scattering in graphene," *Physical Review Letters,* vol. 102, no. 23, pp. 236805-236828, 2009.

[20] J.-H. Chen, C. Jang, . S. Adam and M. S. Fuhrer, "Charged-impurity scattering in graphene," *Nature Physics,* vol. 4, pp. 377-381, 2008.

[21] G. Filippo, R. Vito and E. Rimini, "Transport properties of graphene with nanoscale lateral resolution," *NanoScience and Technology,* vol. 38, pp. 247-285, 2011.

[22] C. R. Dean, A. F. Young, I. Meric, C. Lee, L. Wang, S. Sorgenfrei, K. Watanabe, T. Taniguchi, P. Kim, K. . L. Shepard and J. Hone, "Boron nitride substrates for high-quality graphene electronics," *Nature,* vol. 5, pp. 170-171, 2009.

[23] K. Bolotin, K. J. Sikes, Z. Jiang, M. Klima, G. Fudenberg, J. Hone, P. Kim and H. L. Stormer, "Ultrahigh electron mobility in suspended graphene," *Solid State Communications,* vol. 146, no. 9, pp. 351-355, 2008.

[24] K. S. Novoselov, . A. . K. Geim, S. . V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, . I. V. Grigorieva and A. A. Firsov, "Electric field effect in atomically thin carbon films," *Science,* vol. 306, no. 5696, pp. 666-669, 2004.

[25] K. V. Emtsev, A. Bostwick, K. Horn, J. Jobst, G. Kellogg, L. Ley, J. L. McChesney, T. Ohta, S. A. Reshanov, J. Röhrl, E. Rotenberg, A. K. Schmid, D. Waldmann, H. B. Weber and T. Seyller, "Towards wafer-size graphene layers by atmospheric pressure graphitization of silicon carbide," *Nature Materials,* vol. 4, no. 8, pp. 203-207, 2009.

[26] K. S. Kim, Y. Zhao, H. Jang, Y. S. Lee, J. . M. Kim, K. . S. Kim, J.-H. Ahn, P. Kim, J.-Y. Choi and B. . H. Hong, "Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes," *Nature,* vol. 4, no. 457, pp. 706-710, 2009.

[27] L. Xuesong, C. . W. Magnuson, A. Venugopal, J. An, J. W. Suk, B. Han, M. Borysiak, W. Cai, A. Velamakanni, Y. Zhu, L. Fu, E. M. Vogel, E. Voelkl, L. Colombo and R. S. Ruoff, "Graphene film with large domain size by a two-step chemical vapor deposition process," *Nano Letters,* vol. 10, no. 11, pp. 4328-4334, 2010.

[28] A. A. Balandin, S. Ghosh, W. Bao, I. Calizo, D. Teweldebrhan, F. Miao and C. N. Lau, "Superior thermal conductivity of single-layer graphene," *Nano Letters,* vol. 8, no. 3, pp. 902-907, 2008.

[29] C. Lee, X. Wei, J. . W. Kysar and J. Hone, "Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene," *Science,* vol. 321, no. 5887, pp. 385-388, 2008.

[30] R. R. Nair, P. Blake, A. N. Grigorenko, K. S. Novoselov, T. J. Booth, T. Stauber, . N. M. Peres and A. K. Geim, "Fine structure constant defines visual transparency of graphene," *Science,* vol. 320, no. 5881, pp. 1308-1308, 2008.

[31] H. William and R. Offeman, "Preparation of graphitic oxide," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 1, pp. 1339-1339, 1958.

[32] I.Forbeaux, J.-M. Themlin and J.-M. Debever, "High-temperature graphitization of the 6h-sic (0001) face," *Surface Science,* vol. 442, no. 1, pp. 9-18, 199.

[33] K. V. Emtsev, A. Bostwick, K. Horn, J. Jobst, G. L. Kellogg, L. Ley, J. L. McChesney, T. Ohta, S. A. Reshanov, . E. Rotenberg, A. K. Schmid, D. Waldmann, . H. B. Weber and T. Seyller, "Atmospheric pressure graphitization of sic (0001)-a route towards wafer-size graphene layers," *Materials Science,* vol. 12, pp. 1-12, 2008.

[34] T. A. Land, T. Michely, R. J. Behm, J. C. Hemminger and G. Comsa, "Stm investigation of single layer graphite structures produced on pt (111) by hydrocarbon decomposition," *Surface Science,* vol. 264, no. 3, pp. 261-270, 1992.

[35] A. L. V. d. Parga, F. Calleja, B. Borca, G. Passeggi, J. J. Hinarejos, F. Guinea and R. Miranda, "growth and spatially resolved electronic," *Physical Review Letters,* vol. 100, no. 5, pp. 056807-056907, 2008.

[36] J. Coraux, A. T. N'Diaye, C. Busse and T. Michely, "Coherency of graphene on ir (111)," *Nano Letters,* vol. 8, no. 2, pp. 565-570, 2008.

[37] A. Reina, X. Jia, J. Ho, D. Nezich, H. Son, V. Bulovic, M. S. Dresselhaus and J. Kong, "Large area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition," *Nano Letters,* vol. 9, no. 1, pp. 30-35, 2008.

[38] X. Li, . W. Cai, J. An, . S. Kim, J. Nah, . D. Yang, . R. Piner, . A. Velamakanni, I. Jung, . E. Tutuc, S. K. Banerjee, L. Colombo and R. Ruoff, "Large-area synthesis of high-quality and uniform graphene films on copper foils," *Science,* vol. 324, no. 5932, pp. 1312-1314, 2009.

[39] C. V. RAMAN and K. S. KRISHNAN , "A new type of secondary radiation," *Nature,* vol. 2, no. 121, pp. 501-502, 1928.

[40] Y. Wang, D. Alsmeyer and R. L. McCreery, "Raman spectroscopy of carbon materials: structural basis of observed spectra," *Chemistry of Materials,* vol. 5, no. 2, pp. 557-563, 1990.

[41] A. C. Ferrari and D. M. Basko, "Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene," *Nature Nanotechnology,* vol. 11, pp. 235-246, 2013.

[42] D. M. Basko, S. Piscanec and A. C. Ferrari, "Electron-electron interactions and doping dependence of the two-phonon raman intensity in graphene," *Physical Review,* vol. 80, pp. 165413-165423, 2009.

[43] C. Casiraghi, A. Hartschuh, H. Qian, S. Piscanec, C. Georgi, A. Fasoli, K. S. Novoselov, D. M. Basko and A. C. Ferrari, "Raman spectroscopy of graphene edges," *Nano Letters,* vol. 9, pp. 1433-1441, 2009.

[44] A. C. Ferrari, J. C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, D. Jiang, K. S. Novoselov, S. Roth and A. K. Geim, "Raman spectrum of graphene and graphene layers," *Physical Review Letters,* vol. 97, no. 8, p. 187401, 2006.

[45] S. Pisana, M. Lazzeri, C. Casiraghi, K. S. Novoselov, A. K. Geim, A. C. Ferrari and F. Mauri, "Breakdown of the adiabatic born–oppenheimer approximation in graphene," *Nature materials,* vol. 6, p. 198–201, 2007.

[46] A. Das, S. Pisana, B. Chakraborty, S. Piscanec, S. K. Saha, U. V. Waghmare, K. S. Novoselov, H. R. Krishnamurthy, A. K. Geim, A. C. FErrari and A. K. Sood, "Monitoring dopants by raman scattering in an electrochemically top-gated graphene transistor," *Nature Nanotechnology,* vol. 3, pp. 210-215, 2008.

[47] Graphenano, "GRAPHENANO S.L.," 2019. [Online]. Available: www.graphenano.com. [Accessed 15 Juillet 2019].

[48] Graphmatech, "Graphmatech," 01 Avril 2019. [Online]. Available: https://www.graphmatech.com. [Accessed 22 Juillet 2019].

[49] GrapheneFrontiers, "graphenefrontiers.com," Graphene Frontiers, 3624 Market Street, 5th Floor E, Philadelphia, Pennsylvania 19104, [Online]. Available: http://graphenefrontiers.com. [Accessed 15 Juillet 2019].

[50] Graphenea, "https://www.graphenea.com/pages/about-us-a-specialist-graphene-manufacturer-producer-supplier," Graphenea Headquarters, Paseo Mikeletegi 83, 20009 - San Sebastián, SPAIN, [Online]. Available: https://www.graphenea.com/pages/about-us-a-specialist-graphene-manufacturer-producer-supplier. [Accessed 15 Juillet 2019].

[51] Vorbeck, "https://vorbeck.com," 8306 Patuxent Range Road, Unit 105, Jessup, Maryland 20794, [Online]. Available: https://vorbeck.com. [Accessed 15 Juillet 2019].

[52] F. Flagship, "https://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/h2020-section/fet-flagships," [Online]. Available: https://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/h2020-section/fet-flagships. [Accessed 15 Juillet 2019].

[53] Grapheal, "http://www.grapheal.com," 25 rue des Martyrs, 38000 Grenoble - FRANCE, Avril 2019. [Online]. Available: http://www.grapheal.com. [Accessed 15 Juillet 2019].

[54] David, "https://www.papergeek.fr/batterie-au-graphene-avantages-fonctionnement-differences-avec-li-ion-tout-savoir-sur-energie-du-futur-79991," 15 Janvier 2019. [Online]. [Accessed 15 Juillet 2019].

[55] GraphAir, "https://www.csiro.au/en/Do-business/Commercialisation/Marketplace/GraphAir," 27 Juin 2019. [Online]. [Accessed 15 Juillet 2019].

[56] C.-M. Tîlmaciu and M. C. Morris, "Carbon nanotube biosensors," *Frontiers in Chemistry ,* vol. 3, p. 59, 2015.

[57] L. C. C. Jr and L. Champ, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Annals of the New York Academy of Sciences,* vol. 102, p. 29, 1962.

[58] B. Rivollet, "Les biocapteurs comme système d'alerte et de suivi d'une pollution environnementale," *Instituts Carnot BRGM,* p. 11, 2015.

[59] R. Khoder, Elaboration de biocapteurs électrochimiques d' ADN à base denano-structures de polypyrrole pour le diagnostic de la tuberculose, Paris: UniversitéParis-Saclay, 2018.

[60] OlivierLazcka, J. F. Del Campo and X. F. Muñoza, "Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 12, no. 22, pp. 1205-1217, 2007.

[61] Y. H. Kwak, D. S. Choib, Y. N. Kim, H. Kim, D. HoYoon, Sang-SikAhn, Ji-WoonYang, W. SeokYang and S. Seo, "Flexible glucose sensor using CVD-grown graphene-based field effect transistor," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 37, no. 1, pp. 82-87, 2012.

[62] F. Schedin, A. K. Geim, S. V. Morozov, E. W. Hill, P. Blake, M. I. Katsnelson and K. S. Novoselov, "Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene," *Nature Materials,* vol. 3, pp. 652-655, 2007.

[63] H. J. Yoona, H. D. Jun, H. J. Yang, Z. Zhou, S. S. Yang and M.-C. M. Cheng, "Carbon dioxide gas sensor using a graphene sheet," *Sensors and Actuators,* vol. 157, no. 1, p. 925, 2010.

[64] Y. Ohno, K. Maehashi, Y. Yamashiro and K. Matsumoto, "Electrolyte-gated field effect Transistors for Detection of pH and protein adsorption," *Nano Letter,* vol. 9, no. 9, pp. 3318-3322, 2009.

[65] P. K. Ang, W. Chen, S. A. Wee and P. K. Loh, "Solution-Gated Epitaxial Graphene as pH sensor," *J. Am. Chem. Soc,* vol. 130, no. 44, pp. 14392-14393, 2008.

[66] C. F. Brunkab and L. Simpson, "Comparison of Various Ultraviolet Sources for Fluorescent Detection of Ethidium Bromide-DNA Complexes in Polyacrylamide Gels," *Analytical Biochemistry,* vol. 82, no. 2, pp. 455-462, 1977.

[67] A. Blin, I. Cissé and U. Bockelmann, "Electronic hybridization detection in microarray format and DNA genotyping," *Scientific Reports,* vol. 4, pp. 1-5, 2014.

[68] N. Mohanty and V. Berry, "Graphene-based single-bacterium resolution biodevice and DNA transistor: interfacing graphene derivatives with nanoscale and," *Nano Letter,* vol. 8, no. 12, pp. 4469-4476, 2008.

[69] Y. Dan, Y. Lu, N. J. Kybert, Z. Luo and C. Johnson, "Intrinsic response of graphene vapor sensors," *Nano Lett,* vol. 4, no. 9, pp. 1472-1475, 2009.

[70] N. J. Kybert, H. G. Han, M. B. Lerner, E. N. Dattoli, A. Esfandiar and C. A. Johnson, "Scalable arrays of chemical vapor sensors based on DNA-decorated graphene," *Nano Res,* vol. 8, pp. 95-103, 2014.

[71] R. Campos, J. Borme, R. J. Guerreiro, G. Machado, F. M. Cerqueira and D. Y. Petrovykh, "Attomolar Label-Free Detection of DNA Hybridization with Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistors," *ACS Sensors,* vol. 7, pp. 286-293, 2019.

[72] C. Lin, K. T. Loan , T. Chen, K. Liu , C. Chen, K. Wei and L. Li , "Label-free electrical detection of DNA hybridization on graphene using hall effect," *Adv. Funct. Mater,* vol. 23, no. 18, pp. 2301-2307, 2013.

[73] X. Dong, Y. Shi, W. Huang , P. Chen and L. Li , "Electrical detection of DNA hybridization with single-base specificity using transistors based on CVD-grown graphene sheets," *Adv. Mater,* vol. 22, no. 14, pp. 1649-1653, 2010.

[74] A. Das, S. Pisana, B. Chakraborty,, S. Piscanec, S. K. Saha, U. V. Waghmare, K. S. Novoselov, H. R. Krishnamurthy, A. K. Geim, A. C. Ferrari and A. K. Sood, "Monitoring dopants by Raman scattering in an electrochemically top-gated graphene transistor," *Nat. Nanotechnol,* vol. 3, pp. 210-215, 2009.

[75] F. Chen, Q. Qing, J. Xia, J. Li and N. Tao, "Electrochemical gate-controlled charge transport in graphene in ionic liquid and aqueous solution," *J. Am. Chem. Soc.,* vol. 139, no. 29, pp. 9908-9909, 2009.

[76] Y. Y. Wang and P. J. Burke, "A large-area and contamination-free graphene transistor for liquid-gated sensing applications," *Appl. Phys. Lett,* vol. 103, pp. 052103-052107, 2013.

[77] M. B. Lerner, J. M. Resczenski, A. Amin, R. R. Johnson, J. I. Goldsmith and C. A. Johnson, "Toward quantifying the electrostatic transduction mechanism in carbon nanotube molecular sensors," *J. Am. Chem. Soc,* vol. 134, no. 35, pp. 14318-14321, 2012.

[78] N. Mohanty and V. Berry, "Graphene-Based Single-Bacterium Resolution Biodevice and DNA Transistor: Interfacing Graphene Derivatives with Nanoscale and Microscale Biocomponent," *Nano lett,* vol. 8, no. 12, pp. 469-476, 2008.

[79] Z. Yin, Q. He, X. Huang, J. Zhang, S. Wu, P. Chen, G. Lu, P. Chen, Q. Zhang, Q. Yan and H. Zhang , "Real-time DNA detection using Pt nanoparticle-decorated reduced graphene oxide," *Nanoscale,* vol. 4, pp. 293-297, 2012.

[80] Rui Campos, Jérôme Borme, Joana Rafaela Guerreiro and J. George Machado, "Attomolar Label-Free Detection of DNA Hybridization with Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistors," *ACS Sensors,* vol. 4, no. 2, pp. 286-293, 2019.

[81] X. Li, Y. Zhu, W. Cai, M. Borysiak, B. Han, D. Chen, R. D. Piner, L. Colombo and R. S. Ruoff, "Transfer of Large-Area Graphene Films for High-Performance Transparent Conductive Electrodes," *Nano Lett,* vol. 12, no. 9, pp. 4359-4363, 2009.

[82] J. W. Suk, A. Kitt, C. W. Magnuson, Y. Hao, S. Ahmed, J. An, A. K. Swan, B. B. Goldberg and R. S. Ruoff, "Transfer of CVD-Grown Monolayer Graphene onto Arbitrary Substrates," *ACS NANO,* vol. 5, no. 9, pp. 6916-6924, 2011.

[83] X. Li, Y. Zhu, W. Cai, M. Borysiak, B. Han, D. Chen, R. D. Piner, L. Colombo and R. S. Ruoff, "Transfer of Large-Area Graphene Films for High-Performance Transparent Conductive Electrodes," *Nano Lett,* vol. 9, no. 12, pp. 4359-4363, 2009.

[84] X. Wang, S. M. Tabakman and H. Dai, "Atomic Layer Deposition of Metal Oxides on Pristine and Functionalized Graphene," *J. Am. Chem. Soc.,* vol. 130, no. 26, pp. 8152-8153, 2008.

[85] B. Lee, S.-Y. Park, H.-C. Kim, K. Cho, E. M. Vogel, M. J. Kim, R. M. Wallace and J. Kima, "Conformal Al2O3 dielectric layer deposited by atomic layer deposition," *Appl. Phys. Lett,* vol. 92, pp. 203102-203105, 2008.

[86] L. Zheng, X. Cheng, D. Cao, Z. Wang, C. Xia, Y. Yu1 and D. Shen, "Property transformation of graphene with Al2O3 films deposited directly," *Appl. Phys. Lett.,* vol. 104, pp. 023112-023117, 2014.

[87] S. Mzali, A. Montanaro, S. Xavier, B. Servet, J.-P. Mazellier, O. Bezencenet, P. Legagneux, M. Piquemal-Banci, R. Galceran, B. Dlubak, P. Seneor, M.-B. Martin, S. Hofmann and J. Robertson, "Stabilizing a graphene platform toward discrete components," *Appl. Phys. Lett.,* vol. 109, pp. 253110 - 2531115, 2016.

[88] K. MENSAH and U. Bockelmann, "Procédé de fabrication par lithographie". French Patent FR1907342, 02 Juillet 2019.

[89] R. H. J. Vervuurt, B. Karasulu, M. A. Verheijen, W. M. Kessels and A. A. Bol, "Uniform Atomic Layer Deposition of Al2O3 on Graphene by Reversible Hydrogen Plasma Functionalization," *Chemistry of Materials,* vol. 29, no. 5, pp. 2090-2100, 2017.

[90] S. Mzali, "Méthodologie de fabrication de transistors à base de Graphène : application aux composants optoélectroniques hyperfréquences," Université Paris-Saclay, Paris, 2016.

[91] R. W. Bonner, J. Weyant, E. Fleming, K. Lu and D. Reist, "Passivation Coatings for Micro-channel Coolers," *IEEE Applied Power Electronics Conference and Exposition ,* vol. 11, pp. 498-501, 2012.

[92] F. Schedin, A. K. Geim, S. V. Morozov, E. W. Hill, P. Blake, M. I. Katsnelson and K. S. Novoselov, "Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene," *Nat. Mater,* vol. 6, p. 652, 2007.

[93] A. A. Sagade, D. Neumaier, D. Schall, M. Otto, A. Pesquera, A. Centeno, A. Z. Elorza and H. Kurza, "Highly air stable passivation of graphene based field effect devices," *Nanoscale,* vol. 7, pp. 3558-3564 , 2015.

[94] A. Venugopal, L. Colombo and E. M. Vogel, "Contact resistance in few and multilayer graphene devices," *Applied Physics Letters,* vol. 96, pp. 013512-013515, 2009.

[95] T. Lohmann, K. v. Klitzing and J. H. Smet, "Four-Terminal Magneto-Transport in Graphene p-n Junctions Created by Spatially Selective Doping," *Nano Lett,* vol. 9, no. 5, pp. 1973-1979, 2009.

[96] P. Joshi, H. E. Romero, A. T. Neal, V. K. Toutam and S. A. Tadigadapa, "Intrinsic doping and gate hysteresis in graphene field effect devices fabricated on SiO2 substrates," *Journal of Physics: Condensed Matter,* vol. 22, no. 33, pp. 334214-334220, 2010.

[97] K. Nagashioa, T. Nishimura, K. Kita and A. Toriumi, "Contact resistivity and current flow path at metal/graphene contact," *Appl. Phys. Lett,* vol. 97, pp. 143514-143517, 2010.

[98] P. François, "Détection de molécules d'ADN sur transistors à effet de champ," Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, Paris, 2004.

[99] S.-K. H. F.-Y. Lo, C.-C. Hsieh et L. Chao, «Sensing Ability and Formation Criterion of Fluid Supported Lipid,» *ACS Sens,* vol. 44, pp. 892-899, 2019.

[100] P. Simon and Y. Gogotsi, "Charge storage mechanism in nanoporous carbons and its consequence for electrical double layer capacitors," *Royal Society,* vol. 368, pp. 3457-3466, 2010.

[101] H. Wang and L. Pilon, "Accurate simulations of electric double layer capacitance of ultramicoelectrodes," *Phys. Chem,* vol. 15, no. 33, pp. 16711-16719, 2011.

[102] P. K. Ang, W. Chen, A. T. S. Wee and K. P. Loh, "Solution-Gated Epitaxial Graphene as pH Sensor," *J. Am. Chem. Soc.,* vol. 44, no. 130, pp. 14392-14393, 2008.

[103] Y. Chen, X. Wang, S. Erramilli and P. Mohantya, "Silicon-based nanoelectronic field-effect pH sensor with local gate control," *Applied Physics Letters,* vol. 89, no. 3, pp. 223512-223515, 2006.

[104] R. C. WILLIAMS, "Use of polylysine for adsorption of nucleic acids and enzymes to electron micro-scope specimen films," *PNAS,* vol. 74, no. 6, pp. 585-591, 1977.

[105] M. P.Coughlan, M. P.J.Kierstan, P. M.Border and A. P.F.Turner, "Analytical applications of immobilized proteins and cells," *Microbiol Methods,* vol. 8, pp. 1-50, 1988.

[106] M. K. Beissenhirtz, F. W. Scheller, M. S. Viezzoli and F. Lisdat, "Engineered Superoxide Dismutase Monomers for Superoxide Biosensor Applications," *Anal. Chem.,* vol. 78, no. 3, pp. 928-935, 2006.

[107] K. Schueger, "Use of membranes in chemical and biochemical sensors," *GBF Monogr Ser,* no. 9, pp. 77-92, 1986.

[108] S. W. Morf WE, "Carrier based biosensor," *GBF Monogr Ser,* no. 10, pp. 13-21, 1987.

[109] K. UJ, "Lipid membrane dipolar potential control for electrochemical biosensor development," *J Electrochem Soc,* vol. 5, no. 134, pp. 1432-1437, 1987.

[110] Y. P, "Functional recognition of a membrane protein in diacetylenic polymedzable lecithin," *Biosensors,* vol. 10, no. 2, pp. 363-373, 1986.

[111] P. O. B. Michael B. Eisen, "DNA array for analysis of gene expression," *Methods in Enzymology,* vol. 303, pp. 179-205, 1999.

[112] D. Shalon, S. J. Smith and P. O. Brown, "A DNA micro-array system for analysing complex DNA samples using two-color fluorescence probe hybridization," *Genome Res,* vol. 6, pp. 639-645, 1996.

[113] BrownLab, "Brown lab. Site Internet : http ://cmgm.stanford.edu/pbrown".

[114] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown, "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Micro-array," *Science,* vol. 270, no. 20, pp. 467-470, 1995.

[115] T.-Y. Chen, P. T. K. Loan, Chang-LungHsu, Yi-HsienLee, JacobTse-WeiWang, K.-H. Wei, Cheng-TeLin and L.-J. Li, "Label-free detection of DNA hybridization using transistors based on CVD grown graphene," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 41, pp. 103-109, 2013.

[116] Y. Liua and R. W. Dutton, "Effects of charge screening and surface properties on signal transduction in field effect nanowire biosensors," *Journal of Applied Physics,* vol. 106, p. 014701, 2009.

[117] C. Gentil, G. Philippin and U. Bockelman, "Signal enhancement in electronic detection of DNA hybridization," *Phys. Rev.,* vol. 75, no. 1, pp. 011926-011930, 2007.

[118] S.-K. Hu, F.-Y. Lo, C.-C. Hsieh and L. Chao, "Sensing Ability and Formation Criterion of Fluid Supported Lipid Bilayer coated graphene Field effect Transistor," *ACS Sensors,* vol. 44, pp. 892-899, 2019.

[119] W. Fu, L. Jiang, E. P. v. Geest, L. M. C. Lima and G. F. Schneider, "Sensing at the surface of graphene field-effect transistors," *Adv. Mater,* vol. 29, no. 6, p. 1603610, 2017.

[120] F. Chen, J. Xia and N. Tao, "Ionic screening of charged-impurity scattering in graphene," *Nano Lett.,* vol. 4, no. 9, pp. 1621-1625, 2009.

[121] I. Cissé, "Construction de séquences périodiques d'ADN: Mesure de forces et détection de mutations," Université Pierre et Marie Curie- Paris VI, Paris, 2011.

[122] U. Bockelmann, I. Cissé and V. Viasnoff, "Procédé de détection d'un ADN circularisé et utilisation de ce procédé pour la détection de mutations". France Février 2011.

[123] J. Fritz, E. B. Cooper , S. Gaudet, P. K. Sorger and S. R. Manalis, "Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge," *PNAS,* vol. 99, no. 22, pp. 14142-14146, 2002.

[124] L. Wang, X. Xu, L. Zhang, R. Qiao, M. Wu, Z. Wang, S. Zhang, J. Liang, Z. Zhang, Z. Zhang, W. Chen, X. Xie, J. Zong, Y. Shan, Y. Guo, M. Willinger, H. Wu, Q. Li, W. Wang, P. Gao and S. Wu, "Epitaxial growth of a 100-square-centimetre singlecrystal-crystal hexagonal boron nitride monolayer on copper," *Nature,* vol. 570, pp. 91-95, 2019.

[125] «http://tpe-fish-fluorescence.e-monsite.com/pages/fish.html#haut3,» [En ligne].

[126] J. I. A. Rashida, «The strategies of DNA immobilization and hybridization detection,» *Sensing and Bio-Sensing Research,* p. 19–31, 2017.

[127] F. Chen, « Ionic screening of charged-impurity scattering in graphene,» *Nano Lett,* p. 1621–1625., 2009.

[128] F. Chen, «Ionic screening of charged-impurity scattering in graphene,» *Nano Lett,* p. 1621–1625., 2009.

[129] F. Chen, «Ionic screening of charged-impurity scattering in graphene,» *Nano Lett,* p. 1621–1625, 2009.

[130] J.-H. Chen, «Intrinsic and extrinsic performance limits of graphene devices on sio2,» *Nature nanotechnology,* p. 206–209, 2008.

[131] Y. y. Wang, Z. h. Ni, T. Yu, Z. X. Shen, H. m. Wang, Y. h. Wu, W. Chen and A. T. S. Wee, "Raman studies of monolayer graphene : thesubstrate effect," *The Journal of Physical Chemistry C,* vol. 29, no. 112, p. 10637–10640, 2008.

[132] A. Kästne, "Détermination du point de fusion de l'ADN et de l'ARN avec la série SPECORD," *LA GAZETTE DU LABORATOIRE,* vol. 1, no. 168, p. 24, 2011.

[133] S. Lee and Z. Zhong, "Nanoelectronic circuits based on two-dimensional atomic layer crystals," *Nanoscale,* vol. 17, no. 6, pp. 13283-13300, 2014.

[134] R. L'Italien, "Structure de l'ADN," *Extrait de Immunohématologie,* vol. 8, pp. 134-142, 2008.

[135] J.-F. Pinton, "Biologie moléculaire et cellulaire," Institut français de l'Éducation, Lyon.

[136] Jackson, "Conjugués de PerCP pour la cytométrie en flux," Jackson Immuno Research, Angleterre, 2008.

[137] R. W. Bonner, J. Weyant, E. Fleming, K. Lu and D. Reist, "Passivation Coatings for Micro-channel Coolers," *2012 Twenty-Seventh Annual IEEE Applied Power Electronics Conference and Exposition ,* vol. 4, p. 498–502, 2012.

[138] M. J. McAllister, J.-L. Li, D. H. Adamson, H. C. Schniepp, A. A. Abdala, J. Liu, M. Herrera-Alonso, D. L. Milius, R. Car, R. K. Prud'homme and I. A. Aksay, "Single Sheet Functionalized Graphene by Oxidation and Thermal Expansion of Graphite," *Chem. Mater,* vol. 18, no. 19, pp. 4397-4404, 2007.

RÉSUMÉ

L'objectif de cette thèse est la détection électronique de l'hybridation de l'ADN par un réseau de transistors à effet de champ à base de graphène.

Dans une première partie, nous avons utilisé la technique de détection par fluorescence pour étudier l'influence de certains facteurs comme la température, la force ionique du milieu réactionnel, la concentration des sondes et des cibles et la durée de l'hybridation. Cette étude nous a permis de trouver des conditions optimales pour la réaction d'hybridation des oligonucléotides étudiés.

La deuxième partie est consacrée à la fabrication des puces. Des techniques originales de transfert du graphène Cu-CVD et de photolithographie ont été développées pour fabriquer des puces assez homogènes à faible niveau de dopage du graphène. Des études comparatives des matériaux pour les électrodes de contact ont permis de faire des recuits si besoin, afin de réduire le dopage et améliorer la mobilité des transistors sans dégrader les contacts. Nous avons étudié différents types et épaisseurs de couches de passivation pour trouver un compromis entre la stabilisation des caractéristiques et leur sensibilité aux biomolécules.

La troisième partie est dédiée aux applications de détection. Les molécules sondes (ssDNA) sont immobilisées sur la puce par l'intermédiaire de la polylysine (PLL), un polymère chargé positivement. L'adsorption de ce polymère induit un décalage du point de Dirac vers le sens positif des tensions de grille alors que la fixation des oligonucléotides sondes chargés négativement produit un décalage dans le sens opposé. Nous avons pu détecter la réaction d'hybridation entre les sondes et leurs cibles complémentaires (cDNA) par des mesures différentielles et des mesures en temps réel in situ.

MOTS CLÉS

Graphène, Transistors, ADN, Polylysine, Hybridation, Détection

ABSTRACT

This work focuses on using graphene field effect transistors (GFETs) arrays for electronic detection of DNA hybridization.

In the first part, we employ fluorescence based detection to study some parameters that influence DNA hybridization, such as temperature, buffer ionic strength, probe and target concentrations and hybridization duration. Conditions for DNA hybridization have been optimized by this technique.

The second part of the manuscript is devoted to device fabrication. Original methods have been developed for the transfer of graphene grown by CVD on copper foil to Si/SiO_2 substrates, as well as for the patterning of the graphene sheet into GFET arrays. Device performance is improved after annealing in vacuum at 280°C for 24 hours if needed. Passivation layers are used for time stability of the transistor characteristics and the sensitivity.

In the third section, we describe the electronic detection of DNA hybridization by the GFET array device. Single stranded DNA (ssDNA) is immobilized on a poly-L-lysine (PLL) coated chip surface. The adsorption of a positively charged PLL polymer induces a right shift of the Dirac point whereas adsorption of negatively charged DNA probes triggers a left shift. Differential and real time in situ measurements are performed to characterize DNA hybridization.

KEYWORDS

Graphene, Transistor, DNA, Polylysine, Hybridization, Detection