



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCCEN

THÈSE

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE PHYSIQUE

Pour l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT EN PHYSIQUE

Spécialité : Physique énergétique et matériaux

Par :

M^{lle}. KHALDI Khadidja

Sur le thème

L'immobilisation d'Acétylcholinestérase sur Silicium/ Silicium poreux fonctionnalisé : Application à la Réalisation de biocapteurs ampérométriques pour la détection des substances

Soutenue publiquement le 19-04-2016 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr Redouane BACHIR	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mme Nassera GHELLAI	Professeur	Université de Tlemcen	Directeur de thèse
Mr Nouredinne GABOUZE	Directeur de Recherche	CRTSE	Co-Directeur de thèse
Mr Nasredine CHABANE SARI	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mr Abdedaiem KADOUN	Professeur	Université de Sidi-Bel-Abbès	Examineur
Mr Aissa KEFFOUS	Directeur de Recherche	CRTSE	Examineur
M ^{lle} Sabrina SAM	Maitre de Recherche A	CRTSE	Invitée

*Unité de Recherche des Matériaux et Energie Renouvelable (URMER)
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

DEDICACES

A la mémoire de ma mère

A mon père

A ma sœur :Souheyla

A mes frères:

Ilyes , Mohamed et Wail Abdellah

A ma belle sœur Sara

REMERCIEMENTS

Mes remerciements, avant tous, à notre DIEU « ALLAH » tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a données durant ces longues années d'études afin que je puisse arriver à ce stade.

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le Centre de Recherche en Technologie des Semi-Conducteurs pour l'Energétique (CRTSE) à Alger et l'Unité de Recherche en Matériaux et Energies Renouvelables (URMER), du département de Physique, à la Faculté des Sciences de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen.

Cette thèse a été réalisée sous la direction de Mme Nassera GHELLAI, Professeur à l'Université de Tlemcen. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma profonde gratitude de m'avoir encouragée à progresser et aller de l'avant. Je la remercie vivement pour ses remarques pertinentes et ses conseils qui m'ont été très précieux.

Cette thèse a également été réalisée sous la codirection de Mr Nour-Eddine GABOUZE, Directeur du Centre de Recherche en Technologie des Semi-Conducteurs pour l'Energétique CRTSE. Je lui adresse mes vifs remerciements pour sa disponibilité et son expertise scientifique qui ont été d'un grand appui pour le bon déroulement de mes travaux de thèse. Je souhaite également lui exprimer ma reconnaissance pour sa confiance durant les années passées à travailler au sein de son équipe et qui m'ont permis d'évoluer et pour m'avoir inculquée des qualités d'un chercheur.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde gratitude à Mr Radoan BACHIR, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen, pour avoir accepté d'honorer de présider le Jury.

Que les honorables membres du jury, Mr Aissa KEFFOUS, Directeur de Recherches au CRTSE, Mr Abdedaiem KADOUN, Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbés, Mr Nasr Eddine CHABANE SARI, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen et Melle Sabrina SAM Maitre de Recherches au CRTSE, veuillent croire en mes remerciements anticipés pour avoir bien voulu accepter d'enrichir et d'évaluer ce travail.

Je remercie tout particulièrement Melle Sabrina SAM, Maitre de Recherches au CRTSE d'avoir accepté d'honorer par sa présence le jury comme experte

invitée. Mon histoire dans la grande aventure des biomatériaux n'aurait jamais démarrée sans ces précieux conseils. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa rigueur et sa grande disponibilité durant le temps passé au CRTSE ainsi que les nombreuses discussions fructueuses m'ont permis de résoudre les nombreux problèmes rencontrés au cours de cette thèse.

Ces travaux de thèse n'auraient pas été aussi riche sans l'aide de toute l'équipe CMA11 et la bonne humeur qui règne au sein du laboratoire. Un grand Merci donc à Karima BELDJILALI, Malika BEROUAKEN, Chafiaa YADDADEN, Katia CHEBOUT, Hocine CHERAGA, Maha AYAT, Amel LOUNES et Nihad FORTAS.

Mes remerciements vont également vers les membres de l'équipe CMA 14 Nawel CHIBOUB, Samia BELHOUSSE, Fatma-Zohra TIGHILT, et Kahina LASMI qui m'ont souvent soutenue et encouragée en créant une bonne ambiance de travail.

Les membres de l'équipe CMA12 et particulièrement son chef d'équipe Mr Aissa KEFFOUS qui était toujours prêt à rendre service avec bonne humeur, Lamia TALBI, Nabila RAJDEL Assia BOUKEZZATA, Muhand AREZQI et Abdelhak CHERIET qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier Amina KERMAD, tu as réussi à me supporter pendant les années les plus stressantes de ma vie et pour ça tu trouves ici toute les expressions de reconnaissance et de gratitude.

Aussi, je tiens à remercier mes camarades doctorantes au CRTSE, particulièrement Kawthar M'HAMMEDI, Nafissa ZEKRI et d'autres pour leurs soutiens et encouragements.

Au cours de cette thèse, j'ai eu le privilège de partir au Laboratoire Physique de la Matière condensée (LPMC) de l'Ecole polytechnique à Paris, en France, afin de réaliser une partie de ma thèse. Je tiens à remercier le Mr François OZANAM, Directeur du PMC, de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci à Anne-Chantal GOUGET-LAEMMEL, Anne MORAILLON, Catherine HENRY DE VILLENEUVE et Jie YONG pour la collaboration PMC/CRTSE. Ce travail en commun m'aura permis de découvrir et d'apprendre énormément de choses. Leur dynamisme unique a largement contribué à l'avancée des travaux sur la fonctionnalisation du silicium.

Enfin, je terminerai en remerciant mes chers parents qui ont toujours été près de moi ! et ma cher sœur Souheyla et mes chers frères : Ilyes, Mohamed et mon

adorable Wail Abdellahen termes de reconnaissance pour leur patience avec moi, leurs soutiens et leurs encouragements.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale	1
Chapitre I : Préparation de surfaces de silicium et de silicium poreux	
Partie I : Hydrogénation de la surface du silicium	10
1. Cristallographie	10
2. Mécanisme de l'hydrogénation de la surface de silicium	11
3. Mode opératoire	13
4. Caractérisation par microscopie à force atomique	14
5. Caractérisation par spectroscopie infrarouge	15
6. Caractérisation par angle de contact	16
Partie II : Préparation de silicium poreux (SiP)	18
1. Historique de silicium poreux	18
2. Régimes d'anodisation électrochimique : Caractéristique courant – tension (I-V)	19
3. Mécanisme de dissolution de Silicium	21
4. Caractéristiques du silicium poreux	22
4.1. Porosité	23
4.2. Surface spécifique	23
4.3. Epaisseur	23
4.4. Géométrie et morphologie	24
5. Propriétés du silicium poreux	25
5.1. Propriétés de luminescence	25
5.2. Propriétés chimiques	25
5.3. Biocompatibilité	26
5.4. Oxydation de silicium poreux	27
6. Les paramètres de fabrication	27
7. Réalisation et caractérisation de silicium poreux	28

7.1.	Procédé expérimental	28
7.2.	Cellule électrochimique	28
7.3.	Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage	29
7.4.	Caractérisation par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	30
7.5.	Angle de contact	30
8.	Caractérisation du silicium poreux oxydé	31
8.1.	Oxydation chimique	31
8.1.1.	Solution Piranha	31
8.1.2.	Caractérisation par spectroscopie infrarouge	32
	Conclusion	33
	Références	34
	Chapitre II : Fonctionnalisation des surfaces de silicium et de silicium poreux	39
	Partie I : Greffage covalent d'une monocouche organique	42
1.	Introduction	42
1.1.	Fonctionnalisation par silanisation	43
1.2.	Fonctionnalisation par Hydrosilylation	43
2.	Hydrosilylation photochimique des surfaces de Si-H et Si-H _x	46
2.1.	Mode opératoire	46
2.2.	Caractérisation par microscopie à force atomique	48
2.3.	Caractérisation par spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier en mode ATR (Attenuated Total Reflection)	48
2.4.	Angle de contact	50
3.	Hydrosilylation thermique d'acide undécylénique à la surface de silicium poreux	51
3.1.	Procédure expérimentale	51
3.2.	Caractérisation par angle de contact de silicium poreux après greffage de l'acide	53
3.3.	Caractérisation par spectroscopie infrarouge	53
4.	Silanisation par 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES)	55
4.1.	Procédure expérimentale	55
4.2.	Caractérisation par angle de contact de la surface de	55

silicium poreux après greffage de l'APTES	
4.3. Caractérisation FTIR de la surface de silicium poreux après greffage de l'APTES	56
Partie II : Préparation de la surface activée	58
1. Introduction	58
2. Activation de la surface de silicium greffée (Si-COOH)	59
2.1. Procédé expérimental	59
2.2. Caractérisation par microscopie à force atomique	60
2.3. Caractérisation par angle de contact	61
2.4. Caractérisation par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode ATR (Attenuated Total Reflection)	61
3. Activation de la surface de silicium poreux greffée (SiP-COOH)	62
3.1. Caractérisation par angle de contact	63
3.2. Caractérisation FTIR du SiP après activation	63
Partie III : Amidation des surfaces de silicium et silicium poreux modifiées	64
1. Introduction	64
2. Immobilisation d'Acétylcholinestérase sur les surfaces Si-COOSuc Activée	67
2.1. Procédure expérimentale	67
2.2. Caractérisation par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode ATR (Attenuated Total Reflection)	71
2.3. Caractérisation par microscopie à force atomique	71
2.4. Cinétique de l'immobilisation d'enzymes	72
3. Immobilisation d'Acétylcholinestérase (AChE) sur la surface de silicium poreux activée	76
3.1. Procédure expérimentale	76
3.2. Caractérisation par FTIR des surfaces immobilisées avec Acétylcholinestérase	77
4. Immobilisation d'Acétylcholinestérase sur la surface de silicium poreux silanisé par AP TES	78
4.1. Procédure expérimentale	78
4.2. Caractérisation par mesure de l'angle de contact des	79

surfaces immobilisées avec AChE	
4.3. Caractérisation par FTIR des surfaces immobilisées avec AChE	80
Références	81
Chapitre III : Etude de l'activité enzymatique d'AChE immobilisée sur silicium / silicium poreux par UV-Vis	85
1. Introduction	87
2. Organophosphorés	87
2.1. Données générales relatives au Malathion	88
3. Acétylcholinestérase	90
3.1. Rôle physiologique et structure	90
4. Inhibition	92
5. Réactivation d'Acétylcholinestérase inhibée	92
6. Cinétique enzymatique	93
7. Méthode d'Ellman	97
Mode opératoire	98
1. Procédé expérimental	98
2. Évaluation de l'activité enzymatique	99
3. Activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase immobilisée sur une surface de silicium Poreux	102
Conclusion	104
Références	105

Chapitre IV : Etude électrochimique de l'activité de l'ACHé immobilisée sur le silicium poreux

1. Introduction	111
2. Biocapteurs ampérométriques	112
3. Voltampérométrie cyclique	
3.1. Principe de la méthode	113
3.2. Espèces redox en solution	114
4. Biocapteurs ampérométriques à base de SiP	115
5. Electrode du diamant dopé au Bore (DDB)	115
Procédé expérimental	117
1. Mode opératoire	117
1.1. Mesure électrochimique	117
1.2. Préparation de l'électrode de Si-PsAu-APTES-ACHé	118
1.3. Propriétés de l'électrode DDB	118
1.4. Comparaison entre les deux les électrodes Si-COOH et DDB	118
1.5. Évaluation de l'activité enzymatique	120
1.6. Détection de Malathion	123
Conclusion	125
Références	126
Conclusion générale	131
Annexe	134

Liste des Abréviations :

AChE : Enzyme Acétylcholinestérase.

AFM : Microscopie à force atomique.

APTES : 3-aminopropyltriéthoxysilane.

ATCI : Acetylthiocholine

ATR-FTIR : Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier en mode ATR (Attenuated Total Reflection)

BHE : Barrière hémato-encéphalique.

ChE : Cholinestérase

CVD : Dépôt chimique en phase vapeur.

DDB : Diamant dopé bore.

DTNB : 5,5'- dithiobisnitrobenzoate.

EDC : Ethyle(diméthylaminopropyl) carbodiimide.

FTIR : Spectroscopie infrarouge.

HF : Acide fluorhydrique.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

MEB : Microscopie électronique à balayage.

MINA : Monoisonitroso-acétone.

NHS : N hydroxysuccinimide.

NH₄F : Fluorure d'ammonium.

OP : Organophosphorés.

PAM : Iodure de méthyl- 1 aldoxime- 2 pyridine.

PBS 1X : Tampon phosphate (Phosphate buffer solution).

PTFE : Polytétrafluoroéthylène.

SiP : Silicium poreux.

SAM : Monocouches auto-assemblées.

TMB-4 : 1,1'-triméthylène-bis(4-formyl-pyridinium bromure) dioxime.

VC : Voltamogrammes cycliques.

Liste des figures

Chapitre I :

Préparation des surfaces de silicium et de silicium poreux

Figure I-1 : Structure diamant du silicium. (a) Maille cubique et (b) arrangement des atomes au voisinage d'une surface (111). (p.10)

Figure I-2 : Mécanisme de la formation d'une couche Si-H par un traitement dans l'acide fluorhydrique HF. (p.11)

Figure I-3 : Etape initiale de la dissolution du silicium par voie chimique (en haut) et par voie électrochimique (en bas). (p.12)

Figure I-4 : Dispositif utilisé pour l'hydrogénation du silicium (111). (p.13)

Figure I-5 : (a) Schéma de la formation de la structure en marches et terrasses d'une surface de silicium Si (111) après un traitement contrôlé dans NH_4F . (b) Images AFM d'une surface H-Si (111) préparée dans NH_4F $1 \times 1 \mu\text{m}^2$. (p.15)

Figure I-6 : Représentation schématique d'un prisme de silicium caractérisé par infrarouge en ATR (Attenuated total reflection). (p. 15)

Figure I-7 : Spectres ATR-FTIR des siliciums hydrogénés dans NH_4F (a) et HF (b), prise à la fois en polarisation p (bleu) et s (rouge). (p.16)

Figure I-8 : Photographie d'une goutte d'eau ($3\mu\text{L}$) déposée à la surface du Si-H. (p. 17)

Figure I-9 : Evolution du nombre de publications qui contiennent les mots "de silicium poreux" comme mots-clés dans la période 1972-2010. L'emplacement de temps de l'article fondateur Canham 1990 est également représenté. (p. 19)

Figure I-10 : Caractéristique densité de courant-tension relative à l'anodisation de silicium de type p dans HF. (p. 20)

Figure I-11 : Illustration du mécanisme de dissolution de p-type Si dans l'acide fluorhydrique. (p. 29)

Figure I-12 : Schéma de la cellule utilisée pour la formation de silicium poreux. (p.29)

Figure I-13 : Micrographies au MEB du silicium poreux : a) Vue en surface, b) Vue en clivage. (p.30)

Figure I-14 : Spectre FTIR en transmission de la couche de silicium poreux. (p.30)

Figure I-15 : Photographie d'une goutte d'eau ($3\mu\text{L}$) déposée à la surface du SiP. (p.31)

Figure I-16 : Spectre IR du silicium poreux oxydé. (p.32)

Chapitre 2

Fonctionnalisation des surfaces de silicium et de silicium poreux

Figure II-1 : Préparation des monocouches auto-assemblées(SAM) sur silicium et silicium poreux. (p.42)

Figure II-2 : Réaction de silanisation entre les groupements d'ancrage du silane avec les groupements silanols (Si-OH) de la surface de silicium oxydée. (p. 43)

Figure II-3 : Certain nombre de groupes fonctionnels qui ont été attachés de manière covalente à des surfaces de silicium hydrogéné (de gauche à droite) : l'ADN, des anticorps, des nanoparticules d'Or, fullerènes, des protéines, des groupes de ferrocène, oligothiophènes, hydrates de carbone, éthers couronne, et cristaux liquides en forme de banana. (p. 44)

Figure II-4 : Hydrosilylation d'alcènes ou alcynes implique l'insertion de la liaison insaturée carbone-carbone dans la liaison de silicium-hydrogène, créant des surfaces avec des terminaisons alkyle et alcényle, respectivement. (p.45)

Figure II-5 : a) Schéma du Schlenk utilisé pour le barbotage, b) Photographie de la réalisation expérimentale du greffage photochimique. (p.47)

Figure II-6 : Surface de silicium modifiée par un acide : a) Après un rinçage avec CH_2Cl_2 . b) Après un rinçage avec CH_3COOH . (p.47)

Figure II-7 : Images AFM d'une surface Si (111) - $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{COOH}$ préparée par un greffage photochimique (a) $1 \times 1 \mu\text{m}^2$. (p.48)

Figure II-8 : Spectres infrarouges en polarisation p (bleu) et s (vert) de surfaces acides préparées par voie photochimique. Le spectre de référence est une surface rugueuse Si-Hx(a) et une surface atomiquement plane préparée dans NH_4F (b). Les courbes en rouge correspondent aux ajustements du pic C=O et CH_2 . (P.49)

Figure II-9 : Photographie d'une goutte d'eau ($3 \mu\text{L}$) déposée sur la surface du Si après greffage de l'acide. (p.50)

Figure II-10 : Schéma de la réaction d'hydrosilylation d'acide undécylénique à la surface de silicium poreux. (p.51)

Figure II-11 : a) Photographie du protocole expérimentale de greffages thermiques. b) Schéma du Schlenk utilisé pour le barbotage et le montage utilisé pour le greffage thermique. (p.52)

Figure II-12 : Photographie d'une goutte d'eau ($3 \mu\text{L}$) déposée sur la surface du SiP après greffage de l'acide. (p.53)

Figure II-13 : Spectre FTIR d'une surface de silicium poreux a) avant modification. b) après greffage thermique d'acide undécylénique. (p.54)

Figure II-14 : Schéma de la réaction d'oxydation de silicium poreux avec le piranha et le greffage de l'APTES sur SiP oxydé. (p. 55)

Figure II-15 : Photographie d'une goutte d'eau (3 μ L) déposée sur la surface du SiP après greffage d'APTES. (p.56)

Figure II-16 : Spectre FTIR d'une surface de silicium poreux a) avant modification. b) après oxydation avec piranha c) après greffage APTES. (p. 57)

Figure II.17 : Schéma décrivant la réaction d'activation de surfaces de silicium plat à terminaison carboxyle. Initialement, les groupes acides de la surface de silicium plat réagissent avec EDC conduisant à la formation de O-acyl urée (1). Par la suite, différentes voies sont disponibles avec la formation d'ester de succinimidyle (4), de l'anhydride (2), de l'urée N-acyl (3). (p. 58)

Figure II-18 : Montage utilisé pour l'activation. (P. 59)

Figure II-19 : Images AFM de surfaces activées 90 min à 15°C avec une concentration de [EDC]=5 mM , [NHS]= 5mM. (p.60)

Figure II-20 : Photographie d'une goutte d'eau (3 μ L) déposée sur la surface de Si après la réaction d'activation. (p . 61)

Figure II-21 : Spectres infrarouges d'une surface acide (a) et d'une surface activée(b) (p.61)

Figure II-22 : Schéma de la réaction d'activation dans EDC/NHS des terminaisons acides à la surface de SiP. (p.62)

Figure II-23 : Photographie d'une goutte d'eau (3 μ L) déposée sur la surface de SiP après la réaction d'activation. (p.63)

Figure. II.24 : Spectre FTIR d'une surface de silicium poreux a) avant modification. b) après greffage thermique d'acide undécylénique. c) après activation des terminaisons acides. (P.63)

Figure II-25 : Vibrations responsables des bandes d'amide I et d'amide II dans le spectre infrarouge de protéines. La bande amide I est due à vibrations d'élongation de carbonyle tandis que l'amide II est dû principalement à des vibrations de déformation de NH. (p. 66)

Figure II-26 : Spectres infrarouges d'une surface acide (a), activée (b) et amidée avec AChE 3.12 μ M dans le PBS 1X (c) en polarisation p. Le spectre de référence est une surface SiHx. (p.69)

Figure III-27 : (a) Spectres FTIR expérimentaux et les intégrales résultants des courbes (bleu) de bandes amides I et II. Les spectres ont été enregistrés après l'exposition dans des solutions enzymatiques de l'AChE à différentes concentrations : (a) 0.1, (b) 1, (c) 3.12, and (d) 8.16 μ M. (b) L'absorbance IR intégrée des groupes amides, en fonction de la concentration enzymatique dans la solution d'amidation. (p. 70)

Figure II-28 : Concentration de surface de l'AChE en fonction de la concentration enzymatique en solution. (p.71)

Figure II-29 : Images AFM d'une surface Si-COOSuc avant (a) et après l'exposition à la solution enzymatique AChE 8.16 μ M (b, c). Avant l'immobilisation d'enzymes (a), la surface présente une structure en escalier avec des terrasses Si (111) atomiquement lisses séparées par des marches atomiques 3.1Å°. Après exposition à la solution AChE, les terrasses planes ne sont plus visibles, indiquant la présence d'une couche homogène de l'enzyme sur la surface. Les rugosités telles que mesurées sur l'image (c) sont de 0,55 nm (RMS) et 4,75 nm (pic à la vallée). (p.72)

Figure II-30 : Schéma de la cellule utilisée pour les mesures infrarouges in-situ. (p.73)

Figure II-31 : (a) Evolution temporelle de spectres FTIR d'une surface Si- COOSuc activée en contact avec une solution 2 μ M AChE. Les différents spectres ont été enregistrés après différents temps

d'exposition (2-190 min). Le spectre de référence a été enregistré juste après l'introduction de la solution dans la cellule. (b) des variations de la concentration d'enzyme sur la surface en fonction du temps. (p.74)

Figure II-32 : l'intégrale de la bande d'ester en fonction du temps pour différentes concentrations de l'AChE. La ligne rouge est le meilleur ajustement des données expérimentales en utilisant une loi bi-exponentielle donnée comme ci-dessous. (P.75)

Figure II-33 : les différentes étapes de fonctionnalisation du silicium poreux pour l'immobilisation de l'AChE. (p.76)

Figure II-34. Photographie d'une goutte d'eau (3 μ L) déposée sur la surface du SiP immobilisée par l'enzyme. (p. 77)

Figure II-35. Spectre FTIR d'une surface de silicium poreux a) avant modification. b) après greffage thermique d'acide undécylénique. c) après activation des terminaisons acides. d) après immobilisation de l'AChE. (p.78)

Figure II-36. Photographie d'une goutte d'eau (3 μ L) déposée sur la surface du SiP immobilisée par l'enzyme. (p.79)

Figure II-37 : Spectres IR par transmission de SiP modifiées de : (a) la surface hydrogénée après anodisation électrochimique, (b) Après traitement dans une solution Piranha, (c) Après silanisation avec APTES, (d) Après l'exposition de la surface SiP-NH₂ en solution AChE + EDC / NHS. (p. 80)

Chapitre 3

Etude de l'activité enzymatique d'ache immobilisée sur silicium / silicium poreux par UV-Vis

Figure III-1 : Structure chimique du Malathion. (p.89)

Figure III-2 : Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique. (p.90)

Figure III-3 : Mécanisme catalytique de l'acétylcholinestérase. (p.91)

Figure III-4 : Représentation schématique de l'acétylcholinestérase. (p.91)

Figure III-5 : Inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés. (p.92)

Figure III-6 : Réactivation par le PAM du cholinestérase inhibé par un organophosphate. (p.93)

Figure III-7 : Vitesse initiale en fonction de [S]. (p.94)

Figure III-8 : Représentation graphique de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten : graphique de Lineweaver –Burk. (p.95)

Figure III-9 : Représentation de Lineweaver-Burk d'une inhibition compétitive. (p.96)

Figure III-10 : Représentation de Lineweaver-Burk d'une inhibition non-compétitive. (p. 96)

Figure III-11 : Représentation de Lineweaver-Burk d'une inhibition incompétitive. (p.97)

Figure III-12 : (A) Hydrolyse du substrat d'acétylthiocholine en présence d'AChE. (B) Réduction de 5,50-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB), en présence de thiocholine conduit à la formation d'un produit de couleur jaune (acide 2-nitro-5-thiobenzoïque). (p.98)

Figure III-13 : (a) Evolution temporelle des spectres UV-Vis d'une solution contenant l'acétylcholinestérase (0.15 nM), 25µl de ATCl (0.01 M), et 100 µl de DTNB (0,075 M). Le tracé dans insère dans cette figure montre les variations de l'intensité du pic en fonction du temps. (b) la courbe d'étalonnage de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration de l'AChE. (p.100)

Figure III-14 : (a) Spectres UV-Vis d'une solution contenant ATCl (0.075 M) et DTNB (0.01 M) après l'immersion d'une surface de silicium à modification AChE. Les spectres (de bas en haut) ont été enregistrés à 2 min temps d'incubation. (b) l'absorption maximale en fonction du temps. La pente donne un taux de réaction de 0.011 a.u/minute. (p.101)

Figure III-15 : Courbe de calibrage du taux enzymatique en fonction de la concentration AChE. (p.102)

Figure III-16 : Evolution temporelle des spectres UV-Vis de la solution ATCl et DTNB en contact avec : (a) la surface SiP-CONH-AChE, (b) la surface SiP-NH-AChE. Les spectres (de bas en haut) ont été enregistrés chaque minute (temps d'incubation). (p.103)

Figure III-17 : Changement de maximum d'absorption en fonction du temps : (a) la surface SiP-CONH-AChE, (b) la surface SiP-NH-AChE. (p.103)

Chapitre IV

Etude électrochimique de l'activité de l'ache immobilisée sur le silicium poreux

Figure IV-1 : Profil de potentiel appliqué en fonction du temps. (p.113)

Figure IV-2 : Exemple de diagramme voltampérométrie cyclique. (p.114)

Figure IV-3 : Dispositifs utilisés pour l'étude électrochimique a) Micro cellule électrochimique, b) Potentiostat Autolab (Eco Chemie). (p.117)

Figure IV-4 : Stabilité de la réponse voltampérométrique en PBS 1X a) électrode Si-COOH et b) de l'électrode DDB. (p. 119)

Figure IV-5 : Réponse voltampérométrique en PBS 1X contient 0.1mM ATCl et 3nM AChE a) électrode Si-COOH et b) de l'électrode DDB. (p.120)

Figure IV-6 : a) Voltamogramme de DDB dans le PBS 1X contenant 0.33 mM ATCl et AChE en solution avec différentes concentrations. C1= 0.00262 μ M, C2= 0.00524 μ M, C3= 0.00786 μ M, C4= 0.01 μ M, C5= 0.0131 μ M. b) la courbe de calibrage de l'intensité du courant en fonction de la concentration AChE. (p.121)

Figure IV-7 : Voltamogramme de DDB dans le PBS 1X contenant 0.33 mM ATCl après l'immersion de l'échantillon de silicium poreux modifié avec Acétylcholinestérase pendant 10 min. (p.121)

Figure IV-8 : a) Voltamogramme cyclique (VC) de DDB dans la solution de 0.1 M de tampon phosphate (pH =7) contenant différentes concentrations de chlorure d'acétylthiocholine (ATCl) (C1=0.125 mM, C2=0.254 mM, C3=0.375 mM, C4=0.5 mM, C5=0.625 mM) après l'immersion de l'échantillon de silicium poreux modifié avec Acétylcholinestérase pendant 20 min. b) Représentation de Lineweaver et Burk de la réaction enzymatique à différentes concentrations de substrat ATCl. (p.123)

Figure IV-9 : Voltammogrammes de DDB dans le PBS 1x contenant 0.55 mM ATCl après l'immersion de SiP-AuNPs-NH₂-AChE pendant 20 min sachant qu'il a été incubé dans différentes concentrations du Malathion (C1= 2 nM, C2= 4 nM, C3= 6 nM) pendant 6 min. (p.124)

Liste des tableaux

Chapitre 2

Fonctionnalisation des surfaces de silicium et de silicium poreux

Tableau II.1 : Principaux groupements réactionnels entre le support et l'enzyme **(p.65)**.

Tableau II-2 : Affectations des différents pics dans les spectres ATR-FTIR **(p.68)**.

Chapitre 3

Etude de l'activité enzymatique d'ache immobilisée sur silicium / silicium poreux par UV-Vis

Tableau III-1 : Principales propriétés physico-chimiques du Malathion. **(p.89)**

Introduction générale

Introduction générale

Au cours des dernières années, les techniques d'immobilisation d'enzymes ont révolutionné les perspectives d'application des enzymes dans l'industrie. Le choix des supports solides et des stratégies d'immobilisation présente le défi clé dans le développement de biopuces enzymatiques en termes de sensibilité, de stabilité, de temps de réponse et de reproductibilité. Le point crucial est la conservation de l'activité biologique des enzymes immobilisées.

L'un des capteurs qui ont prouvé leurs applications sur le terrain est le capteur électrochimique fondé sur des électrodes modifiées chimiquement et qui répond bien aux critères d'efficacité et de simplicité. En outre, l'immobilisation des enzymes ayant une affinité élevée vers divers organophosphorés est une des méthodes efficaces pour le développement de tels capteurs électrochimiques.

Bien que des enzymes puissent être immobilisées par diverses méthodes chimiques, l'immobilisation par des liaisons covalentes apparaît comme une voie intéressante, car elle offre les meilleures performances en termes de stabilité et peut être reproductible avec un rendement élevé. L'attachement covalent est réalisé entre les surfaces modifiées chimiquement et les enzymes par l'intermédiaire de réactions de couplage. Le succès de la procédure d'immobilisation se traduit par le maintien de l'activité catalytique de l'enzyme immobilisée sous des conditions dénaturantes.

Parmi les substrats utilisés comme supports, nous citons le silicium qui a un intérêt particulier en raison de sa surface qui offre des possibilités de chimie contrôlées jusqu'à l'échelle atomique¹ d'une part, d'autre part le silicium sous sa forme poreuse présente une grande surface spécifique² permettant l'accrochage d'un grand nombre de molécules. La taille des pores et la biocompatibilité accordable^{3,4} rendent ce matériau idéal pour l'immobilisation des enzymes. En outre, les caractéristiques des pores, dont la profondeur de pores et le diamètre sont très convenables, avec des tailles de pores allant de quelques nanomètres à plusieurs micromètres⁵ qui permet d'immobiliser des sondes avec différentes dimensions : des peptides⁶, des enzymes⁷⁻¹⁰, les anticorps¹¹, de l'ADN¹², des protéines¹³, de bactérienne¹⁴ et d'autres molécules biologiques.

Les applications de silicium poreux (SiP) sont limitées en ce qui concerne les biocapteurs ampérométriques. En fait, en raison de ses propriétés de faible conductivité, la surface de SiP doit être modifiée en utilisant un matériau conducteur comme de l'or (Au)¹⁵, le platine (Pt)¹⁶, ou un polymère conducteur.^{17,18}

Notre approche repose sur la fonctionnalisation de la surface de SiP et de silicium plat (Si-c) avec l'enzyme Acétylcholinestérase (AChE) en utilisant des procédés à plusieurs étapes. L'activité des enzymes immobilisées a été étudiée par voie optique et électrochimique, une nouvelle approche pour les études ampérométrique est présentée.

Ce manuscrit se compose de quatre chapitres :

Le premier chapitre (I) est consacré aux substrats : silicium plan et silicium poreux (SiP). Nous avons abordé dans la première partie l'élaboration et la caractérisation de surfaces hydrogénées rugueuses et de surfaces hydrogénées atomiquement planes servant de surfaces de départ aux greffages covalents des sondes enzymatiques. La procédure de préparation a été décrite et les résultats obtenus par différentes méthodes d'élaboration ont été présentés. La deuxième partie est consacrée aux procédés expérimentaux utilisés pour obtenir le silicium méso-poreux. Les couches poreuses obtenues sont caractérisées par microscopie électronique à balayage (MEB), par angle de contact et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Le deuxième chapitre est composé de trois parties, dans la première partie, nous avons décrit la procédure suivie pour la modification des surfaces de SiP et de Si-c par les enzymes. Nous avons commencé par un état de l'art des différents procédés de préparation des monocouches organiques liées de façon covalente à une surface de silicium hydrogénée via la formation d'une liaison directe Si-C et indirecte Si-O-Si. Ensuite, nous avons décrit les méthodes utilisées pour le greffage de monocouches terminées par des fonctions acides et des monocouches terminées par des fonctions amines, et nous avons présenté les caractérisations des surfaces obtenues par microscopie à force atomique (AFM), spectroscopie infrarouge en géométrie (ATR : Attenuated Total Reflection) et l'angle de contact. Dans la seconde partie, nous avons présenté une étude infrarouge quantitative de l'étape intermédiaire qui consiste à générer un ester actif à partir des groupements acides en surface (Activation). Enfin, dans la dernière partie nous avons abordé la dernière étape de la fonctionnalisation qui consiste à coupler les enzymes à la surface modifiée, par la formation de liaisons amides. Les surfaces ont été caractérisées par différentes méthodes de caractérisation.

Dans le troisième chapitre nous avons étudié l'activité enzymatique d'AChE immobilisée sur le silicium poreux avec deux méthodes différentes d'immobilisation en utilisant un dosage standard photométrique.

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude du comportement électrochimique, par voltampérométrie cyclique, des surfaces de Diamant dopé au Bore (DDB) en utilisant un électrolyte contenant une solution tampon de phosphate (PBS1X: Phosphate Buffer Solution). L'Acetylthiocholine qui a été mise en contact avec des surfaces de SiP modifiées par l'enzyme AChE.

Références

1. **Chazalviel J.-N.; Allongue P.; Gouget-Laemmel A. C.; Henry de Villeneuve C.; Moraillon A.; Ozanam F.** Sci. Adv. Mater.2011, 3, p. 332.
2. **Buriak Jillian M.** Phil. Trans. R. Soc. A . 2006, 364, p. 217.
3. **Low Suet P., Voelcker Nicolas H.** Springer International Publishing . 2014, p.381.
4. **Low Suet P., Voelcker Nicolas H., Canham Leigh T., Williams Keryn A.** 2009, 30, p. 2873.
5. **Weiss S. M., Fauchet P. M.,** IEEE J. Quantum Electron. 2006, 12, p. 1514.
6. **Sam S., Gouget-Laemmel A. C., Chazalviel J.-N., Ozanam F., Gabouze N.** Applied Surface Science, 2013, 269, p. 166.
7. **Chaudhari P. S., Gokarna A., Kulkarni M., Karve M. S., Bhoraskar S. V.,** Actuators B, 2005, 107, p. 258.
8. **Letant SE., Hart BR., Kane SR., Hadi MZ., Shields SJ., Reynolds JG.** Adv. Mater. 2004, 16, p. 689.
9. **Letant SE., Kane SR., Hart BR., Hadi MZ, Cheng TC., Rastogi VK., Reynolds JG. ,** chemical communications, 2005, 7, p. 851.
10. **Kermad A., Sam S., Ghellai N., Khaldi K., Gabouze N.** Materials Science and Engineering B, 2013, 178, p. 1159.
11. **Bonanno LM., DeLouise LA.,** Langmuir 2007, 23, p. 5817.
12. **Archer M., Christophersen M., Fauchet P. M.,** Biomed Microdevices 2004, 6, p. 203.
13. **Orosco M. M., Pacholski C., Miskelly G. M., Sailor M. J.,** Adv. Mater. 2006, 18, p. 1393.
14. **Chan S., Horner S. R. , Miller B. L., Fauchet P.M. ,** J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, p. 11797.
15. **Ressine A., Vaz-Domínguez C., Fernandez V. M., De Lacey A. L., Laurell T., Ruzgas T., Shleev S.** Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25, p. 1001.
16. **Song, M. J., Yun D. H., Min N. K. , Hong S. I.** Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 103, p. 32.

17. **Jin, J.-H., Alocilja E., Grooms D.** Journal of Porous Materials, 2010, 17, p. 169.

18. **Zhao, Z. and H. Jiang** Enzyme-based Electrochemical Biosensors. In: Biosensors, P. A. Serra, InTech. 2010

Chapitre 1

PREPARATION DE SURFACES DE SILICIUM ET DE SILICIUM POREUX

Le Silicium nanostructuré a de nombreuses caractéristiques uniques qui peuvent être mises à profit pour réaliser des capteurs chimiques et biologiques sensibles et sélectives. Il existe différentes formes de silicium qui peuvent être choisies en tant que substrat, tels que le silicium cristallin, le silicium poreux, et les nanofiles de silicium, ...

Dans cette thèse, nous avons utilisé deux types de silicium : le silicium plat et le silicium poreux.

Dans ce chapitre nous allons présenter les substrats de départ : le silicium plat avec les deux méthodes d'hydrogénation de sa surface (attaque chimique par HF et NH_4F) et le silicium poreux avec le dispositif expérimental servant à sa fabrication ainsi que les conditions électrochimiques utilisées. Nous présenterons aussi les résultats de la caractérisation physico-chimique des substrats obtenus et analysés par les techniques classiques la microscopie à force atomique (AFM), la spectroscopie infrarouge FTIR, angle de contact, et la microscopie électronique à balayage (MEB).

Partie I : Hydrogénation de la surface du silicium

1. Cristallographie

Le silicium monocristallin (Figure I-1-a) a une structure cubique à faces centrées (c.a.d deux réseaux CFC intercalés, dite structure diamant) où chaque atome est positionné au centre d'un tétraèdre et attaché à ses quatre atomes voisins par des liaisons covalentes, dont le paramètre de maille est de 357,1 Å à température ambiante. La coupe en surface le long de plans denses (111) présentée au niveau de la maille dans la figure I-1-b. En effet, contrairement au silicium (100), la dissolution anisotrope de la couche d'oxyde native du « wafer » (111) dans une solution de NH_4F présente l'avantage d'accéder à des surfaces hydrogénées présentant des terrasses atomiquement planes et des liaisons monohydrures Si-H toutes perpendiculaires à la surface¹. Cet arrangement donne moins de défauts, ainsi qu'une meilleure couverture et l'oxydation de surface sera réduite. Ces surfaces peuvent alors être considérées comme modèles pour le greffage de monocouches alkyles compactes et organisées. Un calcul cristallographique permet de connaître le nombre d'atomes de silicium sur les différents types de surface. Le triangle équilatéral de la figure I.1.a, de côté $a\sqrt{2}$ = 768 pm, contient 2 atomes ($3(\text{sommets}) \times 1/6 + 3(\text{milieu des arêtes}) \times 1/2 = 2$). Son aire est de $a^2 \times \sqrt{3}/2 = 2,55 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2$. Ce qui donne une concentration d'atomes de silicium sur les plans denses (111), qui est de $7,83 \cdot 10^{14} / \text{cm}^2$ ce qui représente le nombre des liaisons Si-H après hydrogénation dans le NH_4F .

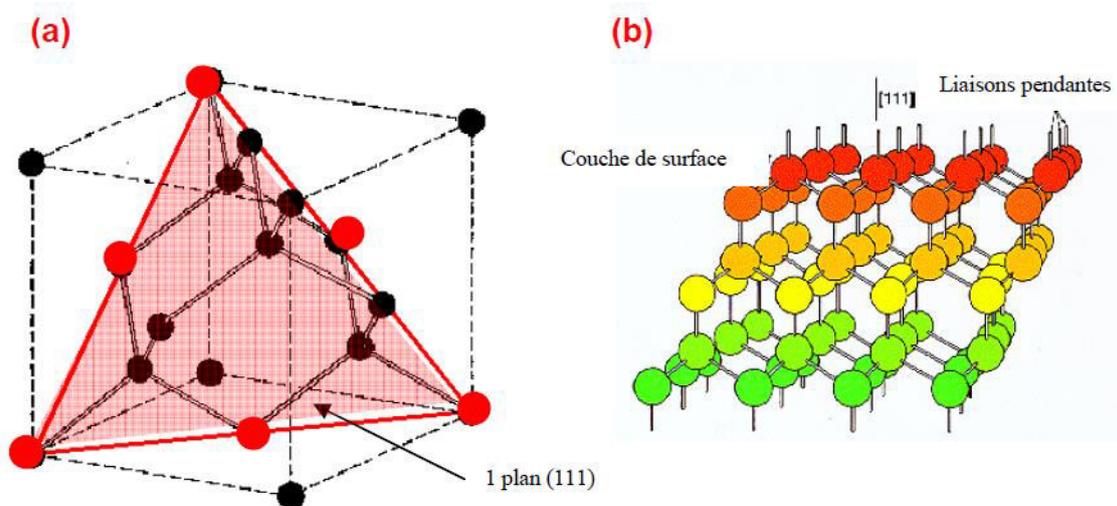


Figure I-1: Structure diamant du silicium. (a) Maille cubique et (b) arrangement des atomes au voisinage d'une surface (111).²

2. Mécanisme de l'hydrogénation de la surface de silicium

Après un traitement dans l'acide fluorhydrique HF, le silicium est passivé par une monocouche contenant des liaisons Si-H et non pas Si-F comme on le pensait à l'origine³. Au début des années 1980, la formation de silicium hydrogéné a été étudiée par plusieurs équipes de recherche comme: Ubara et al.,⁴ Higashi et Y. Chabal et al.⁵⁻⁸ Ils ont démontré que la liaison Si-F fortement polaire est formée après la dissolution de l'oxyde interfaciale, et polarise ainsi la liaison silicium-silicium voisine $\text{Si}_\delta^- - \text{Si}_{\delta^+} - \text{F}$, en raison de la forte électronégativité du fluor, la liaison Si-Si est affaiblie et favorise l'enlèvement de l'atome de Si (sur lequel F est attaché) sous la forme de molécules SiF_x de la surface. En conséquence, la première couche de Si fluore est enlevée, laissant la couche sous-jacente de Si hydrogénée, comme illustre la figure I-2.

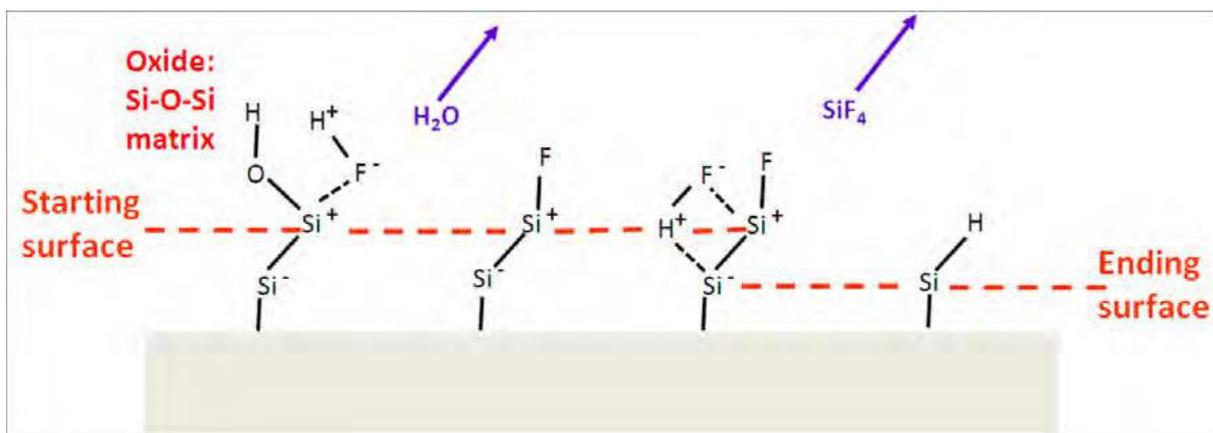


Figure I-2 : Mécanisme de la formation d'une couche Si-H par un traitement dans l'acide fluorhydrique HF⁹

Par la suite, Higashi ainsi que Chabal et leurs collaborateurs ont montré utilisant l'analyse FTIR que la structure de la surface du silicium hydrogéné est dépendante du pH de la solution^{2, 10-11}. Quand le pH est augmenté autour de 9 par ajout de fluorure d'ammonium NH_4F dans la solution de décapage, les modes dihydrures et trihydrures disparaissent au profit des modes monohydrures dont la bande d'absorption est centrée sur 2083 cm^{-1} uniquement visible en polarisation p. Ces travaux ont permis aussi de constater qu'une surface plongée dans le fluorure d'ammonium NH_4F , de pH 8-9, a une structure en terrasses atomiquement planes. En 1995, Allongue a mis en évidence la coexistence de deux mécanismes réactionnels

de dissolution dans NH_4F : Un mécanisme chimique, anisotrope conduisant dans le cas de surfaces de silicium $\langle 111 \rangle$ à des surfaces atomiquement plates composées de larges terrasses et de marches monoatomiques et un mécanisme électrochimique à courant nul (EC) isotrope et responsable des défauts de la surface (Figure I-3)¹²

Le mécanisme chimique consiste à oxyder le silicium par les molécules d' H_2O qui réagissent préférentiellement sur les sites de crans et les bords de marche pour des raisons stériques, la vitesse de réaction d'un site de cran est supérieure à celle d'un site de marche, elle-même supérieure à celle d'un site de terrasse, cette réaction est très anisotrope et dépend peu du potentiel électrochimique. La seconde réaction, électrochimique, en revanche, a lieu presque de façon aléatoire sur la surface grâce à la dissociation électrochimique de la liaison Si-H. L'hydrogène est alors remplacé par un oxygène pour former une liaison Si-OH. Cette étape d'oxydation électrochimique se fait de façon presque isotrope sur la surface (Figure I.3). Dans les deux cas, les liaisons Si-OH sont ensuite substituées par des liaisons Si-F selon le processus chimique décrit plus haut.

Il a été montré que l'oxygène dissous affecte notablement la topographie de surface en initiant la formation de piqûres sur les terrasses. L'ajout d'ions sulfites SO_3^{2-} dans la solution, réduisant l'oxygène dissous, permet de s'affranchir de ce problème.

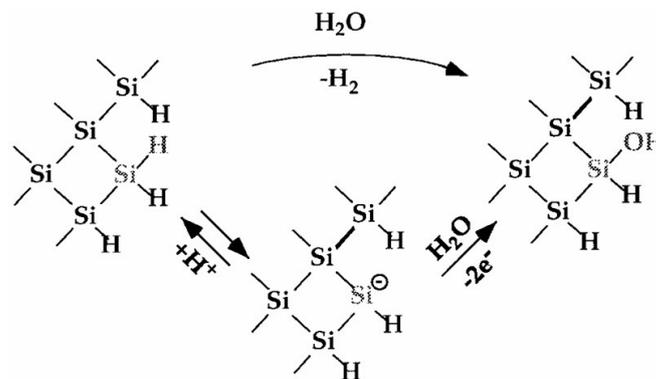


Figure I-3 : Etape initiale de la dissolution du silicium par voie chimique (en haut) et par voie électrochimique (en bas).¹²

3. Mode opératoire

Des échantillons de silicium ont été découpés à partir des plaquettes de silicium (111) de type n (Siltronix, France). Les échantillons de Si ont été nettoyés dans une solution de piranha $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ 1/3 (par volume) à 100°C pendant 30 min et rincé avec l'eau ultra pure (MilliQ, $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ à 25°C) afin d'éviter toute contamination organique pouvant limiter la dissolution du silicium. Avant la fonctionnalisation des surfaces, une étape de décapage est nécessaire, elle consiste à enlever la couche d'oxyde obtenue à la surface du silicium et à former la monocouche Si(111)-H par dissolution du silicium. L'attaque s'effectue dans une solution de fluorure d'ammonium NH_4F 40% (Carlo Erba, pH 8-9). La solution de NH_4F dans laquelle une faible quantité de sulfite d'ammonium a été dissoute est préalablement homogénéisée aux ultrasons, pendant 10 min, dans un bécher en polytétrafluoroéthylène (PTFE). L'échantillon y est ensuite immergé 15 min, puis retiré et abondamment rincé à l'eau ultra pure figure I-4. Cette méthode d'attaque est valable pour la caractérisation AFM. Nous avons aussi procédé à l'hydrogénation du silicium par immersion de l'échantillon de silicium pendant 10 s dans une solution d'acide fluorhydrique HF 50% (Carlo Erba). La surface obtenue est tout aussi hydrophobe mais elle n'est pas atomiquement plan. Elle présente une rugosité de surface à l'échelle de quelques angströms.

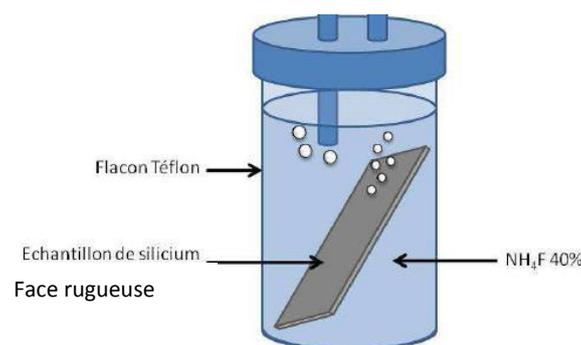


Figure I-4 : Dispositif utilisé pour l'hydrogénation du silicium (111)

4. Caractérisation par microscopie à force atomique

Les images AFM ont été enregistrées en mode contact à l'aide d'un microscope Pico SPM (Molecular Imaging, Phoenix, AZ). L'imagerie a été effectuée sous une atmosphère de N₂.

Pour les études de l'AFM, nous avons choisi un silicium d'orientation (111) poli d'un côté avec une désorientation de 0,2 ° selon la direction $[11\bar{2}]$ de type n, dopés au phosphore. Ce silicium présente une résistivité de 5 à 10 Ωcm et une épaisseur comprise entre 500 et 550 μm.

Les images AFM représentés sur la figure I-5-b révèlent la formation d'une surface idéalement plane SiH après la dissolution du silicium dans une solution de NH₄F à 40% pendant 15 minutes. La topographie particulière des surfaces de silicium structurées en marches et terrasses est créée avec un espacement correspondant à la désorientation de 0,2 ° vers le $[11\bar{2}]$ direction, où nous pouvons distinguer la hauteur de chaque marche environ 3,1 Å, proche de la distance monoatomique calibré (3.14 Å). La séparation moyenne entre deux étapes adjacentes est d'environ 100 nm. Ces images montrent que le procédé de préparation permet d'obtenir des surfaces de haute qualité, où aucun défaut de surface n'est apparent. Ce qui va nous permet de contrôler les modifications de la surface qui ont lieu par la suite.

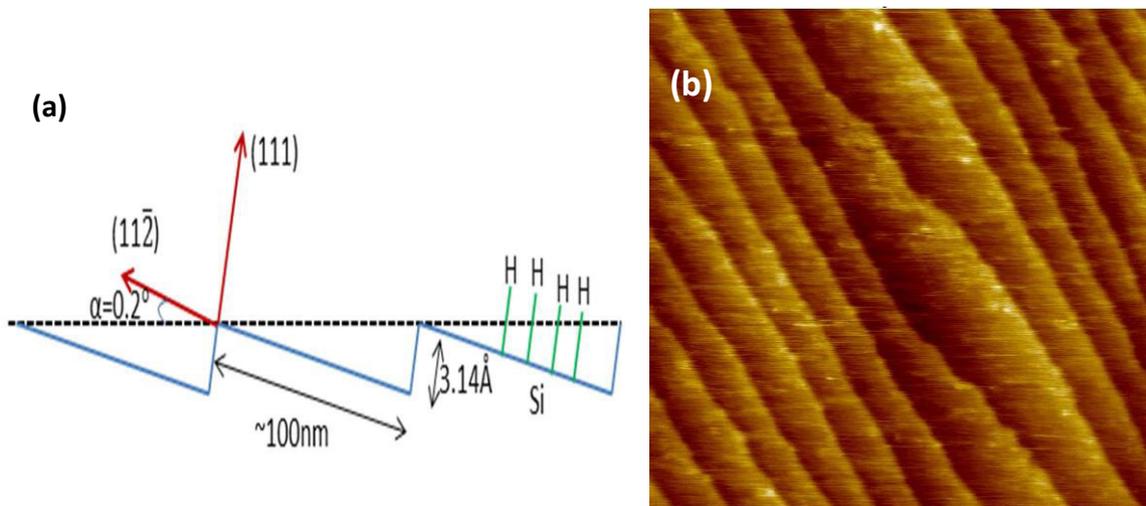


Figure I-5 : (a) Schéma de la formation de la structure en marches et terrasses d'une surface de silicium Si(111) après un traitement contrôlé dans NH₄F¹³. (b) Images AFM d'une surface H-Si (111) préparée dans NH₄F 1×1 μm²

5. Caractérisation par spectroscopie infrarouge

L'un des avantages de la spectroscopie FT-IR est sa capacité à identifier des groupes fonctionnels tels que C = O, N-H ou C-H ... via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques. La plupart des substances présentent un spectre caractéristique qui peut être directement reconnue. Dans ce travail les spectres infrarouges (en mode ATR : Attenuated total reflection) ont été enregistrés en utilisant un spectromètre Bruker Equinox 55 équipé d'un détecteur MCT photovoltaïque liquide refroidi à l'azote. Pour les études IR, nous avons choisi un silicium (111) poli double face de prisme pour préparer les surfaces SiHx ou SiH. La surface SiHx a été principalement étudiée parce que la microstructure rugueuse résultante est semblable à celle de silicium poreux.

Les échantillons de silicium ont été façonnés sous forme de prismes par polissage deux biseaux à $\sim 48^\circ$. Les spectres ont été enregistrés avec un faisceau infrarouge polarisé en S et P selon la direction du champ électrique, perpendiculaire ou parallèle au plan d'incidence (Figure I-6), sur une plage spectrale de 900 à 4000 cm^{-1} (avec une résolution de 4 cm^{-1}),

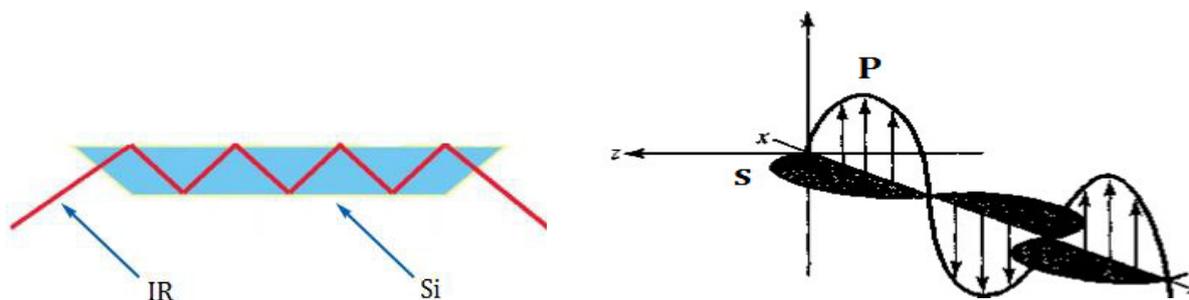


Figure I-6 : Représentation schématique d'un prisme de silicium caractérisé par infrarouge en ATR (Attenuated total reflection).

Les spectres infrarouges des deux surfaces fraîchement hydrogénée l'un dans le NH_4F et l'autre dans HF sont présentés sur la figure I-7, la référence étant la surface oxydée obtenue après nettoyage dans le piranha. La figure I-7-a montre les spectres d'une surface hydrogénée dans NH_4F en polarisation p et s, on remarque l'apparition d'un pic de la vibration d'élongation ν SiH à 2083 cm^{-1} en polarisation p seulement, en polarisation s la taille du pic est négligeable par rapport à celui visible en polarisation p, qui prouve que la grande majorité

des liaisons Si–H sont orientées perpendiculairement à la surface de l'échantillon. L'aire de ce pic correspond à une concentration d'atomes en surface égale à $7,8 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$.

La figure I-7-b montre une surface préparée dans HF. Le signal obtenu est visible pour les deux polarisations on observe un triplé autour de 2087, 2115 et 2137 cm^{-1} attribué aux modes de vibration d'élongation des liaisons Si-H, Si-H₂ et Si-H₃, respectivement. Ceci confirme la rugosité de surface à l'échelle atomique.

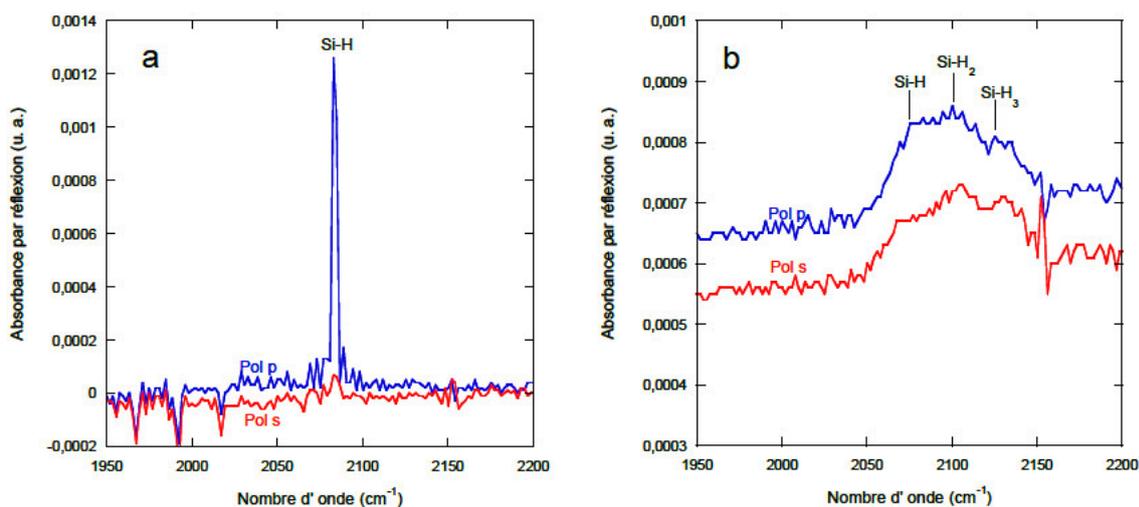


Figure I-7 : Spectres ATR-FTIR des siliciums hydrogénés dans NH₄F (a) et HF (b), prise à la fois en polarisation p (bleu) et s (rouge).¹⁴

6. Caractérisation par angle de contact

Les mesures d'angle de contact ont été faites en utilisant un DGIDROP (GBX). Les mesures ont été obtenues à l'aide d'une goutte de 3 μl d'eau disionisé déposée sur le substrat. Les images ont été obtenues par un appareil photo numérique intégré, et le système a été sous le contrôle de l'ordinateur à l'aide progiciel standard Visiodrop.

L'étude de la mouillabilité implique généralement la mesure des angles de contact en tant que des données primaires, ce qui indique le degré de mouillage lorsqu'une interagissent de solide et de liquide.

La mouillabilité caractérise la facilité avec laquelle une goutte de liquide s'étale sur une surface solide. La mesure de l'angle de contact θ entre une surface et une goutte de liquide nous informe sur l'état de la mouillabilité d'un matériau. Angles de contact petits ($< 90^\circ$)

correspondent à mouillabilité élevée (la surface est hydrophile), tandis que les grands angles de contact ($> 90^\circ$) correspondent à une faible mouillabilité (la surface est hydrophobe).

La variation de ce paramètre dans le cas du Silicium hydrogéné est attribuée aux interactions entre la chimie de la surface et le liquide. En effet dans le cadre de cette thèse, cette mesure est réalisée dans le but de confirmer l'efficacité des réactions chimiques entreprises en surface à chaque étape de fonctionnalisation.

L'angle de contact a été mesuré en utilisant $3\mu\text{L}$ d'eau DI à une température de 20°C et un système de géométrie contrôlé (Visio drop), la mesure d'erreur est estimée à 2° . La première mesure en utilisant cette technique a été réalisée sur une surface du silicium hydrogéné fraîchement préparée. Le résultat obtenu (Figure I-8), montre que la valeur de l'angle de contact est égale à 85° cette valeur étant presque égal à 90° , confirme l'hydrophobicité de ce matériau¹⁵. Ceci montre que la surface de Si-H obtenue est totalement recouverte de liaisons hydrures (Si-Hx) hydrophobes, et elle est exempte de toute oxydation de surface.

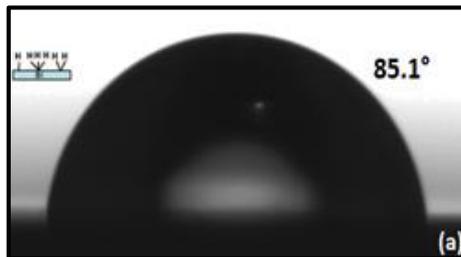


Figure I-8 : Photographie d'une goutte d'eau ($3\mu\text{L}$) déposée à la surface du Si-H.

Partie II : Préparation de Silicium poreux

1. Historique de silicium poreux

Le silicium poreux (SiP) peut être défini comme un matériau semi-conducteur résultant de l'attaque électrochimique d'un acide fort (acide fluorhydrique généralement, HF), pour former un réseau de pores avec des diamètres typiques allant de quelques micromètres à nanomètres.¹⁶ Les propriétés uniques de silicium poreux tels que sa grande surface spécifique, la photoluminescence à température ambiante, son électronique inhérente et les caractéristiques de transport font de ce matériau approprié pour le développement de dispositifs photoniques et de détections.

L'histoire de silicium poreux a commencée en 1956, lorsque Uhler et ses collaborateurs ont rapporté la formation d'une fine couche brune sur la surface de silicium au cours d'une étude sur l'électropolissage par une solution d'acide fluorhydrique (HF) sous une certaine gamme de paramètres électrochimiques¹⁷.

En 1957, Fuller et Ditzenberg¹⁸ font la même observation mais dans une solution de HF HNO₃ soumise à un courant électrique. Après analyses, ils observent l'aspect poreux du matériau.

En 1976, un premier dispositif à base de SiP, un capteur de gaz, a été breveté dans le monde entier¹⁹, la première utilisation concrète des caractéristiques du silicium poreux a été faite par Imai²⁰ au NTT labs à Tokyo en 1981, il a réalisé une structure isolée électriquement grâce au silicium poreux. Depuis, le SiP a reçu une attention constante, mais seulement à l'égard de son utilisation comme isolant diélectrique.²¹⁻²⁵ En 1990, seuls 200 papiers environ ont été publiés sur le silicium poreux durant les 35 années écoulées depuis sa découverte (Figure I-9). En 1990 un nouvel engouement pour le silicium poreux est né de sa photoluminescence à température ambiante découverte par Canham et al.²⁶ Cette propriété suscita le plus vif intérêt dans la communauté scientifique, et a fait l'objet de nombreux projets de recherches.

Depuis lors et jusqu'à maintenant plusieurs articles scientifiques ont été publiés sur ce sujet et l'intérêt ne semble pas diminuer sensiblement. (Nous n'avons pas trouvé des documents qui donne l'évolution du nombre de publications dans la période de 2010 -2016).

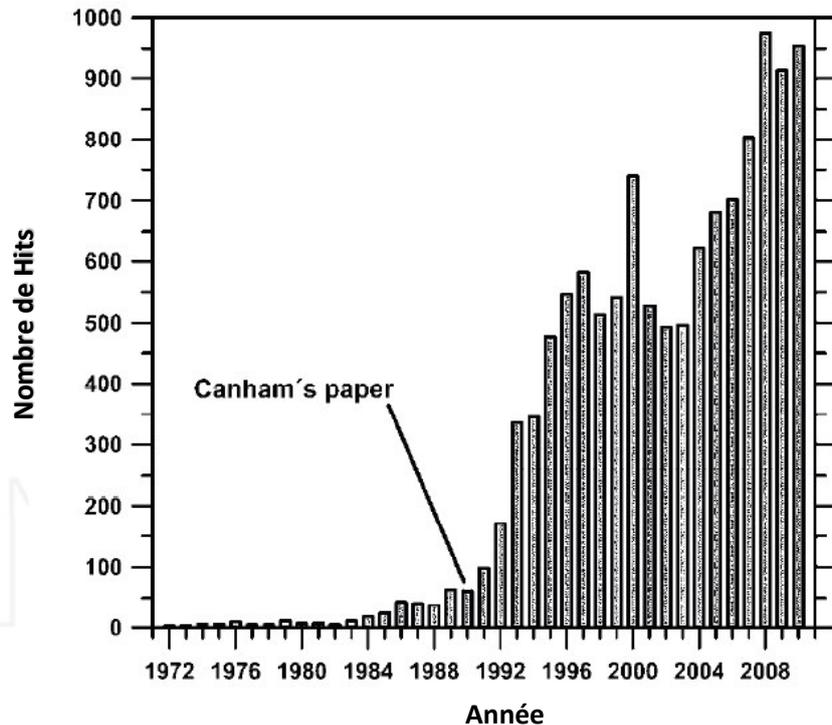


Figure I-9 : Evolution du nombre de publications qui contiennent les mots "de silicium poreux" comme mots-clés dans la période 1972-2010. L'emplacement de temps de l'article fondateur Canham 1990 est également représenté²⁷.

2. Régimes d'anodisation électrochimique : Caractéristique courant - tension (I-V)

L'anodisation électrochimique est une des méthodes courantes, simples et efficaces pour la fabrication du SiP. Cette méthode présente l'avantage d'obtenir des couches épaisses de silicium poreux et l'accès à un large éventail de morphologies.²⁸

L'anodisation électrochimique du silicium en milieu acide HF, conduit selon les conditions de densité de courant et de concentration en acide, soit à la dissolution homogène du silicium (on parle alors d'électropolissage), soit à une dissolution localisée entraînant la formation des pores au sein du matériau.

Lorsqu'un potentiel est appliqué à du silicium immergé dans une solution, on peut mesurer un courant traversant le système. La caractéristique I (V) qui en découle présente des similitudes avec celle d'une diode Schottky.

L'étude de l'anodisation du silicium montre que sous polarisation cathodique, le silicium est stable quel que soit son type, n ou p. La seule réaction se déroulant est la réduction des molécules d'eau libérant de l'hydrogène gazeux. La dissolution du silicium n'intervient que sous polarisation anodique pour le silicium de type p ou sous polarisation anodique et éclaircissement pour le silicium de type n.

Le pic du courant désigné par i_{ps} est caractéristique d'un électrolyte de type HF-H₂O (ce pic n'apparaît pas en présence d'un solvant organique).

Suivant le potentiel, on distingue trois régions (Figure I-10) :

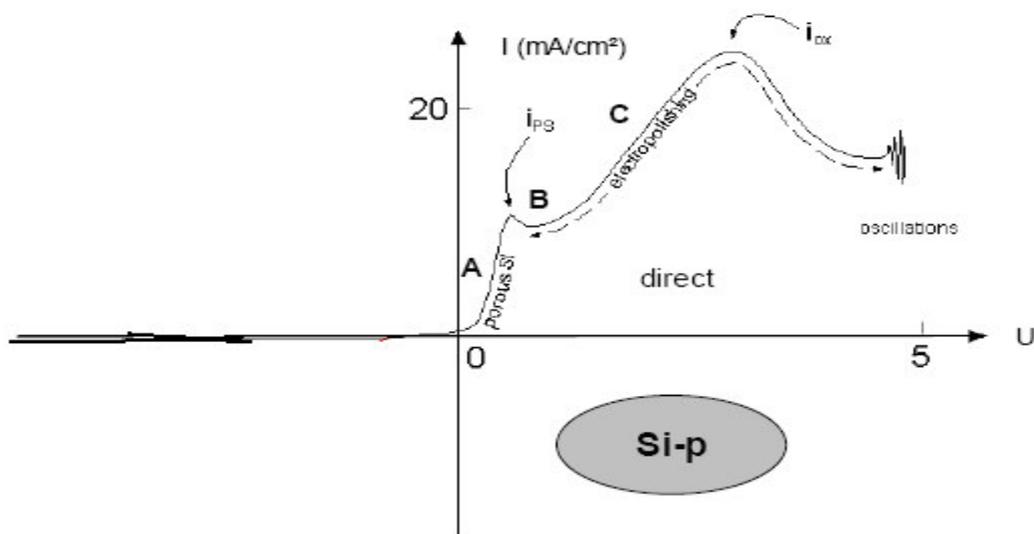


Figure I-10 : Caractéristique densité de courant-tension relative à l'anodisation de silicium de type p dans HF (d'après [29,30])

Région A : pour les faibles potentiels, le courant varie généralement de façon exponentielle avec la tension.³¹ C'est dans cette région que se forme le silicium poreux.

Région C : pour les forts potentiels, on atteint le régime d'électropolissage du silicium et donc la disparition de la couche poreuse. Le courant augmente moins rapidement avec le potentiel³¹. L'électropolissage est la conséquence de la formation d'un oxyde anodique à la surface du silicium, oxyde ensuite dissout par l'acide HF.

Région B : elle constitue une zone de transition entre le régime de formation de silicium poreux et le régime d'électropolissage du silicium. Cette transition se traduit par une densité de courant critique, qui est observée par un pic et un changement de pente de caractéristique I (V).

3. Mécanisme de dissolution de Silicium

L'électrochimie de la dissolution du silicium monocristallin reste sujette à interprétation et plusieurs théories ont été avancées. Cependant, c'est celle proposée par Lehmann et Gösele³² en 1991 qui a reçu le plus grand consensus. La dissolution du silicium n'est possible que si le courant délivre des trous issus du matériau à l'interface : C'est la réaction d'anodisation. En effet, La surface de Si immergée dans l'acide fluorhydrique est initialement bien passivée avec de l'hydrogène. Les liaisons Si-H sont légèrement polarisées. Un apport de trous sur la surface détruit ces liaisons Si-H et favorise la formation de liaisons Si-F. Cette liaison polarise à son tour la liaison Si-H adjacente et permet la création d'une seconde liaison Si-F avec libération de dihydrogène H₂ et d'un électron. Comme les liaisons Si – F sont plus fortement polarisées que les liaisons Si – Si une molécule SiF₄ se libère sous l'attaque du complexe par HF ou H₂O. La surface résultante est ensuite passivée de nouveau par des atomes d'hydrogène (Figure I-12).

La réaction nette de la dissolution du silicium est donnée dans l'équation : (Rauscher et Spohn, 2001³³), où h⁺ et e⁻ représentent respectivement électron et trou :



Le dégagement de gaz d'hydrogène résultant de cette réaction peut être observé à partir de la surface du silicium pendant le processus de la dissolution. Il est évident à partir de la réaction que les atomes de silicium sont éliminés à partir de la surface générer une structure poreuse contenant des nanocristallites de silicium.

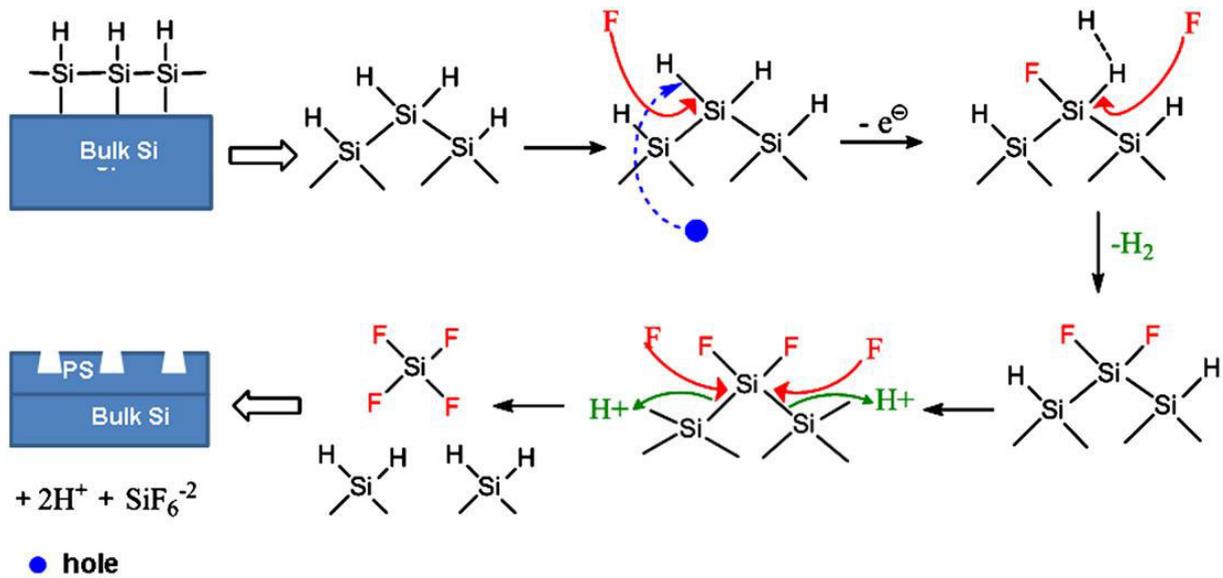


Figure I. 12 : Illustration du mécanisme de dissolution de p-type Si dans l'acide fluorhydrique³⁴.

Une lacune de la dimension d'un atome de Si est donc créée à la surface du substrat. La modification de surface va changer la répartition du champ électrique local de telle façon que le transfert de trous aura lieu préférentiellement sur la zone déjà attaquée. Les trous migrent préférentiellement au niveau des inhomogénéités et ainsi amorcent la formation des pores en favorisant une gravure localisée à ces zones.

4. Caractéristiques du silicium poreux

Les caractéristiques morphologiques du silicium poreux telles que la porosité, la taille des pores et des cristallites ou encore l'épaisseur de la couche poreuse, sont contrôlées par les paramètres d'anodisation. La nature du substrat (type, niveau de dopage, orientation cristalline), la densité de courant, la composition de l'électrolyte ou encore l'illumination sont les principaux paramètres qui influencent la gravure électrochimique du silicium.

4.1. Porosité

La porosité p est définie comme étant le pourcentage de vide dans le volume de silicium poreux.

$$\frac{\rho_{Si} - \rho_{SiP}}{\rho_{Si}} \quad \text{Equation I - 2}$$

ρ_{Si} : densité du silicium

ρ_{SiP} : densité du silicium poreux

Elle peut varier de 15 à 95%. Elle est déterminée par gravimétrie en utilisant la formule suivante :

$$\rho = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \quad \text{Equation I - 3}$$

m_1 : masse de l'échantillon avant anodisation.

m_2 : masse de l'échantillon après anodisation.

m_3 : masse de l'échantillon après dissolution totale de la couche poreuse dans la soude.

La porosité est une caractéristique importante du silicium poreux mais elle ne donne aucune information sur les propriétés microscopiques telles que la taille ou la forme des pores : deux échantillons ayant la même porosité peuvent avoir des morphologies ou des géométries complètement différentes.³⁵

4.2. Surface spécifique

La surface spécifique est l'une des propriétés les plus importantes du silicium poreux. Elle est définie comme étant le rapport entre la surface développée et le volume de la couche poreuse. Du fait de sa nature poreuse, la couche présente une surface spécifique importante. Elle est mesurée par adsorption de gaz. Elle diminue quand la porosité augmente et elle peut passer de 900 m²/cm³ pour une porosité de 50% à environ 100 m²/cm³ pour une porosité de 95%.³⁶

4.3. Epaisseur

Les couches poreuses peuvent être obtenues avec des épaisseurs allant de quelques nanomètres à plusieurs microns.

L'épaisseur de la couche poreuse peut être déterminée soit par observation de l'échantillon en coupe par microscopie électronique à balayage, soit par pesée de l'échantillon et en utilisant la formule suivante :

$$d = \frac{m_1 - m_3}{\rho_{Si} A} \quad \text{Equation 1 - 4}$$

d : épaisseur de la couche poreuse

ρ_{Si} : densité du silicium

A : aire de la surface porosifiée

m_1 : masse de l'échantillon avant anodisation

m_3 : masse de l'échantillon après dissolution totale de la couche poreuse dans la soude.³⁷

4.4. Géométrie et morphologie

On entend par géométrie des pores, le diamètre moyen des pores et la distance moyenne entre les pores. Il faut noter que la géométrie des pores ne nous informe pas trop sur la morphologie. Ce terme est utilisé pour identifier les différentes propriétés telles que la forme (lisse, branche...), l'orientation, ou l'interconnexion des pores, qui sont indépendants de la géométrie. Il existe une grande variété de pores. Des dimensions allant de 1 nm à 10 μm et des morphologies de forme spongieuses à des cylindres parfaits sont rencontrées.

Selon la nomenclature l'Union Internationale de Chimie. Pure et Appliquée IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) on distingue trois grandes catégories selon la géométrie des pores (c.à.d diamètre moyen des pores):

- Micropores (souvent appelés dans la littérature nanopores), avec diamètres des pores et distances entre les pores (géométries) <5 nm.
- Mésopores, avec géométries entre 5-50 nm.
- Macropores, avec géométrie >50 nm.

Chacune de ces trois catégories peut être obtenue sous différentes conditions et avec différentes morphologies.

5. Propriétés du silicium poreux

5.1. Propriétés de luminescence

De nouveaux espoirs d'utiliser le silicium comme matériau luminescent sont apparus par la découverte de Canham en 1990, car contrairement au Si massif, le SiP émet de la lumière à température ambiante, dans le domaine visible du spectre (550nm-780 nm) sous excitation lumineuse (photoluminescence); ou sous excitation électrique (électroluminescence).³⁸

Le spectre de luminescence se situe dans le visible, sa position spectrale dépend de sa porosité. Elle montre un déplacement vers le bleu avec l'augmentation de la porosité. L'émission de lumière est d'autant plus intense que le temps de séjour dans l'électrolyte est long (porosité plus grande). Canham explique l'émission par un phénomène de confinement des porteurs de charges dans la structure particulière du SiP en jouant sur les conditions de formation des couches de SiP.

5.2. Propriétés chimiques

La surface du silicium poreux fraîchement préparé est passivée avec de l'hydrogène d'où une présence prédominante des fonctions hydrogénosilanes (Si-H) sur cette surface³⁹. Ces fonctions chimiques réagissent facilement par différents types de réactions telles que les réactions d'hydrosilylation (cette approche utilise les terminaisons hydrures pour la formation des liaisons Si-C par l'addition d'un composé organique insaturé) et d'oxydation (pour former des terminaisons silyloxy (Si-O-Si), hydroxy (Si-OH) ou alkoxy (Si-OR)). Il est alors possible de modifier chimiquement la surface du silicium poreux par greffage covalent de molécules organiques⁴⁰. La fonctionnalisation chimique du silicium poreux est une étape cruciale dans sa préparation pour des applications en biodétection. En effet, la modification chimique de la surface du silicium poreux permet d'une part l'incorporation de l'élément de reconnaissance (biorécepteur) qui confère au capteur sa spécificité et d'autre part, elle permet de stabiliser chimiquement la surface du matériau et donc de le protéger (de la corrosion par exemple), ce qui est indispensable pour l'élaboration d'un biocapteur performant.^{41,42}

5.3. Biocompatibilité

La biocompatibilité est la capacité d'un matériau à réagir avec une substance naturelle sans provoquer une réaction de défense. Au cours des dernières années, beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'étude de la biocompatibilité de SiP. Il peut être soit un matériau : bioactif, un bio-inerte ou un matériau résorbable, ceci est en fonction des caractéristiques de la couche poreuse et de l'environnement dans lequel il est insérée.⁴³ De nombreuses études ont montré la culture réussie de lignées cellulaires sur le SiP⁴⁴⁻⁴⁶ et l'amélioration de l'adhérence et de la viabilité sur la forme poreuse par rapport au silicium plat.⁴⁷ Chin et al⁴⁸. observent qu'un type de cellules primaires, des cellules de foie de rat, survivent aussi bien sur le SiP par rapport à la culture tissulaire en polystyrène. Et une étude de biocompatibilité récente sur l'interaction des ostéoblastes primaires (cellules osseuses) et SiP a montré la ostéoconductivité de SiP et son grand potentiel en tant que substrat de l'ingénierie tissulaire orthopédique.⁴⁹

On peut utiliser le SiP dans les deux cas in vivo et in vitro, les résultats sont prometteurs pour le matériau devant être utilisé comme substrat de culture in vitro, comme un implant, et en tant que dispositif d'administration de médicament. En effet le SiP se dissout complètement dans des solutions aqueuses, dans des conditions physiologiques simulées, montrant une biodégradabilité complète⁵⁰. Cahnam et al⁵¹ ont montré que la vitesse à laquelle le SiP est dégradé par le corps, est ajustable par la chimie de surface.

Il a été également prouvé que la modification de la surface de SiP par oxydation peut le transformer en un matériau inerte. Des études in vitro impliquant l'immersion de différents types de matériaux dans des liquides corporels simulés montrent que l'immersion du méso-et nano-poreux de silicium ayant une porosité appropriée, induit dans certains cas, la précipitation d'une forme d'hydroxyapatite sur sa surface, qui est la phase minérale de l'os. Ce même comportement apparaît in vivo.⁵² La bio activité avec les systèmes cellulaires vivant a également été étudiée et, jusqu'à présent, aucun effet toxique du SiP n'a été observé.⁵³

Toutes ces épreuves affirment les potentialités du Si poreux pour devenir un biomatériau important et une interface souple entre le monde de l'électronique et biologique notamment pour la construction de dispositifs implantables in vivo et aussi pour la fabrication une variété de systèmes de bio-détection pour diverses applications.

5.4. Oxydation de silicium poreux :

L'oxydation est la méthode de passivation plus utilisés : en raison de plusieurs avantages elle est simple à réaliser et elle peut produire des surfaces biocompatibles⁵³ qui peut encore être fonctionnalisés par silanization.⁵⁴ En outre, il existe différentes méthodes qui peuvent être choisies pour effectuer une oxydation : oxydation thermique^{55,56}, oxydation chimique⁵⁷, l'oxydation assistée par plasma⁵⁸, oxydation améliorée par des techniques d'irradiation⁵⁹ et l'oxydation anodique.⁶⁰

L'oxydation thermique fourni une meilleure alternative aux oxydes natifs et chimiques avec isolation uniforme et relativement moins de défauts dans l'interface. Chauffage sous air permettra d'accélérer le processus d'oxydation, ce qui rend l'ensemble de la surface hydrophile due au groupement d'hydroxyle Si-OH.

6. Les paramètres de fabrication

Les propriétés des couches de silicium poreux comme la porosité, le diamètre des pores et leur morphologie, l'épaisseur des couches, sont fortement dépendantes des conditions d'anodisation.

Ces conditions sont :

- Le rapport de concentration HF /Ethanol
- La densité de courant
- Le type du substrat
- La résistivité du silicium
- L'orientation cristalline
- La température
- Le temps d'anodisation

Seule la prise en compte et le contrôle de tous ces paramètres permet d'obtenir une reproductibilité optimum des couches réalisées.

7. Réalisation et caractérisation de silicium poreux

7.1. Procédé expérimental

Dans ces expériences les substrats de silicium utilisés sont des substrats monocristallins de 500 μm d'épaisseur, obtenus par une croissance cristalline de Czochralski (CZ), avec les deux faces polies, d'orientation $\langle 100 \rangle$, de type p dopé au bore. Leur résistivité était de 0.08-0.12 $\Omega\text{ cm}$. Les échantillons ont été coupés en un 1 cm \times 1 cm de taille et nettoyées dans la solution piranha 1/3 (en volume) $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{H}_2\text{SO}_4$ à 100 ° C pendant 30 minutes et rincées à l'eau désionisé, séchée à l'azote puis plongée pendant 10 s dans le HF (47 %) pour dissoudre l'oxyde natif puis rincée et séchée de nouveau. Le silicium poreux est obtenu par attaque anodique du silicium massif dans une cellule électrochimique. Electrolyte été un mélange HF/éthanol (1/1 en volume), le temps d'attaque été 30 s et la densité du courant d'anodisation applique été 80mA cm^{-2} . Ces conditions ont été choisi pour la formation des mésopores afin d'assure une modification chimique uniforme tout au long de la surface de l'échantillon ce qu'est très utile pour l'immobilisation des enzymes⁶¹. Après la formation des pores, l'échantillon est bien rincé à l'eau désionisé et bien séché sous un flux d'azote. Les couches poreuses obtenues sont caractérisées par FTIR et MEB.

7.2. Cellule électrochimique

La cellule électrochimique utilisée dans ce travail est représentée dans la figure I-13. Elle consiste en une cuve en polychlorotrifluoroéthylène (PTFE ou téflon) qui résiste aux attaques de l'acide fluorhydrique ; elle est conçue pour pouvoir contenir le substrat de silicium, qui constitue l'anode, en position horizontale placé au fond de la cellule. La face arrière du substrat par laquelle le contact électrique est pris, est plaquée contre un contact en cuivre. La face avant est exposée à l'électrolyte constitué d'un mélange HF/éthanol. L'étanchéité au niveau du substrat est garantie par un joint en Viton qui délimite une surface utile de 0.8 cm^2 . La cathode est une électrode en platine (inattaquable par l'HF) sous forme de grille plongée dans l'électrolyte face au substrat de silicium. L'établissement d'un courant entre les deux électrodes déclenche le processus d'anodisation. Dans cette configuration, une bonne homogénéité de la densité de courant est assurée permettant d'obtenir des couches poreuses uniformes.

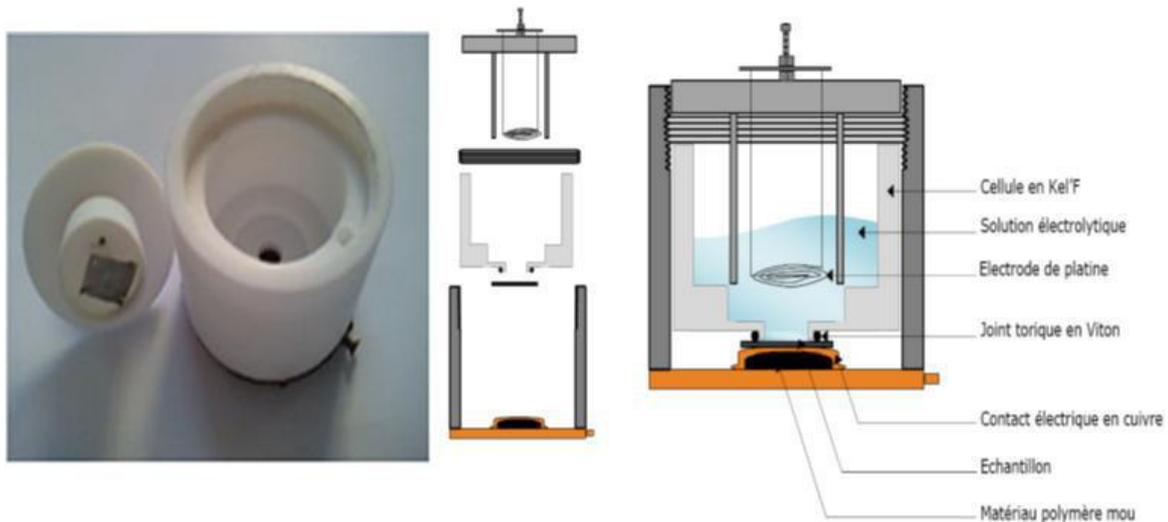


Figure I-13 : Schéma de la cellule utilisée pour la formation de silicium poreux

7.3. Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage

Un microscope électronique à balayage Philips a été utilisé pour effectuer les observations au MEB des couches SiP.

La formation de silicium poreux est confirmée par la micrographie MEB de la surface (Figure I-14-a) qui montre une taille moyenne des pores de l'ordre de 15 à 20 nm. La surface poreuse est homogène avec une distribution des pores uniforme. L'épaisseur de la couche poreuse a été déterminée par observation de l'échantillon en clivage (Figure I-14-b). Cette figure révèle la morphologie spongieuse du silicium poreux obtenu. La couche poreuse est régulière avec une épaisseur de 3µm.

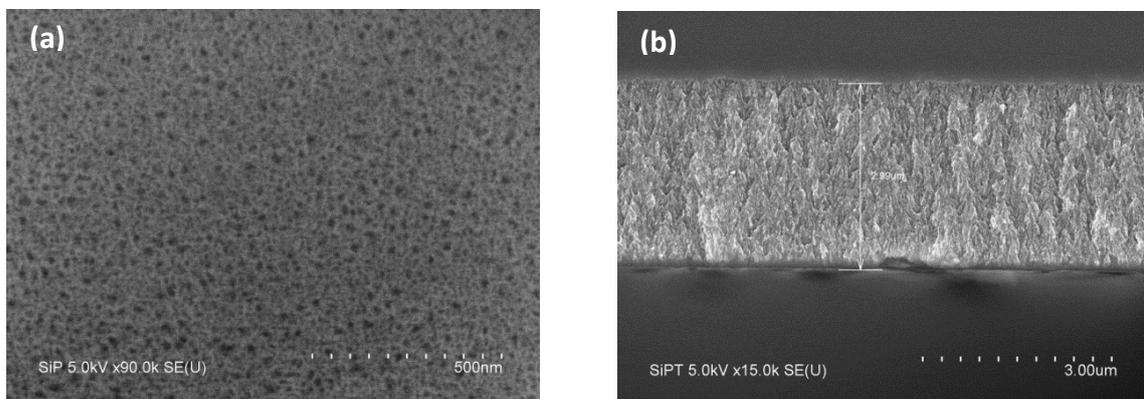


Figure I-14 : Micrographies au MEB du silicium poreux : a) Vue en surface, b) Vue en clivage.

7.4. Caractérisation par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres FTIR ont été enregistrés en utilisant un Bruker (55 Equinox) équipé d'un détecteur de sulfate de triglycine deutérié (DTGS). Les échantillons ont été montés dans une chambre d'échantillon dans une géométrie de transmission à une incidence normale. Tous les spectres FTIR ont été recueillis avec 64 balayages dans la région spectrale de 400 à 4.000 cm^{-1} à 4 cm^{-1} de résolution.

Le spectre FTIR présenté dans la figure I-15 exhibe tous les modes de vibrations caractéristiques des liaisons hydrures présentes à la surface du silicium poreux fraîchement préparé sans aucune autre impureté en surface. Il apparaît un triplé autour de 2085, 2115 et 2140 cm^{-1} attribué aux modes de vibration d'élongation des liaisons Si-H, Si-H₂ et Si-H₃, respectivement.⁶²⁻⁶⁵

La bande correspondant au mode de vibration de déformation de la liaison Si-H₂ est enregistrée vers 910 cm^{-1} (mode de cisaillement).⁶⁶

Aucune oxydation de surface n'a été détectée. Ceci est confirmé par l'absence d'une bande d'oxyde de silicium autour de 1000-1200 cm^{-1} .⁶⁷

Les oscillations sinusoïdales de la ligne de base sont dues aux interférences dans la couche mince de silicium poreux de faible indice optique.⁶⁸ L'observation de telles oscillations révèle de l'homogénéité de la couche poreuse obtenue.⁶⁹

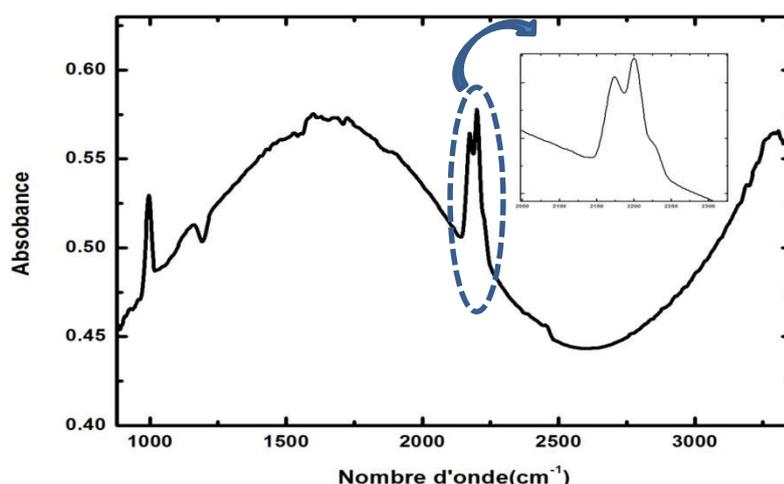


Figure I-15 : Spectre FTIR en transmission de la couche de silicium poreux

7.5. Angle de contact

Comme prévu, la surface de SiP hydrogéné fraîchement préparée montre un comportement hydrophobe avec un angle de contact de 113° (Figure I-16). Cette valeur étant supérieure à 90° , confirme l'hydrophobicité de ce matériau¹⁵. Il est à noter que les liaisons hydrures sont des fonctions apolaires avec une énergie de surface très faible, tandis que l'eau ultra pure est un milieu très polaire avec une énergie de surface très élevée, ce qui conduit à la réduction de l'interface eaux/SiP qui se mesure par un angle de contact élevé.

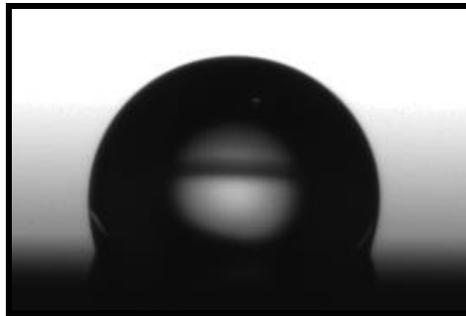


Figure. I. 16. Photographie d'une goutte d'eau ($3\mu\text{L}$) déposée à la surface du SiP

8. Caractérisation du silicium poreux oxydé

8.1. Oxydation chimique

8.1.1. Solution piranha

La solution piranha est un mélange à concentrations variables d'acide sulfurique (H_2SO_4) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci sert à nettoyer les résidus organiques sur les substrats. Le mélange, étant un fort oxydant, nettoie tout ce qui est organique et hydroxyle la surface de silicium (créé des groupes OH) et la rend hydrophile. La solution piranha est largement utilisée dans l'industrie microélectronique, surtout pour le nettoyage des résines photo résistives des plaquettes de silicium.⁷⁰

L'efficacité du mélange est due à la transformation chimique des réactifs en solution. La réaction est décrite ci-dessous :



Le peroxyde d'hydrogène se déshydrate et forme des ions d'hydroxonium (H_3O^+), des ions bisulfate et un atome d'oxygène.⁷¹

Nous avons utilisé la solution piranha pour oxyder la surface du silicium poreux chimiquement, nous avons utilisé un mélange typique ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2 = 3:1$ v/v) d'acide sulfurique concentré et peroxyde d'hydrogène à 30% en solution pendant 30min.

8.1.2. Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Après une oxydation de SiP par pyranha qui permet aussi d'éliminer toute trace d'espèce organique, nous obtenons le spectre IR présenté dans la figure I-17. On note les observations suivantes :

- La disparition des pics dus aux vibrations des liaisons SiH_x associées aux bandes 2085, 2115 et 2140 cm^{-1} .
- L'apparition :
 - d'un large bande entre 3200-2720 cm^{-1} , attribuable à la vibration d'élongation des liaisons O-H et SiO-H.
 - d'une bande de vibration importante de la liaison Si-O de 900 à 1100 cm^{-1} .⁷²⁻⁷³

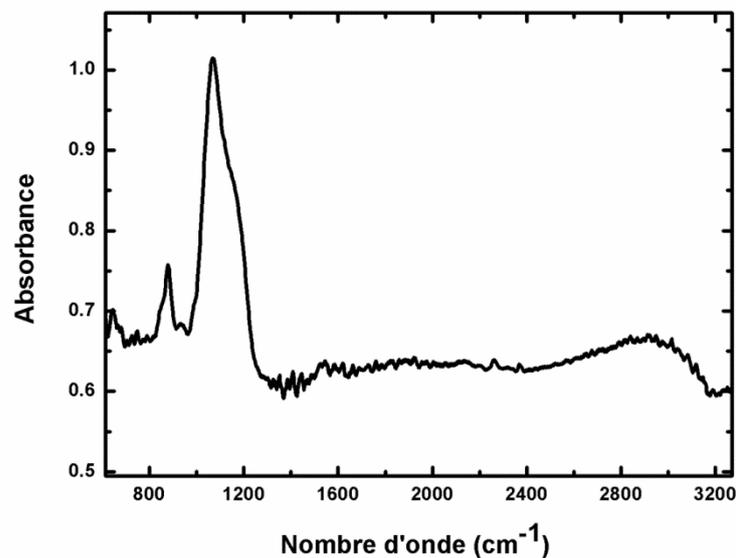


Figure. I. 17 : Spectre IR du silicium poreux oxydé.

Conclusion

Ce chapitre de thèse a été consacré à l'étude de silicium plat et silicium poreux comme matériau de base pour la réalisation de nos échantillons.

La première partie a été réservée à l'étude de différentes méthodes de préparation des surfaces de silicium plat hydrogénées. Les différentes méthodes de caractérisation présentées dans cette partie ont permis de mettre en évidence l'influence du mode de préparation de la surface de silicium plat sur ses différentes caractéristiques. La qualité topographique et chimique de ces surfaces de silicium plat hydrogénées destinées à être utilisées comme point de départ aux différentes fonctionnalisations a ainsi pu être mise en évidence.

Dans la deuxième partie nous avons présenté l'ensemble des conditions et des moyens d'élaboration utilisés pour la fabrication du SiP. Les substrats de silicium poreux ont été préparés par voie électrochimique, le silicium mésoporeux dont le diamètre des pores est de ~ 20 nm a été réalisé ; L'épaisseur des couches est de l'ordre de $2,5 - 3$ μm . Les couches poreuses obtenues sont homogènes et sans aucune oxydation de surface.

La qualité topographique et chimique de ces de silicium hydrogénées destinées à être utilisées comme point de départ aux différentes fonctionnalisations a ainsi pu être mise en évidence.

Références

1. **Higashi G.S., Chabal Y.J., Trucks G.W., and Raghavachari K.** Appl. Phys. Lett., 1990. 56, p. 656.
2. **Damien AUREAU**, Interface silicium/couche organique : Maîtrise des propriétés et fonctionnalisation, thèse doctorat, Ecole polytechnique, Paris, 2008.
3. **Weinberger B. R.; Deckman H. W.; Yablonovitch E.; Gmitter T.; Kobasz W.; Garoff S.** Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films 1985, 3, p. 887.
4. **Ubara H.; Imura T.; Hiraki A.** Solid State Commun. 1984, 50, p. 673.
5. **Chabal Y. J.** Surf. Sci. , 1986, 168, (1-3), p. 594.
6. **Higashi G. S.; Becker R. S.; Chabal Y. J.; Becker, A. J.** Appl. Phys. Lett. 1991, 5(15), p. 1656.
7. **Trucks G. W.; Raghavachari K.; Higashi G. S.; Chabal Y. J.,** Phys. Rev. Lett. 1990, 65, (4), p. 504.
8. **Burrows V. A.; Chabal Y. J.; Higashi G. S.; Raghavachari K.; Christman S. B,** Appl.Phys. Lett. 1988, 53, (11), p. 998.
9. **Thissen P.; Seitz O.; Chabal Y. J.** Prog. Surf. Sci. 2012. 87. (9-12), p. 272.
10. **Jakob P.; Chabal Y. J.** J. Chem. Phys. 1991. 95. (4), p. 2897.
11. **Jakob P.; Chabal Y. J.; Raghavachari K.; Becker R. S.; Becker A. J.,** Surf. Sci. 1992. 275. (3), p. 407.
12. **Allongue P.; Kieling V.; Gerischer,** Electrochimica Acta 1995, 40, p.1353.
13. **Jie YANG,** Etude des interactions multivalentes carbohydate/protéine sur des biocapteurs de silicium ; thèse doctorat, école polytechnique, paris, 2014.
14. **Larbi TOUAHIR,** Nouvelles architectures de biopuces à base de silicium amorphe, thèse doctorat, école polytechnique, paris, 2010.
15. **Coffinier Y.; Piret G.; Das M. R.; Boukherroub R.** C. R. Chimie. 2013,16, p. 65.
16. **Lehmann V.** Weinheim, 2002, p. 51.
17. **Uhlir A.,** Bell Syst. Tech. J. 1956. 35: p. 333.
18. **Fuller C. S.; Ditzenberger J. A.** J.Appl. Phys., 1956. 27: p. 544-553.

19. US patent assigned to IBM N°4057823 .111
20. **Imai K. ; Yoriome Y.** Jpn. J. Appl. Phys., 1979. 18: p. 281.
21. **Barla K., Herino R., Bomchil G.** J. Appl. Phys., 1986 .59, p. 439.
22. **Tsao S. S.** IEEE Circuits Devices Mag., 1987, 3, p. 3.
23. **Thomas N. J., Davis J. R., Keen J.M.et al,** IEEE Electron Device Lett. 1989, 10, p. 129.
24. **Farr J. P. G., Earwaker L. G., Ecuyer J. L., Sturland I. M., Cole J. M.** IEEE Electron. Device Lett., 1989. 10, p. 129.
25. **Bomchil G., Halimaoui A., Herino R.** Appl. Surf. Sci. 1989. 41/42, p. 604.
26. **Canham L. T.** Appl. Phys. Lett., 1990, 57, p. 1046.
27. **Bradley F.D., Ramírez-Porras A.** Advances in Chemical Sensors 2012, p151
28. **Foll H.** Appl. Phys. A , 1991, 53, p. 8.
29. **Chazalviel J. N.; Etman M.; Ozanam F.** J. Electro anal.Chem.1991, 297, p. 553.
30. **Ottow S.** Porous silicon, Electrochemistry, Current-voltage curves [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.tf.uni-kiel.de/matwis/amat/poren/ps.html>>, consulté en juillet 2003.
31. **Zhang X. G., Collins S. D., Smith R. L.** J. Electrochem. Soc., 1989, 136, p. 1561
32. **Lehman V.; Gösele U.** Appl. Phys. Lett., 1991. 58, p. 856.
33. **Rauscher, M., Spohn, H.** Physical Review E, 2001, 64: p. 031604
34. **Saakshi Dhanekar, SwatiJain,** Biosensors and Bioelectronics., 2013, 41, p. 54
35. **Pascual A.J., Fern F., Sanchez Andez. C.R.** Journal of Porous Materials, 2002 9, p. 57.
36. **Halimaoui A.,** Science and Technology, 1995, P. 33.
37. **O'Halloran G.M., Kuhl M., Trimp P.J., French P.J.** Sensors and Actuators A, 1997, 61, p. 415.
38. **Sophie Billat,** Contribution à l'étude de l'électroluminescence du silicium poreux de type p fortement dope, Thèse de doctorat, 1994, Grenoble.

39. **Anderson S.H.C., Elliot H., Wallis D.J., Canham L.T., Powell J.J.** Physica Status Solidi A, 2003, 197, p. 331.
40. **Cantina J. L., et al.**, Thin Solid Films, 1996, 276, p. 76.
41. **Buriak J. M.** Chemical Reviews, 2002, 10, p. 1271.
42. **Cunin F.; Devoisselle J. M.; Sailor M. J.** Technique de l'ingénieur, 2006, 49, p. 1.
43. **Sieval A. B., Demirel A. L., Nissink J. W. M., Linford M. R., Maas J. H. V. D., Jeu, H. Zuilhof W. H. D., Sudhölter E. J. R.** Langmuir, 1998, 14, p. 1759.
44. **Bayliss S. C.; Heald R.; Fletcher D. I.; Buckberry L. D.** Adv. Mater. 1999, 11. (4), p. 318.
45. **Bayliss S. C.; Buckberry L. D.; Harris P. J.; Tobin M. J.** Porous Mater. 2000. 7. (1-3): p. 191.
46. **Mayne A. H.; Bayliss S. C.; Barr P.; Tobin M.; Buckberry L. D.** Phys. Status Solidi A. 2000.182. (1), p. 505.
47. **Bayliss S.; Buckberry L.; Harris P.; Rousseau C.** Thin Solid Films 1997, 297, p. 308.
48. **Chin V.; Collins B. E.; Sailor M. J.; Bhatia S. N.** Adv. Mater. 2001.13. (24), p. 1877.
49. **Sun W.; Puzas J. E.; Sheu T.-J.; Liu X.; Fauchet P. M.** Adv. Mater. 2007. 19, p. 921.
50. **Anderson S.H.C., Anderson S. H. C., Elliott H., Wallis D. J., Canham L. T., Powell J. J.** Phys. Stat. Sol. (a), 2003. 197, p. 331.
51. **Canham L. T. and al.**, phys. stat. sol. (a), 2000, 182, p. 521.
52. **Jeffery Coffey L. and al**, phys. stat. sol. (a) 2003, 197, p. 336.
53. **Chin V.; Collins B. E.; Sailor M. J.; Bhatia S. N.** Adv.Mater. 2001, 13, p. 1877.
54. **Janshoff A.; Dancil K. P. S.; Steinem C.; Greiner D. P.; Lin V.S. Y.; Gurtner C.; Motesharei K.; Sailor M. J.; Reza Ghadiri M.** J. Am. Chem. Soc.1998, 120, p. 12108.
55. **Joakim Riikonen, Mikko Salomäki, Jessica van Wonderen, Marianna Kemell,Wujun Xu, OssiKorhonen, MikkoRitala, Fraser MacMillan, JarnoSalonen, and Vesa-PekkaLehto** Langmuir 2012, 28, p. 10573.
56. **Shih S., Tsai C., Li K.H., Jung K.H., Campbell J.C. and Jwong D.L.** Appl.Phys.Lett. 1992, 60, p. 633.

57. **Nakajima A., Ikatura T., Watanabe S. and Nakajama N.** Appl.Phys.Lett. 1993, 61, p. 1780.
58. **Hess D. W.;** IBM Journal of Research and Development, 2010, 43, p. 127.
59. **Xiao Y., Heben M.J., McCullough J.M., Tsuo Y.S., Pankove J. and Deb S.K.,** Appl.Phys.Lett. 1993, 62, p. 1152.
60. **Bsiesy A., Gaspard F., Herino R., Ligeon M., Muller F. and Oberlin J.C.,** J.Acoust.Soc.Am. 1991,138, p. 3450.
61. **Kilian K.A., Bocking T., Gooding J.J.,** Chem. Commun. 2009 , p. 630.
62. **Gupta P., Colvin V. B., George S. M.**Phys. Rev. B. 1988, 37, p. 8234.
63. **Burrows V. A., Chabal Y. J., Higashi G. S., Raghavachari K., Christman S. B.** Appl.Phys. Lett. 1988, 53, p. 998.
64. **Venkateswara R. A., Ozanam F., Chazalviel J.-N., Electrochem J. Soc.** 1991,138, p.153.
65. **Dietrich R., Grobe J., Feld H., Molec J.,** Struc. 1995, 349, p. 109.
66. **Salcedo W. J., Fernandez F. J. R., Galeazzo E., Dantas Michel O. S.** Brazilian journal of Physics, 1997, 27, p. 158.
67. **DaFonseca C., Ozanam F., Chazalviel J. N.** Surface Science, 1995, 365, p.1.
68. **Clark F. R. S., Moffatt, D. J.** Applied Spectroscopy, 1978, 32, p. 547.
69. **Theib W.** Surface Science Report, 1997, 29, p. 91.
70. **Racheva-Stambolieva T. M.,** Tehnologi chnios novena microelectronic kata, Sofia, 1991.
71. **Diyana BADEVA,** Elaboration et caractérisation de nanocomposites organiques à matrice de silicium poreux. Exemple du Poly (3'- acide acétique -2,2'-5',2'' ter thiophène) et de ses complexes, Thèse de doctorat, Université de Nantes, 2010.
72. **Hidek Koyama, yuka Matsuchita, Nobuyoshi koshida,** J.Appl.phy. 1998, 83 (3), p. 1776.
73. **Vivet F., Bouchoule A., Boufendi L. J. of App. Phys.** 1998, 83 (12), p.7474.

Chapitre 2

FONCTIONNALISATION DES SURFACES DE SILICIUM ET DE SILICIUM POREUX

Il est actuellement important d'étudier le greffage de groupes organiques sur des substrats solides pour leur utilisation potentielle comme couches de reconnaissance pour le développement de capteurs biologiques. Dans ce cadre, les surfaces portant des terminaisons carboxyliques ou amines sont particulièrement attrayantes, car ils peuvent être modifiés facilement pour former des liaisons covalentes contrôlées avec des sondes biologiques à la surface par la formation d'une liaison amide. Ceci est généralement effectué par l'activation des groupes acide carboxylique dans des conditions douces en utilisant ce que n'appelle les réactifs de couplage peptidiques (carbodiimides, d'ammonium et de phosphonium de sels des dérivés de benzotriazole, les sels d'uranium ...), ce qui permet la formation de liaisons amide avec les amines primaires.

Dans ce chapitre, l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) a été immobilisée sur la surface de silicium plan et silicium poreux (SiP) en utilisant deux stratégies. Dans la première méthode, les chaînes acides ont été greffées de façon covalente sur la surface du silicium plan et SiP hydrogénés par réaction d'hydrosilylation. Les surfaces terminées par des fonctions acides obtenus ont été activées en utilisant N-hydroxysuccinimide (NHS) en présence d'un agent de couplage peptide-N-éthyl-N'- (3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC), les surfaces résultantes ont été mises à réagir avec le groupe amine résidus dans la lysine de l'AChE pour accrocher l'enzyme par une liaison amide covalente. Dans la deuxième méthode, la surface de silicium poreux a été hydroxylée dans une solution piranha, suivie d'une réaction de silanisation avec du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) pour former une surface terminée par des fonctions amines ; le couplage de l'AChE à la surface modifier par la formation de liaisons amides. Les surfaces seront caractérisées par différentes méthodes de caractérisations.

Partie I : Greffage covalent d'une monocouche organique

1. Introduction

Parmi les possibilités d'évolution des technologies basées sur le matériau silicium, la réalisation de dispositifs hybrides combinant les caractéristiques physiques du semi-conducteur et les améliorations apportées par la présence de molécules organiques en surface apportent de réelles promesses. Le greffage des molécules organiques sur une surface de silicium ne permet pas seulement la fonctionnalisation pour l'immobilisation des biomolécules, mais il permet aussi de stabiliser la surface, ces molécules organiques sont liées à la surface par les liaisons Si-C ou Si-O-Si voir la figure II-1.

L'approche la plus pratique pour former des monocouches à travers les liaisons covalentes Si-C est l'*hydrosilylation*¹⁻⁶ par une réaction thermique, catalytique, ou photochimique des alcènes ou des chaînes alcynes avec la surface de Si terminée par des hydrures. Pour éviter la formation d'oxyde de silicium lors de la formation de la monocouche, la réaction d'hydrosilylation doit être réalisée dans une atmosphère inerte avec des réactifs complètement désoxygénés. Par ailleurs, les surfaces de silicium oxydées peuvent être fonctionnalisées avec des réactifs tels que les chloro- ou alkoxy-silanes. Les sites Si-OH de surface sont utilisés pour la modification chimique de surface. Les organosilanes réagissent avec les Si-OH pour conduire à la création de liaisons –Si-O-Si-, chimiquement très stables.⁷ La formation de liaisons siloxane (Si-O-Si) est obtenue par une réaction de *silanisation*.

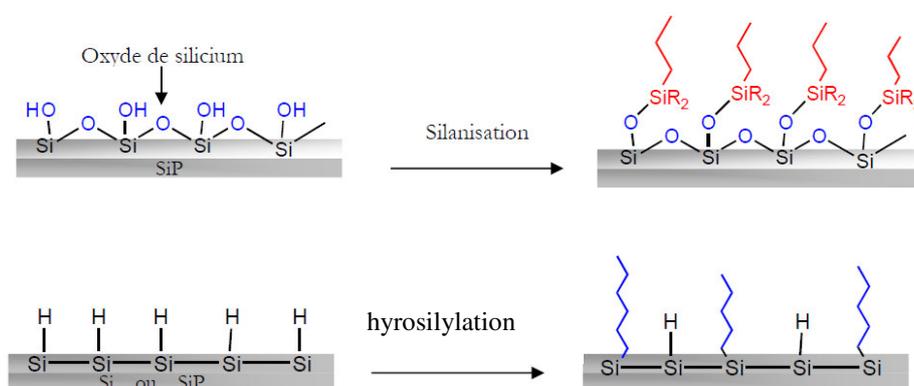


Figure II-1 : Préparation des monocouches auto-assemblées(SAM) sur silicium et silicium poreux

1.1. Fonctionnalisation par silanisation

Un organosilane est un composé de formule $R-Si(X)_3$ où X est un groupement hydrolysable (alcoxyle ou halogénure) qui lui permet de créer une liaison covalente avec la surface et R un groupement non hydrolysable pouvant être porteur d'une fonction d'intérêt pour une application visée.

Lorsqu'un organosilane se trouve en présence d'eau, la première réaction qui a lieu est l'hydrolyse des groupements alcoxyle ou halogénure en silanols (Si-OH). Ensuite, le silane peut se condenser sur lui-même (homocondensation) pour former des oligomères, ou sur une surface d'oxyde (greffage) afin d'en modifier les propriétés. Il est important de noter que les silanes peuvent créer trois liaisons covalentes avec les molécules voisines ou le substrat. Les silanes forment ainsi un réseau tridimensionnel de liaisons covalentes très fortes, appelées siloxanes (Si-O-Si). Dans notre travail pour la silanisation de nos échantillons nous avons utilisé 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) comme organosilane, la figure II-2 montre les différentes étapes suivies pour la silanisation de la surface de silicium.

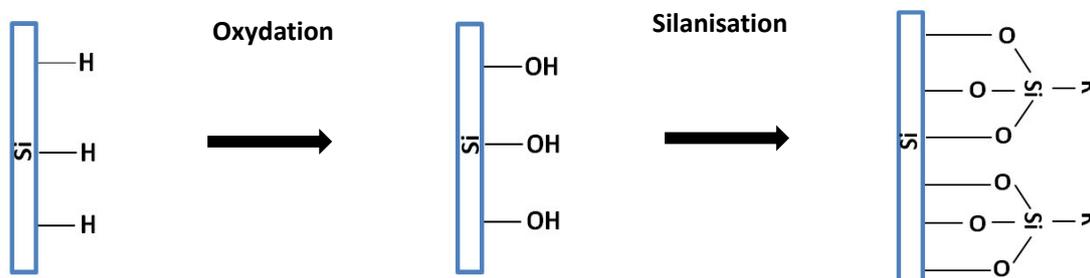


Figure II-2 : Réaction de silanisation entre les groupements d'ancrage du silane avec les groupements silanols (Si-OH) de la surface de silicium oxydée.

1.2. Fonctionnalisation par Hydrosilylation

Au cours de ces dernières années, plusieurs travaux ont été réalisés sur la préparation de monocouches organiques sur des surfaces de silicium hydrogénées. Les monocouches résultant fournissent une grande flexibilité dans l'amélioration des propriétés de surface, et

aussi permettent l'accrochage des biomolécules ou; quelques exemples de ces biomolécules et des groupements (bio-) fonctionnels sont présentés sur la figure II-3.

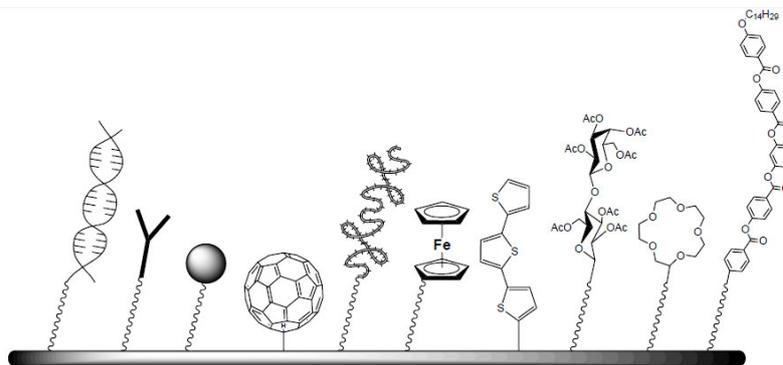


Figure II-3 : Certain nombre de groupes fonctionnels qui ont été attachés de manière covalente à des surfaces de silicium hydrogéné (de gauche à droite): l'ADN⁸, des anticorps⁹, des nanoparticules d'Or¹⁰, fullerènes¹¹, des protéines^{12,13}, des groupes de ferrocène¹⁴, oligothiophènes¹⁵, hydrates de carbone¹⁶, éthers couronne¹⁷, et cristaux liquides en forme de banane¹⁸.

La chimie de la fonctionnalisation organique des surfaces solides décrit de façon assez documentée la réaction d'hydrosilylation, la réaction consiste en l'insertion d'une liaison carbone - carbone insaturée dans une liaison silicium – hydrogène, comme il est montré sur la figure II-4.

La réaction d'hydrosilylation entre des alcènes $H_2C=CH-(CH_2)_{n-2}-X$ ($X = CH_3, COOH, COOEt$) et une surface hydrogénée de silicium conduit au greffage de monocouche de chaînes alkyles via la formation de liaisons covalentes Si-C. La réaction peut être activée thermiquement¹⁹⁻²¹, par irradiation UV²² ou catalysée par des acides de Lewis^{24,25}. Le greffage peut être réalisé en utilisant des solutions de précurseurs purs ou en solution dans un solvant.

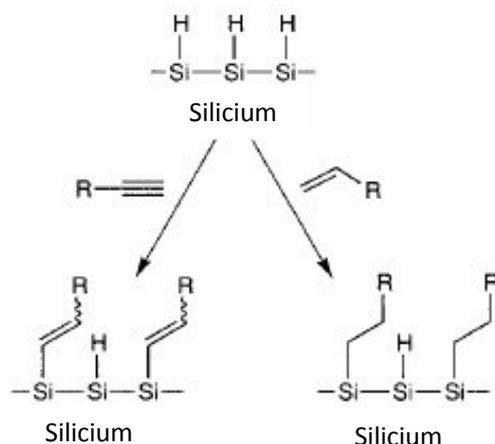


Figure II-4 : Hydrosilylation d'alcènes ou alcynes implique l'insertion de la liaison insaturée carbone-carbone dans la liaison de silicium-hydrogène, cédant des surfaces avec des terminaisons alkyle et alcényle, respectivement.

Lindford et al.^{1,25} furent les premiers à réaliser une liaison silicium – carbone à la surface d'un cristal de silicium préalablement débarrassé de son oxyde.

Le groupe de Zuilhof a montré qu'il était possible de procéder à l'hydrosilylation à une température comprise entre 150 et 200°C en fonction de la longueur des chaînes utilisées.^{3,26}

Le groupe de Chidsey a par la suite mis au point une méthode photochimique. Il est connu qu'une radiation UV peut initier l'hydrosilylation d'un composé insaturé via la rupture homolytique d'une liaison Si-H. L'irradiation d'une surface de Si (111) hydrogène fraîchement préparée avec une lumière UV (185 et 253,7 nm) en présence d'un alcène aliphatique provoque hydrosilylation en 2 h à température ambiante. Les monocouches obtenues ont montré une forte organisation.⁶

Cependant, des études ultérieures utilisant la lumière visible^{27,28} ayant une énergie inférieure à celle de la liaison Si-H (3,5 eV) et des liaisons Si-Si (2,3 eV) ont également été trouvés pour initier la réactivité, ce qui suggère que le mécanisme n'est pas radicalaire.

Les auteurs ont montré que la lumière favorise la formation d'un trou sur la surface qui pourrait réagir avec la liaison nucléophile de l'alcène pour former un β -carbocation qui réagirait ensuite avec un hydrure adjacent.

Dans le cadre des biocapteurs et donc de notre étude, les surfaces greffées par des chaînes alkyles terminées par des groupements carboxyles sont particulièrement intéressantes. Elles peuvent en effet être facilement activées pour accrocher à la surface une biomolécule de façon covalente via une réaction d'amidation.

Pour obtenir des surfaces terminées par des fonctions acides (-COOH) en une seule étape, nous avons utilisé un précurseur acide ω -alcénoïque : l'acide undécylénique ($\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$).

2. Hydrosilylation photochimique des surfaces de Si-H et Si-Hx

2.1. Mode opératoire

Comme pour les surfaces hydrogénées, la qualité des produits et la propreté de la verrerie sont primordiales. Les produits de greffage : l'acide undécylénique $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_2$ est fourni par Acros avec un taux de pureté de 99%. Afin d'éliminer toutes les contaminations organiques, la verrerie est soigneusement et successivement lavée à l'éthanol puis abondamment rincée à l'eau MilliQ (ultrapure 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}$). Il est important de travailler en milieu sec pour éviter la formation d'une couche d'oxyde sur la surface de silicium. Afin de prévenir la formation d'oxyde, l'ensemble de la verrerie et des solutions est dégazé à chaud sous argon.

Dans un tube de Schlenk préalablement dégazé pendant 15 minutes à 100°C, la solution d'acide undécylénique est introduite puis dégazée à son tour pendant 30 minutes. Le tube de Schlenk est ensuite refroidi à température ambiante pendant 15 minutes avant d'y introduire la surface hydrogénée fraîchement préparée. Une fois l'échantillon introduit, le dégazage continu quinze minutes avant de fermer le tube de Schlenk. Et finalement le tube de Schlenk est placé 3 heures dans un réacteur sous irradiation UV ($\lambda = 312 \text{ nm}$; 6 mW cm^{-2})(figure II-5). Après, le tube de Schlenk est refroidi à température ambiante. L'échantillon est ensuite rincé 2 fois pendant 30 mn à l'acide acétique chauffé à 75°C sous argon.

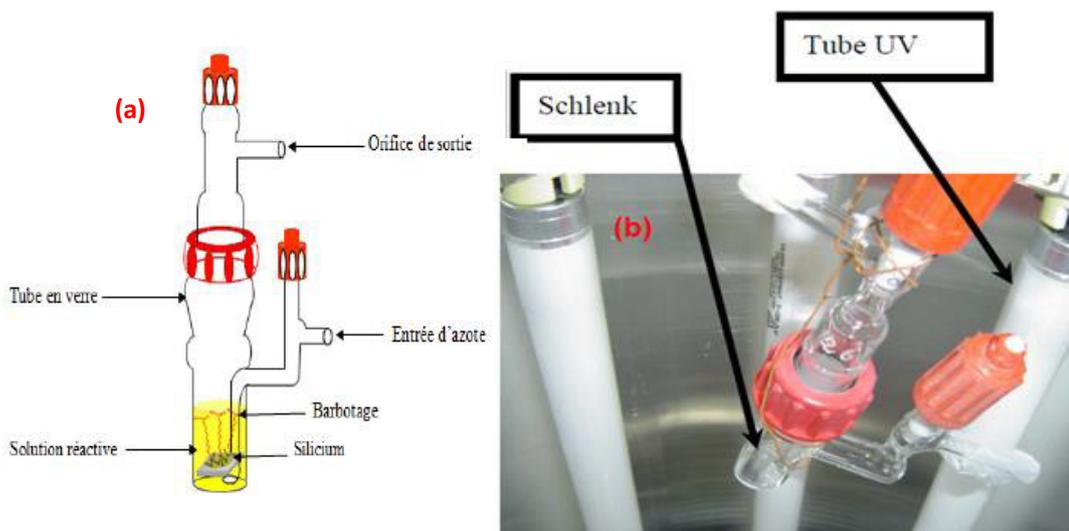


Figure II-5 : a) Schéma du Schlenk utilisé pour le barbotage, b) Photographie de la réalisation expérimentale du greffage photochimique (au Laboratoire Physique de la Matière Condensée : LPMC)

- *Importance du rinçage* : Au Laboratoire PMC (France), Fauchoux et coll. ont montré l'importance des rinçages des surfaces acides avec l'acide acétique pour enlever les molécules d'acide undécylénique en solution qui, n'ayant pas réagi, forment des dimères via des liaisons hydrogènes avec les acides greffés à la surface.^{29,30} Le rinçage de la surface par les solvants usuels (THF, CH_2Cl_2) s'est avéré inefficace. Seul l'acide acétique utilisé à chaud a permis, par substitution, de casser les liaisons hydrogènes, éliminant ainsi les molécules d'acide non greffées.³⁰

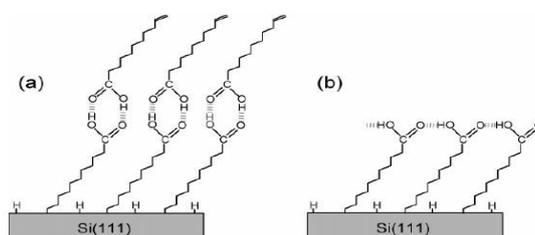


Figure II-6 : Surface de silicium modifiée par un acide : a) Après un rinçage avec CH_2Cl_2 . b) Après un rinçage avec CH_3COOH .³⁰

2.2. Caractérisation par microscopie à force atomique

Afin de déterminer la densité de sondes présentes à la surface, il est nécessaire de vérifier la propreté des surfaces. Celles-ci sont imagées par AFM afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'espèces physisorbées sur notre surface, dues à des contaminations ou à un mauvais rinçage.

La figure II-7 représente les images obtenues après fonctionnalisation par voie photochimique avec l'acide undécylénique et rinçage à l'acide acétique. On note que la structure en marches d'escalier est comparable à celle d'une surface hydrogénée. La présence de terrasses planes confirme la formation d'une monocouche homogène sur la surface.

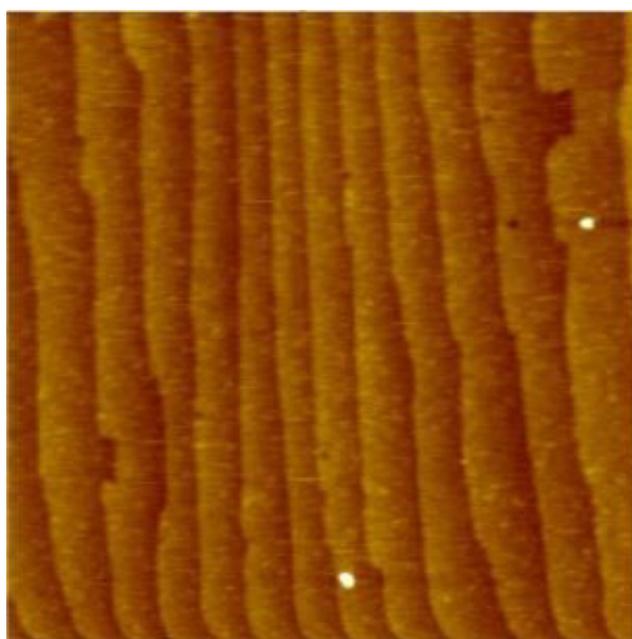


Figure II-7 : Images AFM d'une surface $\text{Si}(111)\text{-C}_{10}\text{H}_{20}\text{COOH}$ préparée par un greffage photochimique (a) $1 \times 1 \mu\text{m}^2$

2.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Dans notre travail les couches acides ont été caractérisées par infrarouge en mode ATR. La figure I-8 montre les spectres en polarisation p et s, de surfaces acides obtenues par greffage photochimique. La référence étant la surface hydrogénée. Nous constatons (voir la figure (II-8-a)) trois pics négatifs autour de 2085 , 2115 et 2135 cm^{-1} , attribués aux modes de vibration d'élongation des liaisons Si-H, Si-H₂ et Si-H₃ en polarisation p et s indiquent la

disparition de ces liaisons, de même dans la figure II-8-b le pic négatif à 2083 cm^{-1} en polarisation p indique la disparition de liaisons Si-H.

L'encombrement stérique des molécules ne permet pas la substitution complète des liaisons Si-H. En effet, le diamètre des molécules que l'on souhaite greffer à la surface est d'ordre de 4,3 Å, alors que la distance entre 2 liaisons Si-H est de 3,84 Å.^{31,32} Théoriquement 50% des groupements Si-H peuvent être substitués. Les groupements SiH restants sont responsables de la contribution positive large mais de faible amplitude de part et d'autre du pic négatif SiH.

La fonctionnalisation de la surface est confirmée par la présence des pics associés aux vibrations des différentes liaisons du groupement $-\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{COOH}$. Le pic intense à 1710 cm^{-1} est caractéristique du mode de vibration de la liaison C=O. Les petits pics à 1290 et 1415 cm^{-1} sont associés aux vibrations du groupement fonctionnel C-OH (figure II-8-b). Les pics situés à 2850 et 2920 cm^{-1} correspondent aux modes de vibration d'élongation symétrique et antisymétrique des groupements CH_2 . Le mode de vibration de déformation δCH_2 est aussi visible à 1465 cm^{-1} .

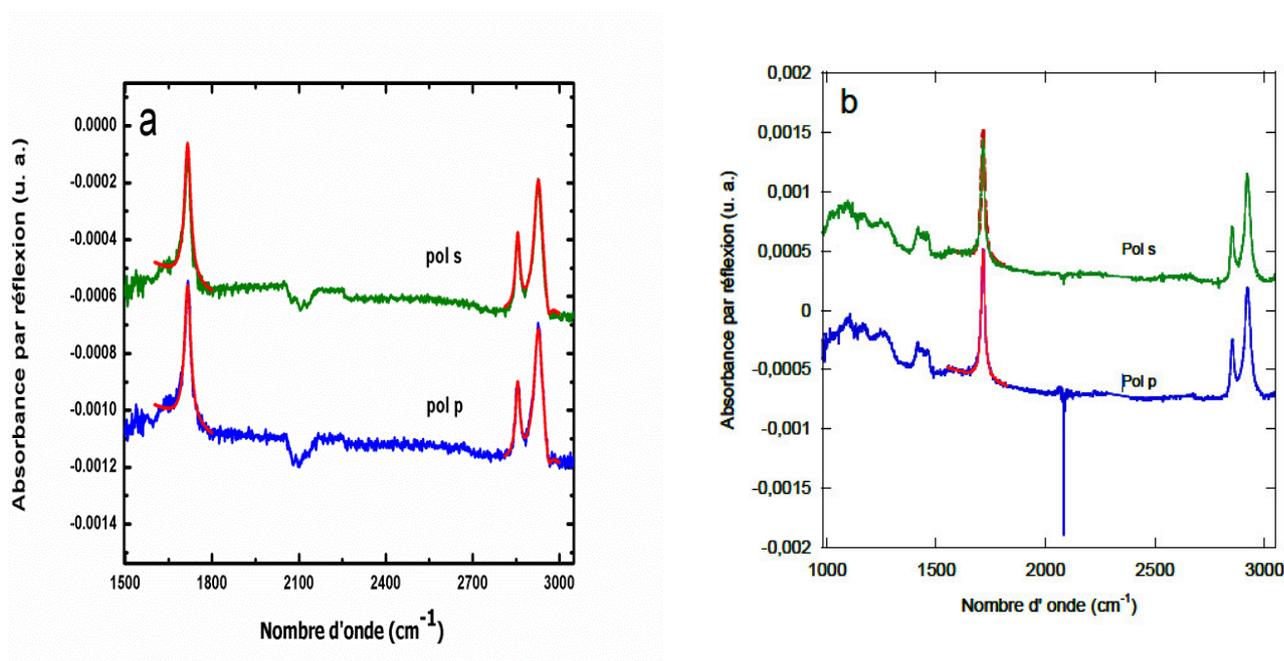


Figure II-8 : Spectres infrarouges en polarisation p (bleu) et s (vert) de surfaces acides préparées par voie photochimique. Le spectre de référence est une surface rugueuse Si-Hx(a) et une surface atomiquement plane préparée dans NH_4F (b). Les courbes en rouge correspondent aux ajustements du pic C=O et CH_2 .

Il est par ailleurs possible de déterminer quantitativement la composition de la couche, comme l'ont montré Faucheux et al. et d'en déduire le taux de greffage. En intégrant l'intensité du pic C=O, nous retrouvons que les surfaces acides préparées à partir de surfaces hydrogénées dans HF (SiHx) présentent une densité de sondes égale à $1.69 \times 10^{14} / \text{cm}^2$, ce qui correspond à un taux de recouvrement de 21%. La rugosité de la surface SiHx est la raison pour laquelle le taux de greffage est faible.

2.4. Angle de contact

Après la réaction de la surface du SiHx dans l'acide undécylénique, nous constatons une diminution de la valeur de l'angle de contact à 60° (Figure II-9) par rapport à celle obtenue pour le Si-Hx fraîchement préparé (85°). Ceci confirme la formation des liaisons acides sur la surface de Silicium qui sont des terminaisons polaires.

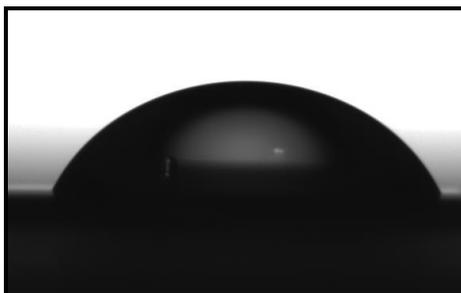


Figure II-9: Photographie d'une goutte d'eau ($3\mu\text{L}$) déposée sur la surface du Si après greffage de l'acide.

3. Hydrosilylation thermique d'acide undécylénique à la surface de silicium poreux

Le greffage d'une monocouche d'acide à la surface de SiP par hydrosilylation thermique consiste à faire réagir l'échantillon de SiP fraîchement préparé dans l'acide undécylénique chauffé à 150°C pendant 16h. La réaction est schématisée sur la figure II-10.

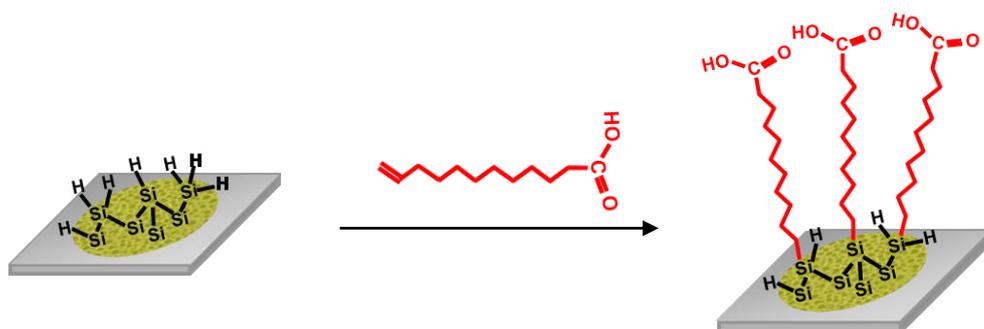


Figure II-10: Schéma de la réaction d'hydrosilylation d'acide undécylénique à la

3.1. Procédure expérimentale

Afin d'éviter toute contamination, il est essentiel d'être rigoureux dans la manipulation de la verrerie, des produits, et des échantillons. Il faut travailler en l'absence totale d'eau et d'oxygène pour éviter toute oxydation de la surface de silicium. Toutes les solutions sont dégazées sous azote dans des Schlenks. Les solutions de rinçage sont de qualité HPLC. Les autres réactifs utilisés sont de la plus grande pureté qui soit disponible.

L'échantillon de SiP est préparé juste avant le greffage afin d'éviter toute oxydation de la surface à l'air. Dans un Schlenk, on place 10 mL d'acide undécylénique qu'on laisse dégazer sous argon pendant 15 min. Par la suite, la surface de SiP fraîchement préparé est introduite dans l'acide et laissée encore 15 min sous barbotage d'azote à température ambiante. Le Schlenk est fermé hermétiquement grâce à ses robinets en téflon, placé dans un bloc d'aluminium chauffé à 150°C et laissé réagir pendant 16h (Figure II-11).

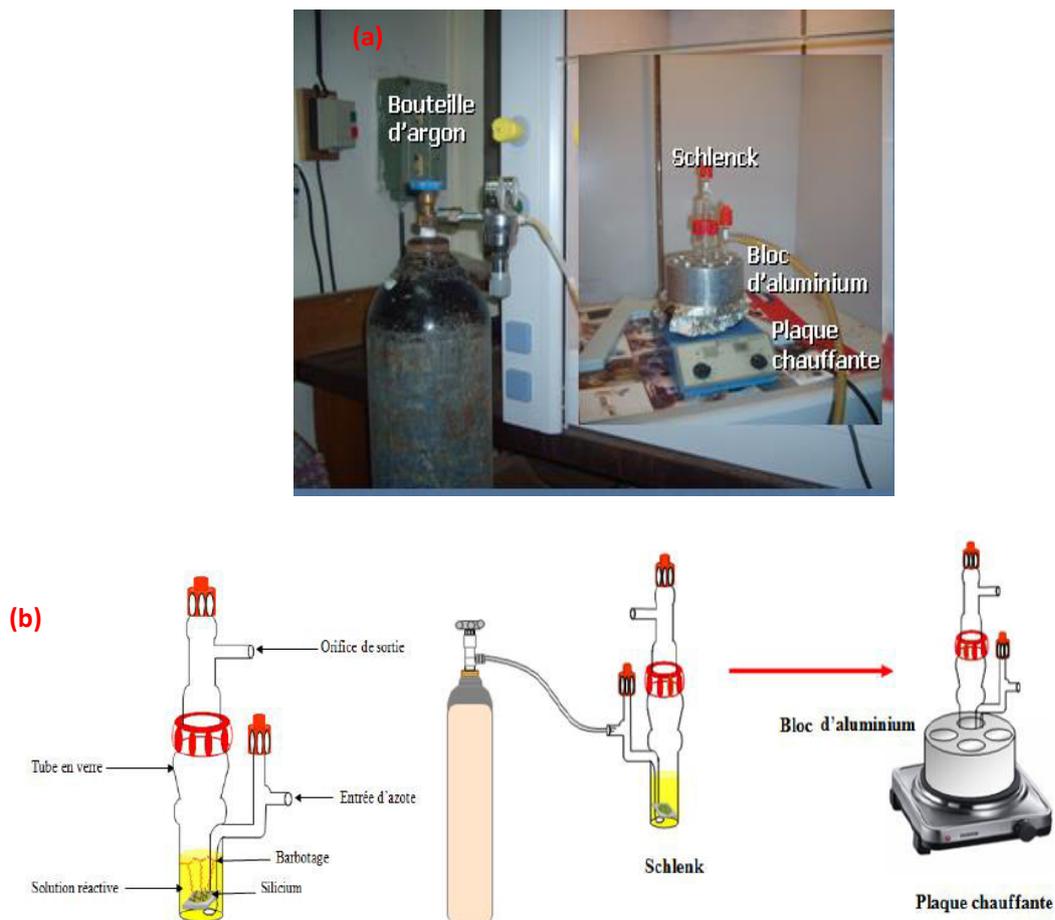


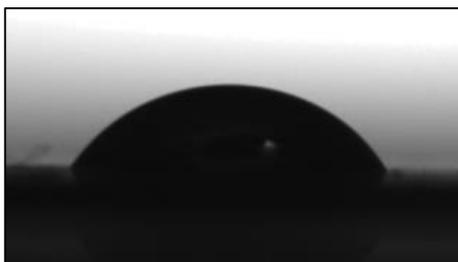
Figure II-11 : a) Photographie du protocole expérimentale de greffages thermiques (au CRTSE).

b) Schéma du Schlenk utilisé pour le barbotage et le montage utilisé pour le greffage thermique.

Lorsque la réaction est terminée, le Schlenk est retiré du bloc d'aluminium et laissé refroidir à température ambiante sous la hotte. La surface de SiP fonctionnalisée est retirée de la solution de greffage et rincée deux fois sous barbotage d'argon pendant 30 min, dans l'acide acétique de qualité HPLC à 75°C (bain Marie). L'acide acétique est préalablement dégazé à l'argon avant l'introduction de l'échantillon. La surface rincée est récupérée dans un bécher contenant de l'acide acétique à chaud puis elle est séchée sous un flux d'azote.

3.2. Caractérisation par angle de contact du Silicium poreux après greffage de l'acide

Après la réaction de la surface du SiP dans l'acide undécylénique, nous constatons une diminution de la valeur de l'angle de contact à 58° (Figure II-12) par rapport à celle obtenue pour le SiP fraîchement préparé (113°). Ceci confirme la formation des liaisons acide sur la surface du silicium poreux.



FigureII-12 : Photographie de 3 d'une goutte d'eau (3 μ L) déposée sur la surface du SiP après greffage de l'acide.

3.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge

La figure II-13-b présente le spectre infrarouge d'une surface de SiP après greffage thermique dans l'acide undécylénique.

Afin de bien discerner les modifications survenues lors du greffage, le spectre infrarouge de la surface de SiP avant modification est présenté sur la même figure : Figure II-13-a. La référence de ces spectres est la surface de silicium avant l'anodisation électrochimique.

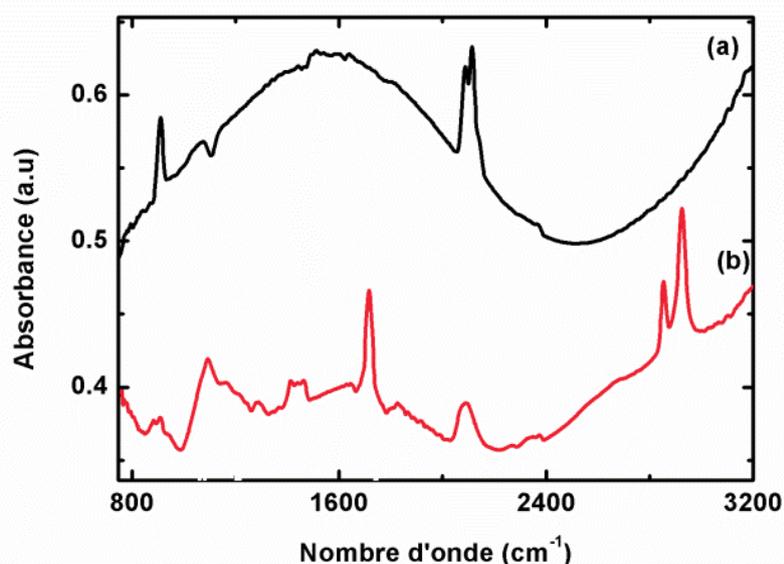


Figure II-13 : Spectre FTIR d'une surface de silicium poreux a) avant modification. b) après greffage thermique d'acide undécylénique.

La preuve du greffage effectif est donnée par les pics associés aux vibrations des différentes liaisons de la molécule greffée observées dans le spectre IR de la surface de SiP figure II-1-b après greffage thermique de l'acide undécylénique. Les bandes à 2855 et 2925 cm^{-1} sont associées respectivement aux modes d'élongation symétrique et antisymétrique des groupements méthylène des chaînes carbonées (CH_2). Les modes de vibration de déformation correspondant, apparaissent vers 1460 cm^{-1} . La bande intense vers 1710 cm^{-1} est attribuée à la vibration d'élongation de la liaison $\text{C}=\text{O}$ du groupe carboxylique. Notons aussi la diminution significative de l'intensité des bandes correspondant aux vibrations des liaisons Si-Hx à la surface de SiP (figure II-13-a). Ceci est dû à la consommation de celles-ci lors de la réaction d'hydrosilylation pour former les liaisons Si-C . Toutefois, ces bandes demeurent observables dans le spectre après la réaction de greffage (figure II-1-b), ce qui montre que seule une partie des liaisons Si-Hx a réagi. L'encombrement stérique entre les longues chaînes acides greffées en surface limiterait la consommation totale de toutes les liaisons Si-Hx présentes en surface.

2. La silanisation par 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES)

4.1. Procédure expérimentale

Le substrat de SiP fraîchement préparé est immergé dans une solution de Piranha, 1 : 3 H₂O₂ : H₂SO₄ (H₂O₂, 30% et H₂SO₄, 90 % pendant 30 minutes. Cette étape permet de supprimer toutes les impuretés organiques et de former une couche d'oxyde à la surface. Le tout est soigneusement rincé à l'eau DI et on le sèche sous un flux d'azote. La densité surfacique des groupes OH formés ne change pas lors d'une exposition à l'air.³³

L'APTES a été greffée de manière covalente sur la surface de SiP hydroxylé comme suit : le substrat est immergé dans une solution de 3% (v / v) APTES et 2% eau dans 95% (v / v) d'éthanol pendant 2 h à température ambiante sous agitation. Le substrat est ensuite rincé avec de l'éthanol pour éliminer les traces de APTES adsorbé sur la surface, ensuite le substrat est traité à 80°C pendant 20 min. La surface maintenant porte des terminaisons NH₂, les différentes étapes de la silanisation de la surface de silicium poreux sont résumé dans la figure II-14.

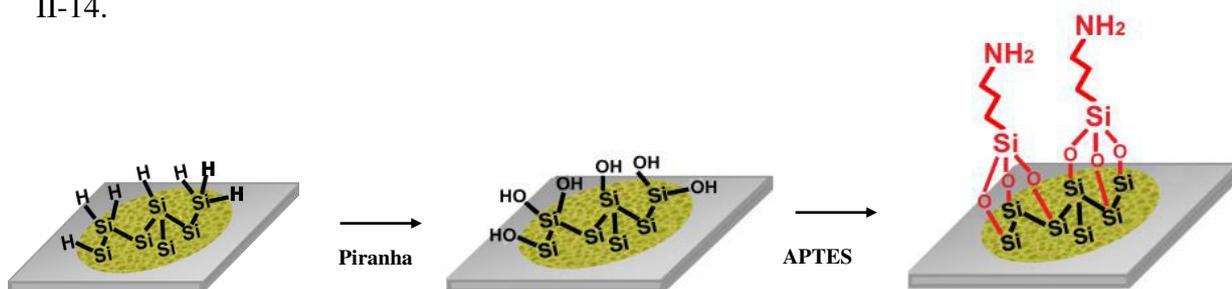


Figure II-14 : Schéma de la réaction d'oxydation de silicium poreux avec le piranha et le greffage de l'APTES sur SiP oxydé

4.2. Caractérisation par angle de contact du Silicium poreux après greffage de l'APTES

Après le greffage d'APTES sur silicium poreux oxydé, l'angle de contact a augmenté jusqu'à 40 ° (Figure II-15) confirmant la transformation des fonctions OH en groupes NH₂ moins polaires. Les monocouches ainsi générées sont extrêmement compactes. Cela permet dans le cas de l'APTES d'apporter un grand nombre de fonctions amines disponibles pour une post-fonctionnalisation.

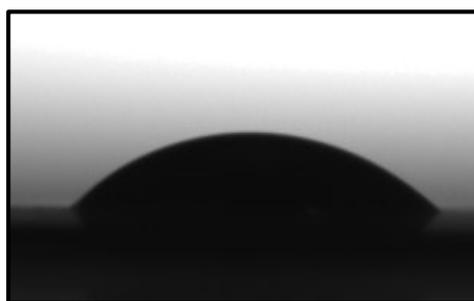


Figure II-15 : Photographie d'une goutte d'eau ($3\mu\text{L}$) déposée sur la surface du SiP après greffage d'APTES.

4.3. Caractérisation FTIR du SiP après greffage de l'APTES

La figure II-16-a, présente le spectre FTIR d'une surface de SiP fraîchement préparé. Après le traitement de cette surface SiP dans une solution piranha, le spectre FTIR dans la figure II-16-b montre une large bande d'absorption de l'oxyde entre 1000 et 1250 cm^{-1} due aux modes d'élongation de la liaison Si-O-Si. La bande observée autour de 875 cm^{-1} correspondant au mode de déformation Si-OH qui indique la formation de groupes hydroxyle. Nous pouvons également noter la disparition des bandes SiH_x. Après la modification avec APTES, certains changements sont observés dans le spectre FTIR de la surface PSi-NH₂ (Figure II-16-c). On peut remarquer la diminution importante de l'intensité de la bande Si-OH à 875 cm^{-1} en raison de la réaction de silanisation. Les faibles bandes d'absorption entre 1520 et 1700 cm^{-1} sont désignés en tant que mode de déformation de -NH₂ et -NH₃⁺.

La région spectrale $\sim 1000\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ implique une combinaison de modes de vibration des liaisons Si-O-Si y compris ceux qui sont formés par attachement d'APTES à la surface d'oxyde.³⁴ Ces résultats suggèrent que l'APTES est ancrée avec succès sur la surface de SiP.

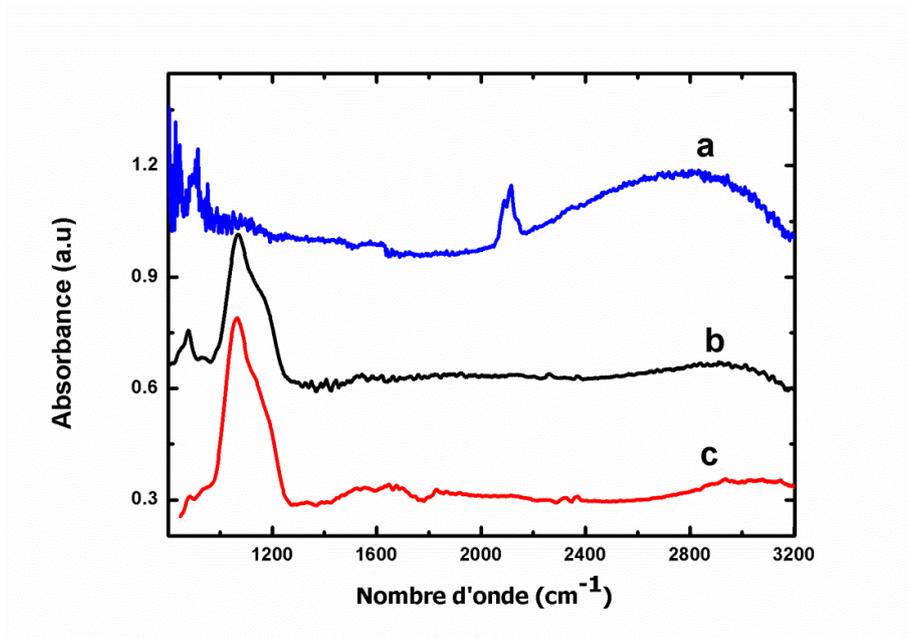


Figure II-16: Spectre FTIR d'une surface de silicium poreux a) avant modification. b) après oxydation avec piranha c) après greffage APTES.

Partie II : Préparation de la surface activée

1. Introduction

L'étape suivante consiste à activer la fonction acide pour former un ester réactif vis-à-vis des fonctions amines primaires. Elle consiste à transformer la fonction acide carboxylique en un ester activé en remplaçant le groupement hydroxyle (-OH) de l'acide par un autre groupement plus labile qui part plus facilement sous l'attaque nucléophile de l'amine contenue dans les enzymes. Une des méthodes de couplage le plus couramment utilisée pour obtenir des surfaces actives est d'utiliser l'éthyle(diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) en présence de N hydroxysuccinimide (NHS) (Figure II.17). L'avantage de cette stratégie pour lier des biomolécules réside dans son faible coût, la non-toxicité, la solubilité dans l'eau et de l'auto-hydrolyse dans de l'eau qui n'a pas besoin de purification supplémentaire. L'utilisation de NHS est de former un NHS-ester intermédiaire relativement stable dans le but d'améliorer le rendement d'amidation final. Dans cette réaction, le -OH de l'acide carboxylique est ajouté sur la liaison imide d'EDC pour former l'urée de O-acyl instable qui est ensuite remplacé par NHS pour former NHS-ester "active" stable.

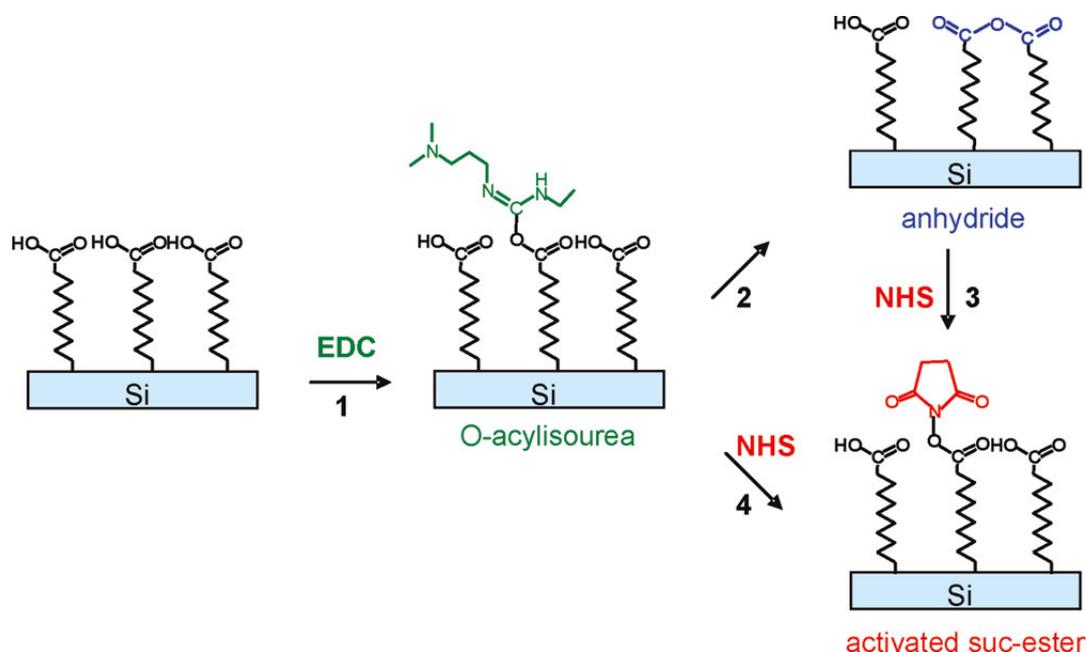


Figure II.17 Schéma décrivant la réaction d'activation de surfaces de silicium plat à terminaison carboxyle. Initialement, les groupes acides de la surface de silicium plat réagissent avec EDC conduisant à la formation de O-acyl urée (1). Par la suite, différentes voies sont disponibles avec la formation d'ester de succinimide (4), de l'anhydride (2), de l'urée N-acyl (3).³⁵

Les travaux effectués au sien de laboratoire de LPMC (France) par S. Sam et L. Touahir et al. sur l'étude de l'étape d'activation en travaillant avec des surfaces de silicium poreux ou cristallins.

Ils ont démontré que l'utilisation de la quantité équivalente d'EDC et NHS (5-10 mM) à 15 °C est importante pour éviter l'inachèvement ou des réactions secondaires et obtenir une bonne monocouche à terminaisons ester-NHS.³⁵⁻³⁷

2. Activation de la surface de silicium greffée (Si-COOH)

2.1. Procédé expérimental

L'activation est l'étape intermédiaire avant de pouvoir accrocher l'enzyme aux terminaisons acides par formation de la liaison amide.

Dans ce travail, l'activation est réalisée en transformant les terminaisons acides en ester de succinimidyle en utilisant le N-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de l'agent de couplage N-éthyl-N'-(3-diméthylminopropyl) carbodiimide (EDC) dans une solution aqueuse. L'EDC est un produit instable qui se dégrade rapidement par hydrolyse. Il est conservé sous atmosphère d'azote à -20°C. Par conséquent, les solutions d'EDC et de NHS sont préparées dans de l'eau froide juste avant la réaction afin de ralentir l'hydrolyse de l'EDC. Un mélange d'EDC et de NHS est dégazé sous azote pendant 15 min dans un Schlenk placé dans un bain marie à 15°C. La surface fraîchement greffée par des terminaisons acides est introduite dans le Schlenk et laissée réagir sous un barbotage continu d'azote à 15°C (Figure II-18). Après 90 min de réaction, la surface activée est retirée du Schlenk, rincée abondamment à l'eau DI et séchée sous un flux d'azote.

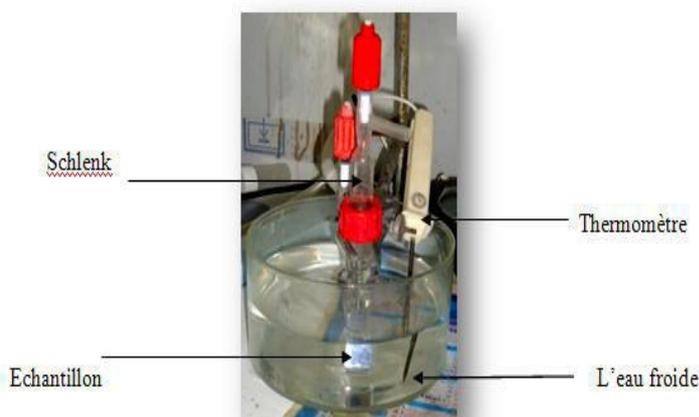


Figure. II. 18. Montage utilisé pour l'activation.

2.2. Caractérisation par microscopie à force atomique

La figure II-19 représente l'image obtenue après activation de surfaces acides, on note que, la structure est comparable à celle d'une surface hydrogénée. La présence de terrasses planes confirme la formation d'une monocouche homogène sur la surface.

La surface est propre et chimiquement homogène, aucune impureté ne peut gêner les prochaines étapes chimiques qui permettent de finaliser la fonctionnalisation de la surface.

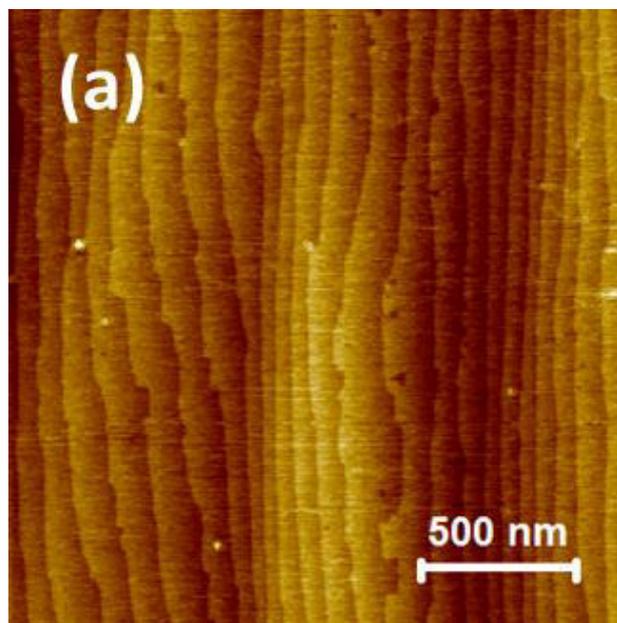


Figure II-19 : Images AFM de surfaces activées 90 min à 15°C avec une concentration de $[EDC]=5\text{ mM}$, $[NHS]=5\text{mM}$.

2.3. Caractérisation par angle de contact

La figure II-20 présente la goutte d'eau déposée sur la surface du silicium après l'activation NHS/EDC, l'angle de contact augmente à nouveau jusqu'à $70,7^\circ$ attestant de la transformation des acides en ester de succinimidyle, moins polaire.



Figure II-20 : Photographie d'une goutte d'eau ($3\mu\text{L}$) déposée sur la surface de Si après la réaction d'activation.

2.2. Caractérisation par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) en mode ATR (Attenuated Total Reflection)

La figure (II-21) montre les différents spectres infrarouges à transformée de Fourier, en géométrie ATR, correspondant à la surface acide de silicium après greffage photochimique des groupements carboxyliques (figure II-21-a) et à la surface de silicium après activation des terminaisons acides (figure II-21-b).

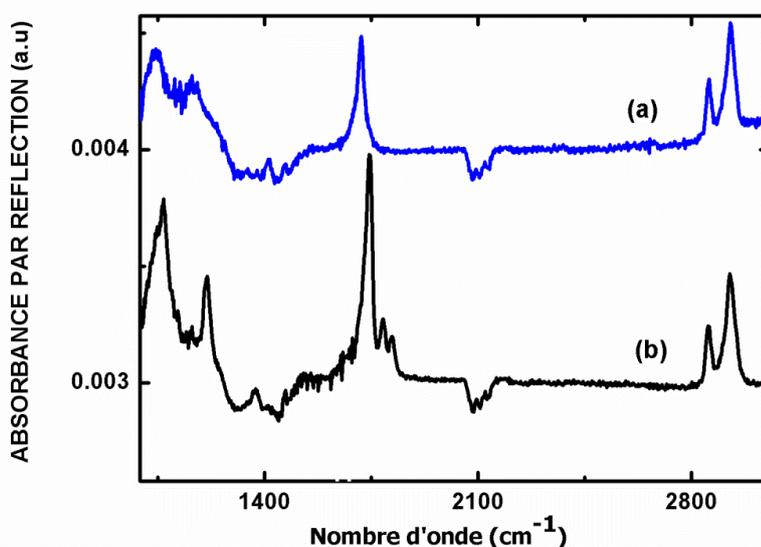


Figure II-21 : Spectres infrarouges d'une surface acide (a) et d'une surface activée (b)

La formation de l'ester de succinimidyle après activation de la surface acide dans EDC/NHS est évidente par l'apparition d'un triplet caractéristique dans la région du spectre qui correspond aux vibrations d'élongation des carbonyles (C=O) (figure II-21-b). La bande la plus intense de ce triplet, vers 1745 cm^{-1} est attribuée au mode antisymétrique des deux carbonyles du cycle NHS, et la bande vers 1785 cm^{-1} est attribuée au mode symétrique correspondant. La bande la moins intense vers 1818 cm^{-1} correspond au mode de vibration d'élongation du carbonyle de l'ester. La forte atténuation de la bande caractéristique de l'acide vers 1710 cm^{-1} (figure II-21-a), montre que la majorité des groupements acides ont été transformés en ester de succinimidyle.

D'autres bandes caractéristiques apparaissent vers les faibles énergies, comprenant les modes de vibration d'élongation antisymétrique et symétrique du groupement C-N-C du cycle NHS vers 1205 et 1371 cm^{-1} et le mode de vibration d'élongation du groupement C-ON vers 1080 cm^{-1} .

3. Activation de la surface de silicium poreux activée (SiP-COOH)

Nous avons utilisé le même protocole précédant pour activer les surfaces de silicium poreux greffés par l'acide undécylénique voire figure II-22.

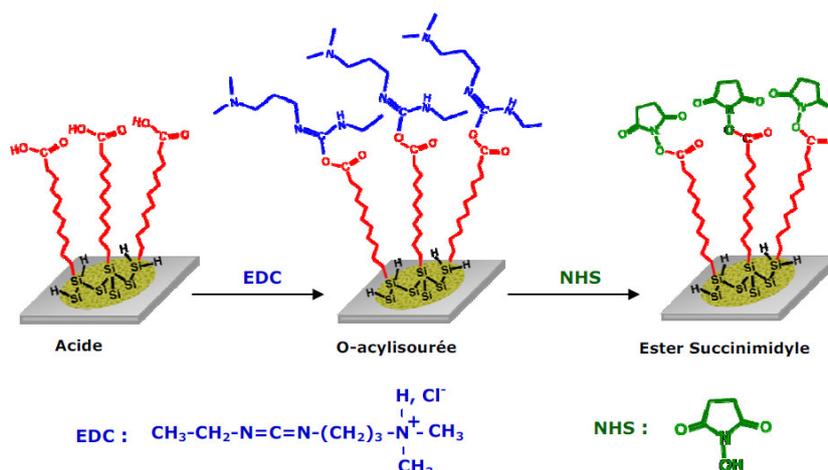


Figure II-22 : Schéma de la réaction d'activation dans EDC/NHS des terminaisons acides à la surface de SiP.

3.1. Caractérisation par angle de contact

L'activation d'une surface de SiP terminée avec des groupements acides par le mélange EDC / NHS a été confirmée par l'augmentation de l'angle de contact (75°), confirmant la transformation des terminaisons d'acide en succinimidylester moins polaire (Figure II-23)

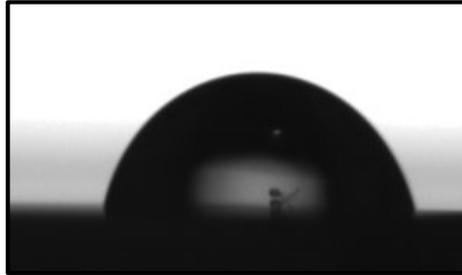


Figure II-23 : Photographie d'une goutte d'eau ($3\mu\text{L}$) déposée sur la surface de SiP après la réaction d'activation.

3.2. Caractérisation FTIR du SiP après activation

Nous constatant dans la figure II-24-c l'apparition de trois pics à 1740 , 1780 et 1820 cm^{-1} significatifs de la présence de groupements NHS sur la surface. La forte atténuation du pic à 1712 cm^{-1} caractéristique de l'acide montre que la plupart des groupements acides initiaux ont été transformés en ester succinimidique.

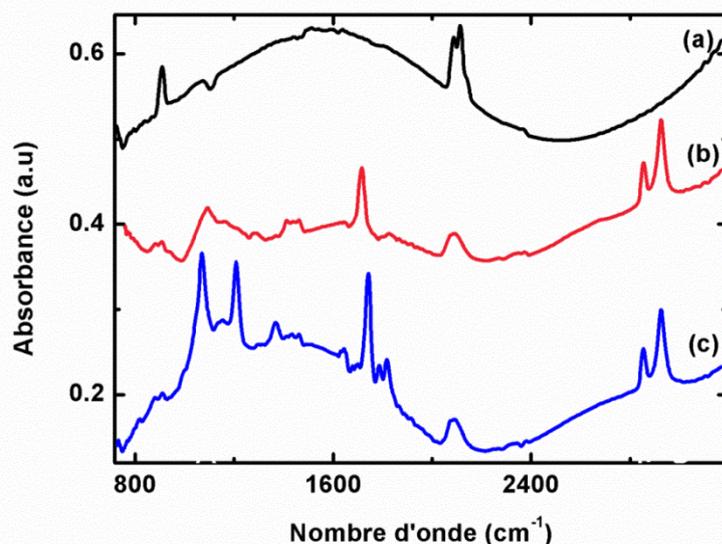


Figure. II.24 : Spectre FTIR d'une surface de silicium poreux a) avant modification. b) après greffage thermique d'acide undécylénique. c) après activation des terminaisons acides.

Partie III : Amidation des surfaces de silicium et silicium poreux modifiées

1. Introduction

La dernière étape de cette série de réactions chimiques consiste à immobiliser des enzymes sur différents supports avec différentes méthodes d'immobilisations.

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui favorisent la transformation des espèces chimiques dans les systèmes vivants. Ces molécules, comprenant des milliers des atomes dans des arrangements précis, sont capables de catalyser la multitude de réactions chimiques qui se produisent dans les cellules biologiques.

Le site actif d'une enzyme est la région qui réunit et met en contact les réactifs – souvent appelés substrats - et facilite ainsi la réaction. On peut distinguer dans le site actif, d'une part le site de fixation qui se combine au substrat par des faibles liaisons et le site catalytique qui agit sur le substrat pour lui faire subir la réaction chimique. Une classification officielle des enzymes a été adoptée en 1961. Elle permet de classer les enzymes en six groupes selon le type de réaction catalysée (oxydoréductases, hydrolases, lyases, isomérases, ligases).³⁸ Leur rôle dans les processus biologiques, dans la santé et la maladie a été largement étudié. Ils ont également été un élément clé dans de nombreuses anciennes activités humaines, en particulier la transformation des aliments, bien avant la connaissance de leur nature ou leur fonction ne soit connue.³⁹⁻⁴⁰ Actuellement un intérêt particulier est accordé aux enzymes pour leur utilisation dans la biotechnologie.

Les enzymes peuvent catalyser des réactions dans différents états : en tant que molécules individuelles en solution, des agrégats avec d'autres entités, et attachées à des surfaces. L'état attachées ou "immobilisé" a un intérêt particulier pour ceux souhaitant exploiter les enzymes à des fins techniques.

L'immobilisation d'une enzyme est un processus très critique impliqué dans la conception de biocapteurs. Certains des avantages d'immobilisation comprennent : l'utilisation répétée dans le temps, faciliter la récupération de l'enzyme, l'augmentation de la stabilité de l'enzyme, la séparation facile du produit et de l'enzyme et beaucoup d'autres. Les enzymes peuvent être immobilisées au support par des interactions allant d'adsorption physique réversible et des liaisons ioniques à des liaisons covalentes stables. Le greffage covalent des enzymes suppose la formation d'une liaison amide entre le support et l'enzyme, En général, cette technique nécessite la fonctionnalisation du support par des molécules

chimiques différentes et variées, appelées linker, afin d'obtenir des groupements fonctionnels, la variété des groupes fonctionnelles est un atout non négligeable (tableau II-1). Cette propriété donne une plus grande palette dans le choix de la méthode la plus adaptée pour immobiliser une enzyme, ce qui explique la variété des voies de greffage chimique actuellement développées. Pendant l'immobilisation ; les enzymes subissent des changements dans les deux propriétés physiques et chimiques. Par conséquent, plusieurs facteurs doivent être pris en considération pour chaque procédé d'immobilisation tel que la diminution de la stabilité de l'enzyme, perte d'activité catalytique qui peut se produire en raison des changements de conformation de l'enzyme, la mauvaise orientation de son site actif et un faible attachement de l'enzyme sur le support solide.

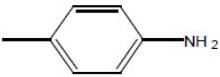
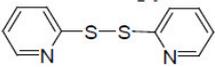
Groupement fonctionnel au niveau du support	Composé bifonctionnel (bras espaseur)	Groupement fonctionnel Au niveau de l'enzyme
-COOH	Carbodiimide ($R_1-N=C=N-R_2$) Chlorure d'acide (PCl_3, Cl_5)	-NH ₂
-OH	Chlorotriazine ($C_3N_3Cl_2$) Halogénures de cyanogène (BrCN, ClCN)	-NH ₂
-NH ₂	Glutaraldéhyde ($OHC-(CH_2)_3-CHO$)	-NH ₂
-NH ₂	Carbodiimide ($R_1-N=C=N-R_2$) Isothiocyanate ($R-N=C=S$)	-COOH
	Isocyanate ($R-N=C=O$) Isothiocyanate ($R-N=C=S$) Sels de diazonium $R-\text{C}_6\text{H}_4-N \equiv N^+, Cl^-$	-tyrosine
-SH	4,4'Dithiodipyridine 	-SH
-SH	3-Maleimidopropionic acid N-hydroxysuccinimide estère	-NH ₂

Tableau II.1. Principaux groupements réactionnels entre le support et l'enzyme.³⁸

La spectroscopie ATR-FTIR est une des méthodes puissantes pour obtenir des informations pertinentes pour la compréhension des interactions de l'enzyme avec des surfaces et la quantification des enzymes immobilisées.

Les bandes caractéristiques trouvées dans les spectres infrarouges de protéines comprennent l'amide I et II, proviennent des liaisons amides qui lient les acides aminés. L'absorption associée à la bande amide I conduit à des vibrations d'élongation de la liaison de l'amide C=O, l'absorption associée à la bande amide II conduit principalement à la vibration de déformation de la liaison N-H (figure II-25).

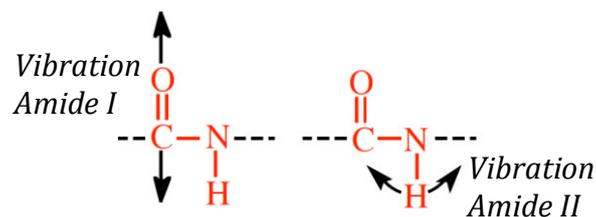


Figure II-25 : Vibrations responsables des bandes d'amide I et d'amide II dans le spectre infrarouge de protéines. La bande amide I est due à vibrations d'élongation de carbonyle tandis que l'amide II est dû principalement à des vibrations de déformation de NH.⁴¹

Dans cette partie, nous examinons en temps réel l'immobilisation de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) sur une surface activée à l'aide de la spectroscopie infrarouge utilisant la géométrie en réflexions internes multiples ATR (ex-situ et in-situ).

La quantification des enzymes immobilisées peut être réalisée en utilisant la spectroscopie FTIR en exploitant les deux bandes de vibrations spécifiques et dominantes (amide I et amide II) associées aux groupes amide. Ensuite, nous décrivons l'immobilisation d'une enzyme sur deux types de surfaces de SiP fonctionnalisé portant soit des terminaisons un groupe carboxyle ou un groupe amine.

2. Immobilisation d'Acétylcholinestérase sur les surfaces Si-COOSuc Activée

2.1. Procédure expérimentale

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'accrochage de l'Acétylcholinestérase sur des surfaces activées.

Une solution enzymatique d'acétylcholinestérase à 3.12 μM a été préparée avec un tampon phosphate PBS 1X ($[\text{NaCl}] = 0.137 \text{ M}$; $[\text{KCl}] = 0.002 \text{ M}$; $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 0.008 \text{ M}$; $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0.002 \text{ M}$) à pH 7. Pour les mesures de FTIR, 30 μl de la solution enzymatique a été déposée sur chaque face d'une surface activée et on laisse réagir toute la nuit. Les surfaces modifiées Si-AChE ont été ensuite lavées successivement dans PBS 1X pendant 2 min, PBS 1X pendant 10 min, PBS 0.2X pendant 5 min, PBS 0.1X 2 min, et enfin avec de l'eau ultra-pure, puis séchées sous un flux d'azote.

2.2. Caractérisation par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode ATR (Attenuated Total Reflection)

La figure II-26 montre les spectres d'une surface acide, activée et amidée. Le spectre de référence est une surface hydrogénée. Après exposition de la surface Si-COOSuc activé à la solution enzymatique AChE, les bandes caractéristiques de l'ester NHS disparaissent et nous observons deux larges et intenses bandes à $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ (amide I) et à $\sim 1530 \text{ cm}^{-1}$ (amide II) qui indiquent clairement la présence des enzymes à la surface (Figure II-26-c). Les bandes d'amide peuvent être attribuées principalement aux liaisons peptidiques de l'enzyme, les bandes de vibration de la liaison d'amide I est affectée aux vibrations d'élongation $\nu\text{C}=\text{O}$, et la bande d'amide II résulte essentiellement de la combinaison de la liaison $\delta\text{N}-\text{H}$ et $\nu\text{C}-\text{N}$ ⁴²⁻⁴⁵. Les faibles bandes dans la région $1200-1405 \text{ cm}^{-1}$ sont assignées à l'amide III (liaison d'élongation $\nu\text{C}-\text{N}$ et la liaison $\nu\text{N}-\text{H}$ proche de 1300 cm^{-1})⁴⁶. Une partie des groupes amides peut aussi se produire à partir de l'attachement covalent des enzymes dues à la réaction de groupes amines latéraux de résidus lysine de l'enzyme avec les groupes ester succinimidyle de la surface activée de silicium. Si la formation de liaison amide peut être anticipée, il est difficile d'identifier l'existence d'une telle liaison covalente, car si elle existe, sa contribution est relativement faible par rapport à l'intensité totale des bandes amides. Quoi qu'il en soit,

l'observation des bandes d'amide lié à une enzyme, après différentes étapes de rinçage indique une immobilisation solide de l'AChE sur les surfaces.

Un épaulement sur le côté droit de la bande amide I est observé, ce qui suggère la présence de groupes acide carboxylique. Ce pic peut être lié soit à des groupes acides carboxyliques appartenant au squelette de l'enzyme ou de groupes COOH résiduels de surface. En effet, l'hydrolyse de COOSuc \rightarrow COOH est prévu comme étant une réaction secondaire possible au cours de l'immobilisation de l'enzyme dans du PBS à pH \sim 7.4. On note aussi que les bandes de vibration des CH₂ sont nettement plus intenses et qu'un épaulement apparaît à 2960 cm⁻¹, caractéristique de la vibration des liaisons CH₃. La disparition complète des bandes caractéristiques de l'ester succinimidyle nous montre que la réaction d'amidation est totale. Les nombres d'ondes et les affectations des différents pics sont résumés dans le tableau II-2.

position [cm⁻¹]	Mode	Description
2925	v _{as} (CH ₂)	méthylène asymétrique élongation
2855	v _s (CH ₂)	méthylène symétrique élongation
2130	v(SiH ₃)	silicium trihydride élongation
2105	v(SiH ₂)	silicium dihydride élongation
2080	v(SiH)	silicium monohydride élongation
1820	v(C=O)	NHS-ester carbonyle élongation
1785	v _s (C=O)	NHS-cycle C=O symétrique élongation
1745	v _{as} (C=O)	NHS-cycle C=O asymétrique élongation
1715	v(C=O)	carboxylique acide C=O élongation
1655	v(C=O)	peptide C=O élongation (amide I)
1530	v(N-H)	peptide liaison N-H (amide II)
1465	δ(CH ₂)	méthylène scissor déformation
1415	δ(C-O-H)	acide C-O-H dans la déformation plane
1370	v _{as} (C-N-C)	NHS-cycle asymétrique CNC élongation
1280	v(C-OH)	acide C-OH élongation
1210	v _s (C-N-C)	NHS-cycle symétrique CNC élongation

Tableau II-2. Affectations des différents pics dans les spectres ATR-FTIR

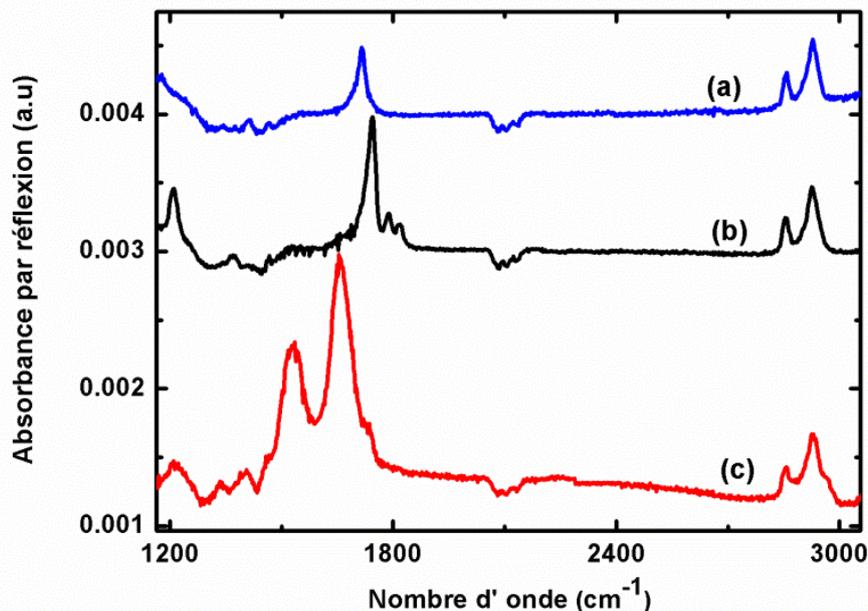


Figure II-26 : Spectres infrarouges d'une surface acide (a), activée (b) et amidée avec AChE 3.12 μM dans le PBS IX (c) en polarisation p. Le spectre de référence est une surface SiHx

La figure II-27-a montre la gamme spectrale étroite correspondant à la région des bandes amide. Les spectres ont été enregistrés sur les surfaces activées Si-COOSuc exposées toute la nuit à des solutions enzymatiques avec différentes concentrations d'AChE 0.1 à 8.16 μM . On observe une augmentation de l'intensité des bandes amides I et II quand la concentration de l'enzyme en solution augmente, ce qui indique l'immobilisation de plus en plus d'enzymes sur la surface. L'évolution de la concentration en surface en fonction de la concentration en solution AChE est représentée sur la figure II-27-b.

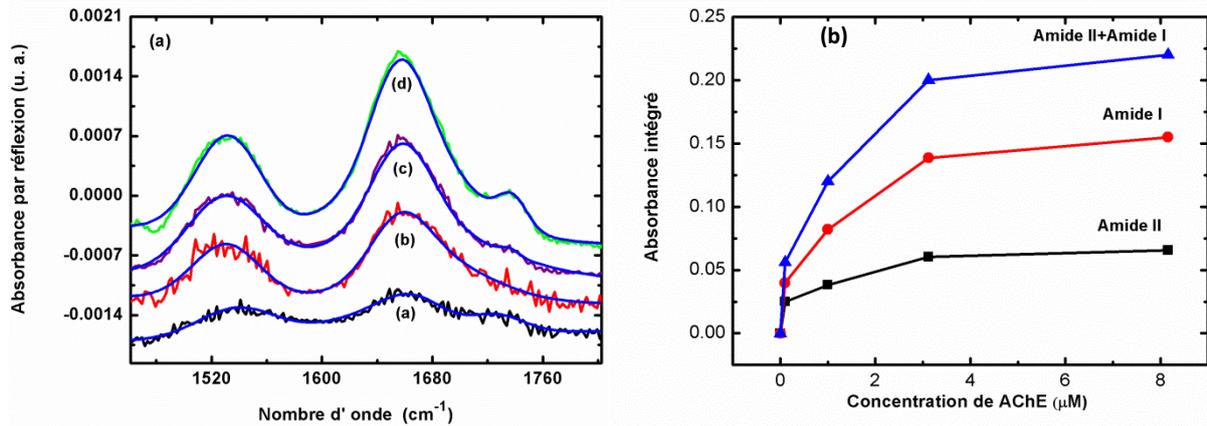


Figure II-27 : (a) Spectres FTIR expérimentaux et les intégrales résultants des courbes (bleu) de bandes amides I et II. Les spectres ont été enregistrés après l'exposition dans des solutions enzymatiques d'AChE à différentes concentrations : (a) 0.1, (b) 1, (c) 3.12, and (d) 8.16 μM. (b) L'absorbance IR intégrée des groupes amides, en fonction de la concentration enzymatique dans la solution d'amidation.

La concentration de surface C_{AChE} a été évaluée à partir de l'absorbance intégrée de la bande amide I, le spectre est mesuré en polarisation s et p en utilisant une section calibrée de la bande l'amide I déterminé à partir de mesures d'absorbance de la sérumalbumine bovine (BSA) en solution⁴⁷ (Figure II-28). La quantité d'enzymes à la surface augmente progressivement et tend à se stabiliser à une valeur de seuil indiquant la saturation de la surface. À la saturation, $C_{AChE} = 1,4 \times 10^{12} / \text{cm}^2$, ce qui est proche de la densité maximale attendue d'enzymes acétylcholinestérase [(0,7 à 1,6) $\times 10^{12} / \text{cm}^2$] calculée à partir de leurs structures tétramériques (taille de ~13 nm x 10 nm x 7 nm, comme indiqué dans la Protein Databank).⁴⁸

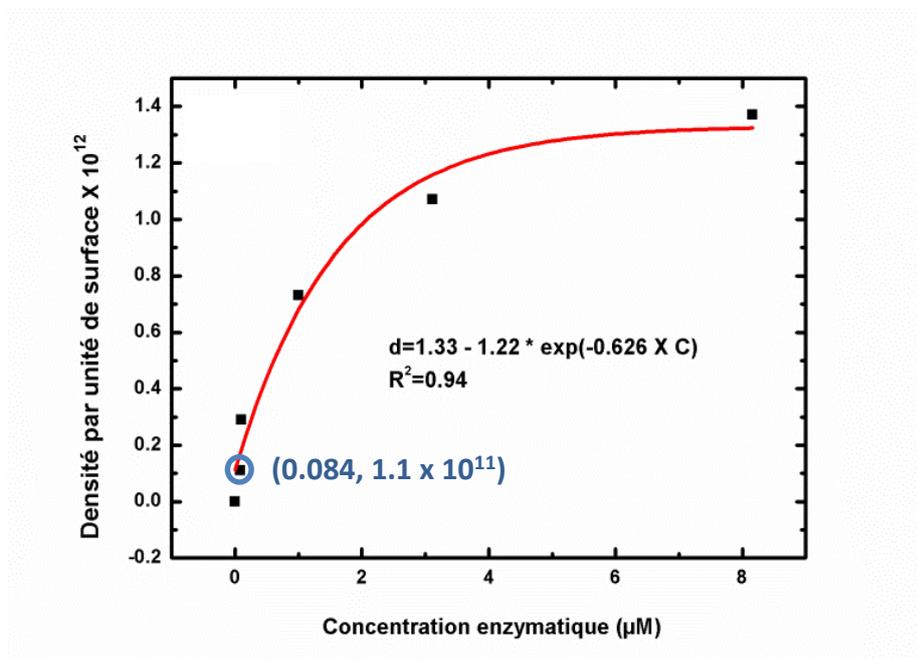


Figure II-28 : Concentration de surface de l'AChE en fonction de la concentration enzymatique en solution.

Ce résultat suggère la formation d'une couche d'enzyme dense. Il est à noter que le taux de couverture obtenu à saturation concorde avec celui obtenu dans le cas où l'AChE est immobilisée sur des terminaisons succinimidyles auto-assemblées sur l'Or (Au)⁴⁹ ou des nanoparticules de CdS.⁵⁰

2.3. Caractérisation par microscopie à force atomique

La figure II-29 montre les images AFM d'une surface Si-COOSuc activée avant (figure II-29-a) et après une nuit d'exposition en solution de 8.12 µM AChE (figure II -29-b, c). Avant l'immobilisation de l'enzyme (figure II-29-a), on note que la structure en marches d'escalier est comparable à celle d'une surface hydrogénée. Après l'exposition dans la solution enzymatique, un changement important dans la topographie de surface est observé (figure II -29-b, c). La structure en marches d'escalier est plus visible, ce qui indique la formation d'une couche homogène et dense couvrant les terrasses. Pas de physisorption significative est observée après exposition à des solutions de PBS (sans enzyme), ce qui signifie que le changement de la topographie peut être attribuée à l'immobilisation d'enzyme. La couverture homogène observée sur les images AFM et le masquage de la structure de l'escalier sont en bon accord avec les mesures FTIR figure (II-28) ce qui indique qu'il y'a une saturation de la surface pour les concentrations enzymatiques plus 3 µM.

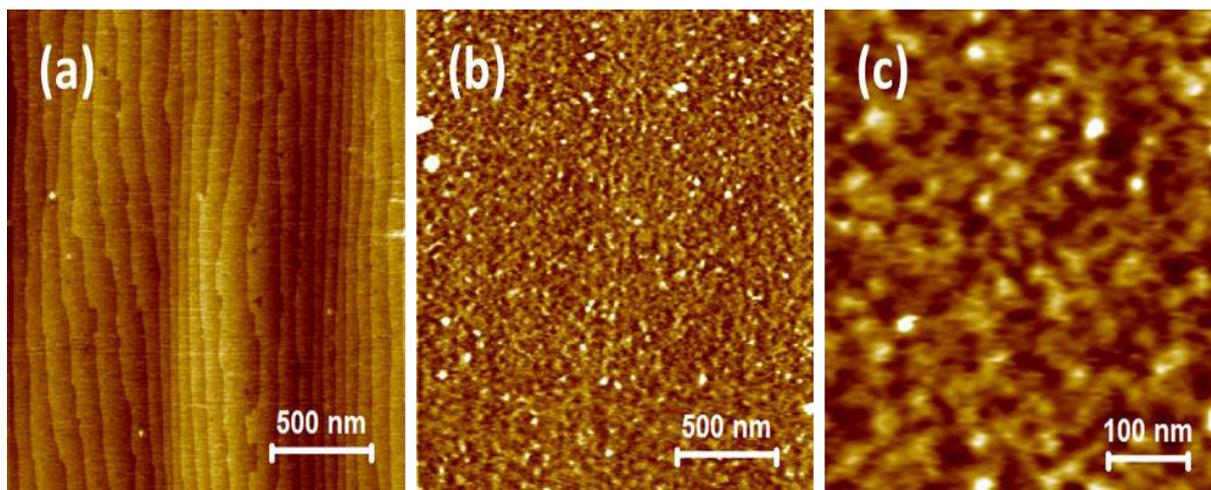


Figure II-29 : Images AFM d'une surface Si-COOSuc avant (a) et après l'exposition à la solution enzymatique AChE 8.16 μM (b, c). Avant l'immobilisation d'enzymes (a), la surface présente une structure en escalier avec des terrasses Si (111) atomiquement lisses séparées par des marches atomiques 3.1\AA . Après exposition à la solution AChE, les terrasses planes ne sont plus visibles, indiquant la présence d'une couche homogène de l'enzyme sur la surface. Les rugosités telles que mesurées sur l'image (c) sont de 0,55 nm (RMS) et 4,75 nm (pic à la vallée).

2.4. Cinétique de l'immobilisation d'enzymes.

La cinétique de l'immobilisation d'enzymes a été étudiée par des mesures in situ ATR-FTIR. A cet effet, les surfaces de silicium activées (Si-COOSuc) fraîchement préparées ont été exposées à une solution enzymatique AChE circulant en utilisant une cellule infrarouge décrite sur la figure II-30. Ces mesures ont été effectuées à des concentrations de 1 ou 2 μM et analysées quantitativement dans la région comprise entre 1450 et 1900 cm^{-1} .

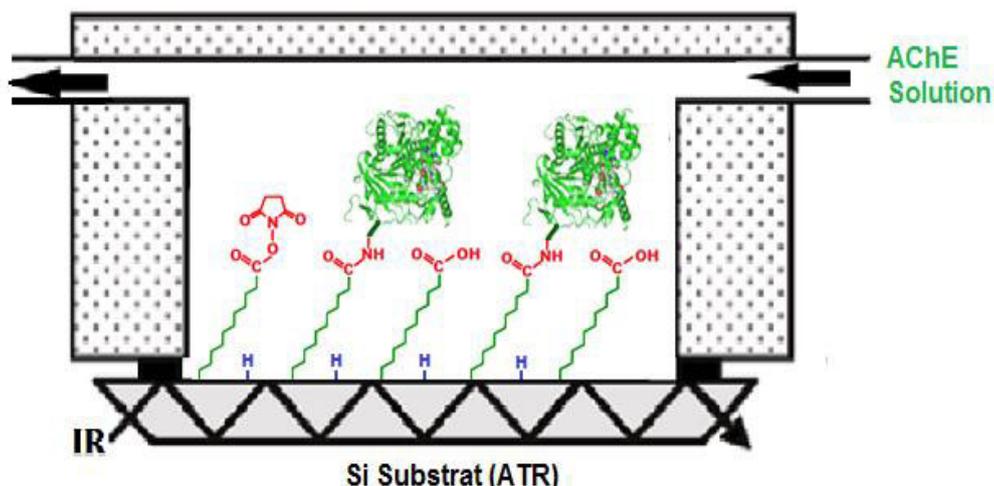


Figure II-30 : Schéma de la cellule utilisée pour les mesures infrarouges in-situ.

La figure II-31 montre une succession de spectres mesurés à différents stades lors d'une amidation à une concentration enzymatique $2\mu\text{M}$, le spectre de référence a été enregistré immédiatement après exposition de la surface Si-COOSuc à la solution, et donc les variations de l'absorbance au cours du temps représentés sur la figure II-31-a peuvent être directement liées aux enzymes immobilisées sur la surface (et non aux enzymes en solution). Dans cette région, l'évolution des spectres est complexe. Dès les premières minutes, on observe la disparition progressive des pics liés à l'ester succinimidyle (bandes négatives au 1745 , 1785 et 1820 cm^{-1}), et l'apparition de deux bandes amide à 1650 et 1530 cm^{-1} . Au fil du temps la quantité d'enzymes immobilisées sur la surface augmente. D'autre part, il n'y a pas apparition du pic à 1715 cm^{-1} en rapport avec les groupes acides indiquant qu'il n'y a pas d'hydrolyse de fonctions succinimidyle esters.

Afin de mieux comprendre la cinétique complexe de la réaction, l'absorbance intégrée de chaque bande a été déterminée par le fittage des spectres en utilisant cinq fonctions de Voigt pour les 5 pics (3 pics de l'ester NHS ; les deux pics d'amides). Pour permettre l'analyse, l'ajustement inclut également une ligne de base. Une telle analyse nous permet de suivre quantitativement l'évolution des différents pics

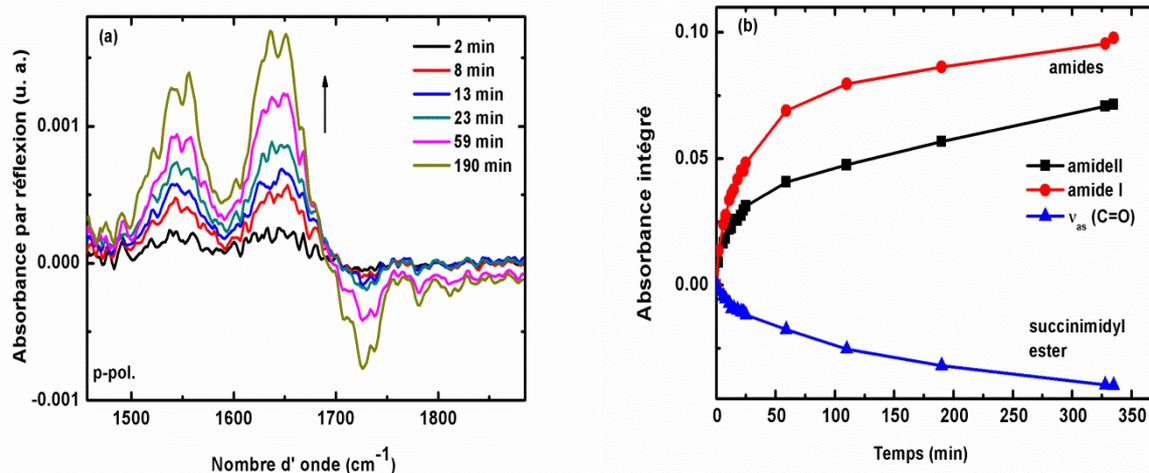


Figure II-31 : (a) Evolution temporelle de spectres FTIR d'une surface Si- COOSuc activée en contact avec une solution 2 μM AChE. Les différents spectres ont été enregistrés après différents temps d'exposition (2-190 min). Le spectre de référence a été enregistré juste après l'introduction de la solution dans la cellule. (b) des variations de la concentration d'enzyme sur la surface en fonction du temps.

L'évolution temporelle de l'intensité de l'amide I, l'amide II, et la bande principale d'ester de succinimidyle (à 1745 cm^{-1}) est représentée sur la figure II -31-b. Comme prévu, la perte d'ester est en corrélation avec la formation simultanée de bandes amide I et II. L'évolution ne semble pas obéir à un seul profil-exponentielle, ce qui est le cas pour les simples cinétiques de premier ordre comme il a été trouvé pour l'amidation avec hexylamine.⁵¹ La courbe de la bande ester de succinimidyle de la figure II-31-b a été ajustée à une combinaison linéaire de deux fonctions exponentielles à l'aide de l'expression ci-dessous comme représenté sur la Figure II-32 :

$$I = I_0 \left(1 - A_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - A_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \right) \text{ avec } A_1 + A_2 = 1 \quad \text{Equation 1}$$

où t est le temps de réaction après l'injection de la solution AChE et A_1 et A_2 sont liés à deux contributions de processus. La première exponentielle est dominante dans la première partie de la courbe, avec $\tau_1 = 10$ min ; la seconde constante de temps ($\tau_2 = 218$ min) représente surtout la lente évolution à longtemps. Nous avons également étudié la variation des temps caractéristiques lors d'un changement de la concentration de solution enzymatique

(Figure II-32). Nous avons constaté que le temps caractéristique τ_2 est augmenté par un facteur de 1,5 lorsque la concentration enzymatique est diminuée par un facteur de 2.

Ce comportement rappelle la dépendance de la constante de vitesse de la réaction d'amidation de l'hexylamine sur la surface activée, ce comportement est expliqué par les interactions électrostatiques entre les molécules adsorbées avant l'immobilisation. En outre, il a été vérifié que l'amidation ne pouvait être totale, même si on laisse la réaction se dérouler pendant 24 h. La réaction incomplète est probablement due à l'effet stérique entre ces grandes enzymes. Comme on l'a constaté à partir de la quantification IR, AChE couvre une grande surface quand elle est immobilisée sur une surface fonctionnalisée.

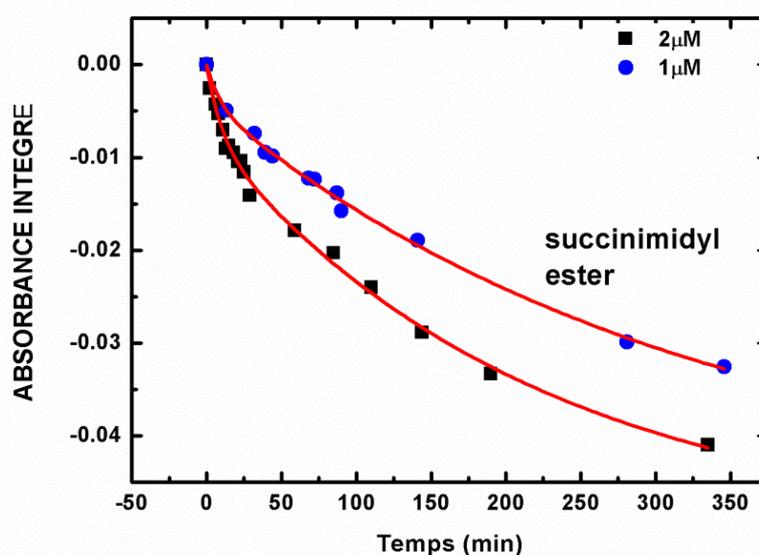


Figure II-32 : Intégrale de la bande d'ester en fonction du temps pour différentes concentrations de l'AChE. La ligne rouge est le meilleur ajustement des données expérimentales en utilisant une loi bi-exponentielle donnée comme ci-dessous.

3. Immobilisation d'Acétylcholinestérase sur la surface de silicium poreux activée

3.1. Procédure expérimentale

Cette partie consiste à immobiliser l'AChE via une réaction d'amidation entre les terminaisons acides activées (l'ester de succinimidyle) et le groupement amine primaire contenu dans l'enzyme.

La solution de l'AChE a été préparée dans une solution tampon de PBS 1X (phosphate buffer solution) à un pH = 7. L'immobilisation de l'AChE a été réalisée par la déposition d'une goutte de 50 μ l de la solution enzymatique à une concentration de 8.12 μ M sur une surface de SiP activée, pendant une nuit à température ambiante. L'électrode à enzyme immobilisée est ensuite rincée plusieurs fois avec le PBS et stockée à une température de 4°C entre les utilisations. La figure II-33 résume les différentes étapes de fonctionnalisation du silicium poreux pour l'immobilisation de l'AChE.

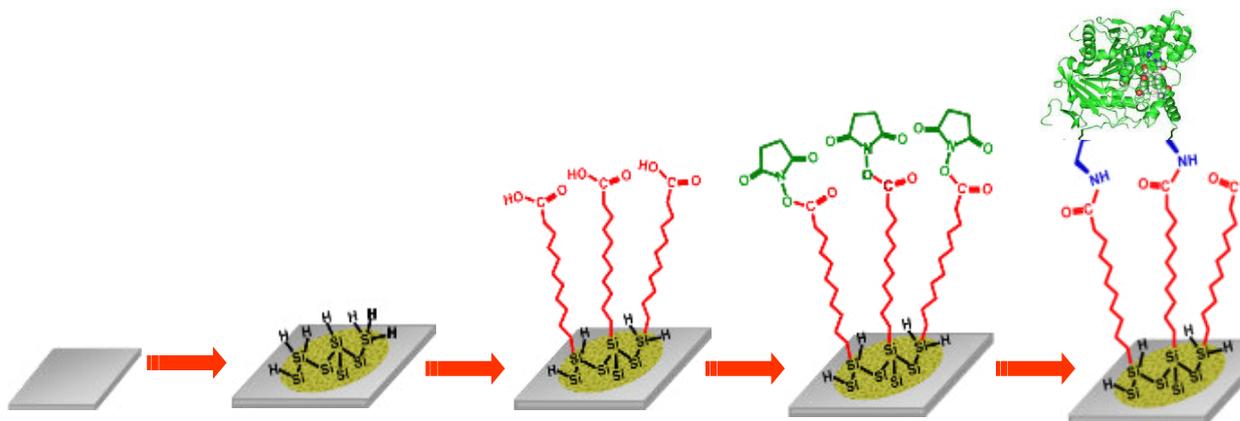


Figure II-33 : Différentes étapes de fonctionnalisation du silicium poreux pour l'immobilisation de l'AChE

3.2. Caractérisation par mesure de l'angle de contact des surfaces immobilisées avec Acétylcholinestérase

L'accrochage de l'enzyme qui contient une multitude de fonctions polaires, est évident par la faible valeur de l'angle de contact enregistrée (42°) figure II-34

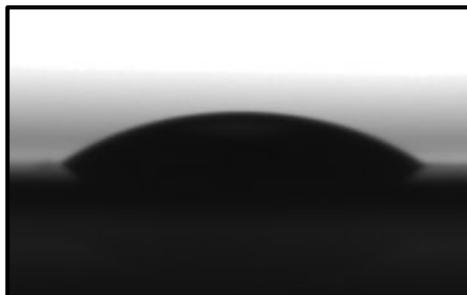


Figure. II. 34. Photographie d'une goutte d'eau (3 μ L) déposée sur la surface du SiP immobilisée par l'enzyme.

3.3. Caractérisation par FTIR des surfaces immobilisées avec AChE

La figure (II-35) montre les spectres FTIR pour les différentes étapes de l'immobilisation de l'AChE.

Après la réaction d'amidation de l'AChE avec la surface du SiP activée, le spectre FTIR correspondant (Figure II-35-d), montre la disparition du triplet caractéristique de l'ester de succinimidyle et l'apparition de deux bandes vers 1665 cm^{-1} et 1550 cm^{-1} . Ces bandes appelées respectivement amide I et amide II sont caractéristiques de la fonction amide. Elles correspondent aux modes de vibration d'élongation de la liaison C=O et de déformation de la liaison N-H respectivement.

La position de ces bandes est pratiquement la même que celle rapportée par Ute GORNETSCHELNOKO et al⁵² pour l'AChE non immobilisée dans l'eau (1655 cm^{-1} et 1548 cm^{-1}). Cette similitude suggère que l'AChE conserve les caractéristiques essentielles de sa structure près son immobilisation sur le SiP fonctionnalisé.

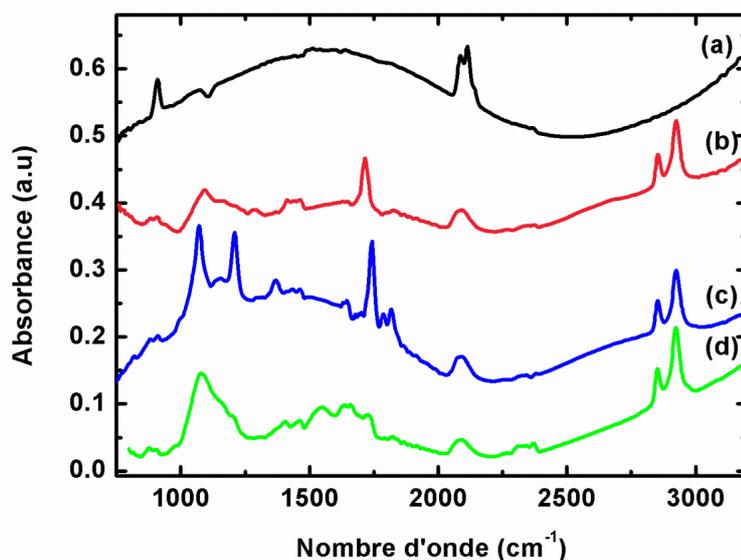


Figure. II. 35. Spectre FTIR d'une surface de silicium poreux a) avant modification. b) après greffage thermique d'acide undécylénique. c) après activation des terminaisons acides. d) après immobilisation de l'AChE.

4. Immobilisation d'Acétylcholinestérase sur la surface de silicium poreux silanisé par APTES

4.1. Procédure expérimentale

Après le greffage de l'APTES, la surface de l'électrode est recouverte par des terminaisons NH_2 , l'immobilisation de l'AChE est basée sur une réaction d'aminolyse entre les groupes NH_2 de la surface modifier et les résidus de groupes acides carboxylique sur l'AChE en présence d'un mélange de EDC / NHS.

La surface SiP- NH_2 a été introduite dans un mélange de solution de $0.08 \mu\text{M}$ AChE, 5mM EDC et 5mM NHS dans du PBS et on laisse réagir pendant toute la nuit. La surface résultante est abondamment rincée à l'eau désionisée et séchée sous un flux d'azote. L'interface a été stockée à 4°C avant utilisation.

4.2. Caractérisation par mesure de l'angle de contact des surfaces immobilisées avec AChE

Le couplage de l'enzyme acétylcholinestérase et SiP-NH₂ a conduit à une surface avec un angle de contact de 58 ° (Figure II- 36). Cette valeur est supérieure à la valeur obtenue après l'immobilisation de l'AChE sur SiP-COOH (42°), bien que l'on peut espérer obtenir au moins le même angle ou une valeur inférieure, puisque la surface est oxydée et les chaînes organiques greffées sont plus courtes.

Il est probable que l'AChE adopte différentes orientations lors de l'immobilisation sur des surfaces hydrophobes ou hydrophiles. Selon les rapports sur la microstructure de l'acétylcholinestérase par Kabachnik et al.⁵³ et Sussman et al.⁵⁴, les groupes hydrophobes de l'AChE sont principalement répartis autour de son site actif faisant l'hydrophobie de l'AChE dans le centre actif plus forte que sur les autres parties de l'enzyme. Par conséquent, sur une surface relativement hydrophobe comme SiP COOSuc (angle de 75° de contact), AChE doit être initialement adsorbé par interaction hydrophobe, donc les enzymes immobilisées sont orientées avec leur site actif vers la surface et en laissant les parties les plus hydrophiles vers l'extérieur ce qui est cohérent avec l'angle de contact obtenu 42 ° (Figure II-34). Bien que, l'immobilisation de l'AChE sur surface SiP-NH₂ se produit par interaction hydrophile, par conséquent, les parties les plus hydrophobes sont orientées sur la partie supérieure comme résultat ; la surface est plus hydrophobe avec un angle de contact de 58 ° (Figure II-36).

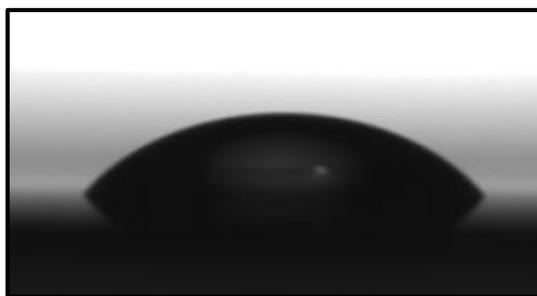


Figure. II. 36. Photographie d'une goutte d'eau (3µL) déposée sur la surface du SiP immobilisée par l'enzyme.

4.3. Caractérisation par FTIR des surfaces immobilisées avec AChE

Après la réaction d'amidation de l'AChE avec la surface SiP-NH₂ en présence de NHS / EDC, les bandes caractéristiques d'amide paraissent à 1640 (amide I) et 1540 cm⁻¹ (amide II) (Figure II.37), ce qui confirme l'immobilisation de l'enzyme AChE sur la surface de SiP modifié.

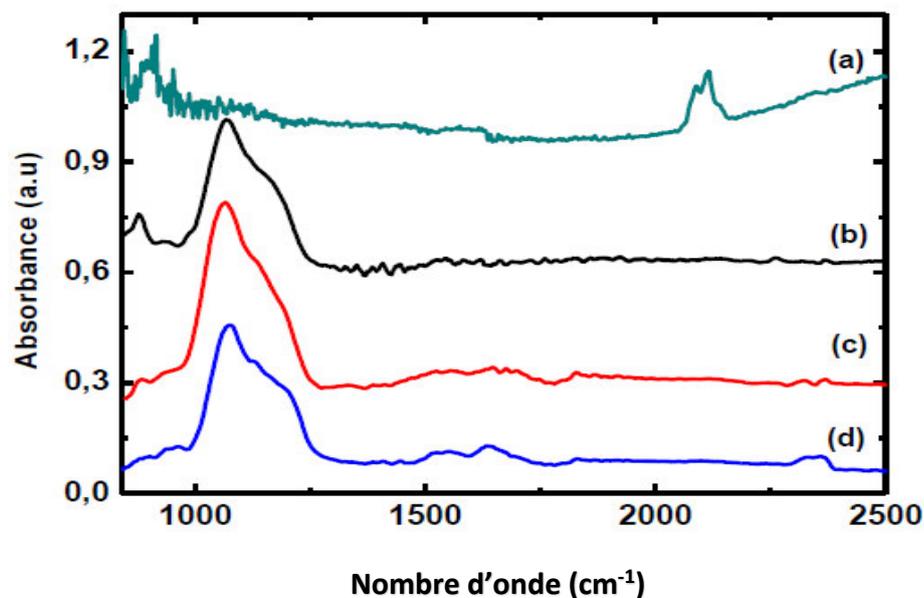


Figure II.37: Spectres IR par transmission de SiP modifiées de : (a) la surface hydrogénée après anodisation électrochimique, (b) Après traitement dans une solution Piranha, (c) Après silanisation avec APTES, (d) Après l'exposition de la surface SiP-NH₂ en solution AChE + EDC / NHS.

Références

1. **Linford M. R., Fenter P., Eisenberger P. M., Chidsey C. E. D.**, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, p.3145.
2. **Buriak J. M., Stewart M. P., Geders T. W., Allen M. J., Choi H. C., Smith J., Raftery D., Canham L. T.**, J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, p. 11491.
3. **Sieval B., Demirel A. L., Nissink J. W. M., Linford M. R., van der Maas J. H., de Jeu W. H., Zuilhof H., Sudhölter E. J. R.**, Langmuir, 1998, 14, p. 1759.
4. **Boukherroub R., Morin S., Bensebaa F., Wayner D. D. M.**, Langmuir 1999, 15, p. 3831.
5. **Bateman J. E., Eagling R. D., Worrall D. R., Horrocks B. R., Houlton, Angew A.** Chem., Int. Ed. 1998, 37, P. 2683.
6. **Cicero R. L., Linford M. R., Chidsey C. E. D.** Langmuir 2000, 16, p. 5688.
7. **Pasternack R., Rivillon Amy S., Chabal Y.** Langmuir 2008, 24, p. 12963.
8. **Voicu, R.; Boukherroub, R.; Bartzoka, V.; Ward, T.; Wojtyk, J. T. C.; Wayner, D. D. M.** Langmuir 2004, 20, p.11713.
9. **Strother T.; Cai W.; Zhao X.; Hamers R. J.; Smith L. M.** J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, p. 1205.
10. **Liao, W.; Wei, F.; Qian, M. X.; Zhao, X. S.** Sens. Actuators B 2004, 101, p. 361.
11. **Yamanoi, Y.; Yonezawa, T.; Shirahata, N.; Nishihara, H.** Langmuir 2004, 20, p. 1054.
12. **Patel, N.; Davies, M. C.; Hartshorne, M.; Heaton, R. J.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.; Williams, P. M.** Langmuir 1997, 13, p.6485.
13. **Ligang, H.; Xu, S.; Pan, C.; Zou, H.; Jiang, G.** Mass Spectrom 2007, 21, p. 1277.
14. **Guo D.-J.; Xiao S.-J.; Xia B.; Wei S.; Pei J.; Pan Y.; You X.-Z.; Gu Z.-Z.; Lu Z. J.** Phys. Chem. B. 2005, 109, p. 20620.
15. **Eagling R. D.; Bateman J. E.; Goodwin N. J.; Henderson W.; Horrocks B. R.; Houlton A.** J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1998, p.1273.
16. **He, J.; Patitsas, S. N.; Preston, K. F.; Wolkow, R. A.; Wayner, D. D. M.** Chem. Phys. Lett. 1998, 286, p. 508.
17. **De Smet, L. C. P. M.; Pukin, A. V.; Sun, Q.-Y.; Eves, B. J.; Lopinski, G. P.; Visser, G. M.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R.** Appl. Surf. Sci. 2005, 252, p. 24-30.

18. **Louis C. P. M. de Smet**, Covalently Bound Organic Monolayers on Silicon Surfaces, Visible Light Attachment, Characterization, and Electrical Properties. Thèse doctorat, 2006, Université de Wageningen, Les Pays-Bas.
19. **K. A. Kilian, T. Boö cking, K. Gaus and J. J. Gooding**, ACS Nano, 2007, 1, p. 355–361
20. **K. A. Kilian, T. Boö cking, K. Gaus, J. King-lacroix, M. Gal and J. J. Gooding**, Chem. Commun., 2007, p. 1936.
21. **K. A. Kilian, T. Boö cking, K. Gaus, M. Gal and J. J. Gooding**, Biomaterials, 2007, 28, p. 3055.
22. **E. J. Lee, T. W. Bitner, J. S. Ha, M. J. Shane and M. J. Sailor**, J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, p. 5375.
23. **J. M. Buriak and M. J. Allen**, J. Lumin., 1999, 80, p. 29.
24. **J. M. Holland, M. P. Stewart, M. J. Allen and J. M. Buriak**, J. Solid State Chem., 1999, 147, p. 251.
25. **Linford, M. R.; Chidsey, C. E. D.** J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, p. 12631.
26. **Sieval, A. B.; Vleeming, V.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R.** Langmuir 1999, 15, p. 8288.
27. **Sun, Q.-Y., et al.**, Angewandte Chemie International Edition, 2004, 43, p. 1352.
28. **M. P. Stewart, J. M. Buriak.** J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, p. 7821.
29. **Larbi TOUAHIR**, Nouvelles architectures de biopuces à base de silicium amorphe, thèse doctorat, école polytechnique Palaiseau Paris, 2010.
30. **Faucheux, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.** Langmuir 2006, 22, 153.
31. **Guttenberg, Z.; Rathgeber, A.; Keller, S.; Radler, J. O.; Wixforth, A.; Kostur, M.; Schindler, M.; Talkner, P.** Physical Review E 2004, 70.
32. **Peterson, A. W.; Wolf, L. K.; Georgiadis, R. M.** Journal of the American Chemical Society 2002, 124, p.14601.
33. **L.T. Zhuravlev**, Langmuir, 1987, 3, p. 316.
34. **Be. Mahmoudi, N. Gabouze, L. Guerbous, M. Haddadi and K. Beldjilali, J.** Lumin. 2007,127, p. 534.
35. **L. Touahir, J.-N. Chazalviel, S. Sam, A. Moraillon, C. Henry de Villeneuve, P. Allongue, F. Ozanam, and A. C. Gouget-Laemmel**, J. Phys. Chem.C, 2011,9.

36. **Sam, S.; Touahir, L.; Salvador Andresa, J.; Allongue, P.; Chazalviel, J. N.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Gabouze, N.; Djebbar, S.** *Langmuir* 2009, 26, (2), p. 809.
37. **Jie YANG**, Etude des interactions multivalentes carbohydre/protéine sur des biocapteurs de silicium, thèse doctorat, école polytechnique Palaiseau Paris, 2014.
38. **Mahsa Ghasemi**, Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma, de l'université Pierre et marie curie (paris) 2007.
39. **Stryer, L.** *Biochemistry*, Freeman, New York. 1995
40. **Beatriz M. Brena and Francisco Batista-Viera**, Immobilization of Enzymes, Humana Press Inc., 1998.
41. **Warren Gallagher**, FTIR Analysis of Protein Structure,
42. **Frey, B. L.; Corn, R. M.** *Analytical Chemistry* 1996, 68, p.3187.
43. **Kong, J.; Yu, S.** *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2007, 39, p. 549.
44. **Xiao, S.-J.; Brunner, S.; Wieland, M. J.** *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, p. 16508.
45. **Gorne-Tschelnokow, U.; Naumann, D.; Weise, C.; Hucho, F.** *Eur. J. Biochem.* 1993, 213, p. 1235.
46. **Patel, N.; Davies, M. C.; Hartshorne, M.; Heaton, R. J.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.; Williams, P. M.** *Langmuir* 1997, 13, p. 6485.
47. **Yang, J.; Chazalviel, J. N.; Siriwardena, A.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Szunerits, S.; Gouget-Laemmel, A. C.** *Anal. Chem.* 2014, 86, p. 10340.
48. **Harel, M.; Sussman, J. L.** Native Monoclinic Form of Torpedo Acetylcholinesterase [online], Jun 24, 2008, Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2j3d> (accessed March 3, 2015).
49. **Milkani, E.; Lambert, C. R.; McGimpsey, W. G.** *Anal. Biochem.* 2011, 408, p. 212.
50. **Pardo-Yissar, V.; Katz, E.; Wasserman, J.; Willner, I.** *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, p. 622.
51. **Moraillon, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N.** *J. Phys. Chem. C* 2008, 112, p. 7158.
52. **Ute GORNE-TSCHELNOKOW, Dieter NAUMANN, Christoph WEIS , Ferdinand HUCHO**, *Eur. J. Biochem.* 1993, 213, p. 1235.

53. **M. I. Kabachnik, A.P. Brestkin, N. N. Godovikov, M. J. Michelson, E.V. Rozengart, T. V. Rozengart**, Pharmacol. Rev.1970, 22, p. 355.
54. **J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C.Oefner, A. Godman, L. Toker, I. Silman**, science 1991, 253, p. 872.

Chapitre 3

ETUDE DE L'ACTIVITE
ENZYMATIQUE D'ACHE
IMMOBILISEE SUR SILICIUM
/ SILICIUM POREUX PAR
UV-VIS

1. Introduction

L'importance de l'acétylcholinestérase (AChE) dans la transmission de l'influx nerveux et les conséquences de son inactivation, principalement avec certains gaz neurotoxiques, les pesticides et les métaux lourds sont bien connus.¹ Ces dernières années, les biocapteurs basés sur le principe de l'inhibition de l'AChE ont été largement rapportés pour une gamme d'inhibiteurs, tels que des pesticides, des médicaments et des neurotoxines.²⁻⁶ Le défi majeur pour le développement de biocapteurs stables et sensibles pour évaluer le mécanisme de l'inhibition chimique de l'AChE provient de l'immobilisation efficace de l'AChE sur la surface d'électrode solide. Jusqu'à présent, une variété d'approches pour évaluer l'activité de l'AChE et d'identifier les mécanismes d'inhibition ont été décrits.^{1,6,7} La spectrophotométrie UV-Vis est l'un des outils les plus largement utilisés pour étudier l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase en utilisant le réactif d'Ellman^{6,8}.

Dans ce chapitre nous avons déterminé l'activité enzymatique de l'AChE avec un dosage standard photométrique décrite par Ellman⁹, sur la base de l'évaluation de l'absorbance à 412 nm d'un produit jaune (acide 2-nitro-5-thiobenzoïque) résultant de l'hydrolyse d'acetylthiocholine (ATCl) par AChE.

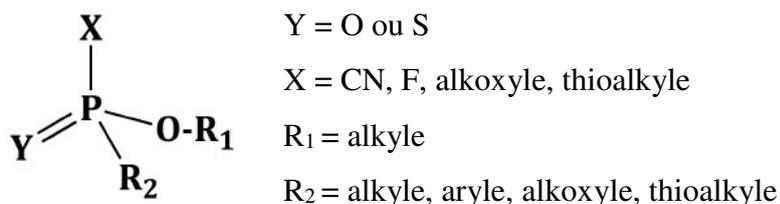
2. Organophosphorés

Parmi les pesticides, les composés organophosphorés (OP) sont les plus utilisés et les plus variés sur le marché actuellement. Ces produits font partie de la seconde génération d'insecticides, ils ont été développés à partir d'armes chimiques utilisées durant la Seconde Guerre Mondiale¹⁰. Néanmoins, l'emploi excessif de ces pesticides a augmenté rapidement durant les années 70, à la suite de l'interdiction des pesticides organochlorés en raison de la persistance à long terme de ces composés dans l'environnement.¹¹ Les pesticides organophosphorés agissent sur le système nerveux. Ils partagent tous le même mécanisme d'action principal qui consiste à bloquer la dégradation d'une substance, l'acétylcholine, au niveau des connections nerveuses. Ceci entraîne une accumulation de cette substance provoquant d'abord un effet stimulant, puis un effet inhibiteur sur la transmission de l'information par les cellules nerveuses.

Les OP utilisés comme insecticides sont responsables d'une mortalité élevée par intoxication. Les effets aigus des organophosphorés lors de surdosages, intentionnels ou non, ou lors d'expositions massives sont bien connus et consistent en un dysfonctionnement du

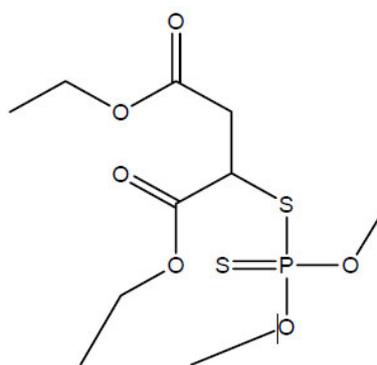
système nerveux. Les symptômes peuvent inclure la nausée, des vomissements, une faiblesse, une paralysie, une hypersalivation, un ralentissement du rythme cardiaque et des convulsions. L'empoisonnement peut être mortel par asphyxie due à la faiblesse des muscles respiratoires. L'intoxication chronique conduit à des atteintes neurologiques. Les pesticides organophosphorés peuvent entraîner une dégénérescence des nerfs périphériques. Des expositions chroniques à faibles doses ont été associées à des effets du comportement. La plupart des pesticides organophosphorés n'ont pas d'effets cancérogènes, seul le dichlorvos est classé cancérogène possible (2B) par le Centre international de recherche sur le cancer¹².

Les composés organophosphorés (OP) sont constitués d'un atome de phosphore pentavalent lié à quatre substituants : un atome d'oxygène ou de soufre via une double liaison, un groupe partant (X), un groupement alkoyle (O-R₁) et un autre groupement (R₂) selon la structure générale suivante¹³ :



2.1. Données générales relatives au Malathion

Le malathion (Figure III-1) est un pesticide organophosphoré largement utilisé dans le monde, il est employé comme insecticide en agriculture et en usage vétérinaire¹⁴, et appliqué pour l'extermination des poux chez l'homme.¹⁵ En tant qu'insecticide, le malathion est utilisé pour contrôler les pucerons, les mouches, les sauterelles, les poux, les fourmis, les araignées et les moustiques. Il est appliqué sur la luzerne, le trèfle, les pâturages, les récoltes céréalières, le coton, le soja, les betteraves à sucre, le maïs, les haricots, les myrtilles et les grains stockés à l'intérieur des maisons.



Malathion

Figure III-1 : Structure chimique du Malathion

Caractéristiques	
Nom chimique	Phosphorodithioate de S-[1,2-bis(éthoxycarbonyl) éthyle] et de O,O-diméthyle
Formule chimique	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Type de pesticide	Acaricide et insecticide
Groupe chimique	Organophosphoré
Masse molaire (g/mole)	330,358 *
Point de fusion (°C)	2,9**
Solubilité dans l'eau (mg L ⁻¹)	146,16 *
Point d'ébullition (°C)	156-157 à 0,7 mm Hg **
Etat physique	Liquide incolore
Densité (g cm ⁻³)	1,22 *
Solubilité aqueuse (mg L ⁻¹)	146,16 *
Pression de vapeur saturante (Pa) à 30°C	5x 10 ⁻³ **
Log constante d'adsorption (log K _{oc})	2,77 *
Log coefficient de partage octanol-eau (log K _{ow})	2,84 *
Constante de Henry (Pa m ³ mol ⁻¹)	1,65 10 ⁻³ *

Tableau III-1: Principales propriétés physico-chimiques du Malathion (*Palumbo et al¹⁶., 2012 ; la référence 17 et ** <https://fr.wikipedia.org/wiki/Malathion>

3. Acétylcholinestérase

Le terme de cholinestérase a été proposé en 1932 pour décrire une enzyme capable d'hydrolyser l'acétylcholine.¹⁸ Quelques années plus tard, des commissions internationales de nomenclature biochimique ont entériné l'existence de deux formes distinctes de ChE qui diffèrent par leur origine, leur structure, leur spécificité d'action et leur fonction physiologique¹⁹.

3.1. Rôle physiologique et structure

L'AChE est exprimée dans de nombreux tissus. Mais c'est à la jonction neuromusculaire ou dans les synapses reliant certains neurones qu'elle remplit son rôle le mieux connu.

Une synapse cholinergique fonctionne schématiquement en quatre temps. Le neurotransmetteur, l'Acétylcholine (ACh), est d'abord libéré, diffuse à travers la fente synaptique, se lie réversiblement au récepteur nicotinique et est finalement hydrolysé (Figure III-2). C'est lors de cette dernière étape qu'intervient l'AChE. Elle remplit sa fonction cholinergique en assurant la terminaison de la transmission de l'influx nerveux au sein des jonctions neuromusculaires et des synapses cholinergiques²⁰. Cette action est réalisée par l'hydrolyse de son substrat, l'acétylcholine (ACh), en acétate et choline (Figure III-3)²¹, elle libère la fente synaptique en vue d'une éventuelle nouvelle transmission, permettant ainsi le passage des informations^{22,23}.

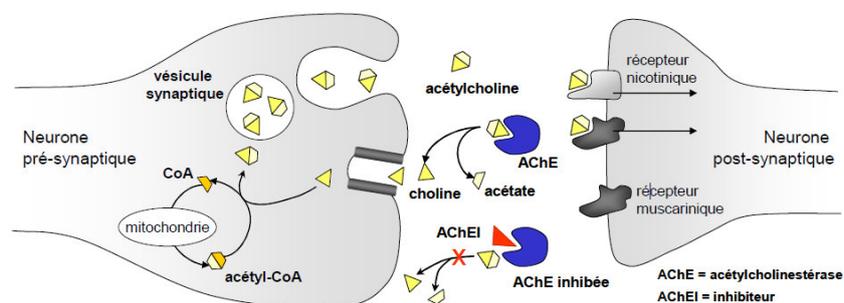


Figure III-2 : Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique²²

l'AChE est parmi les enzymes les plus rapides de la nature, avec un turn-over de 1000 à 20000 molécules par secondes selon l'espèce considérée.

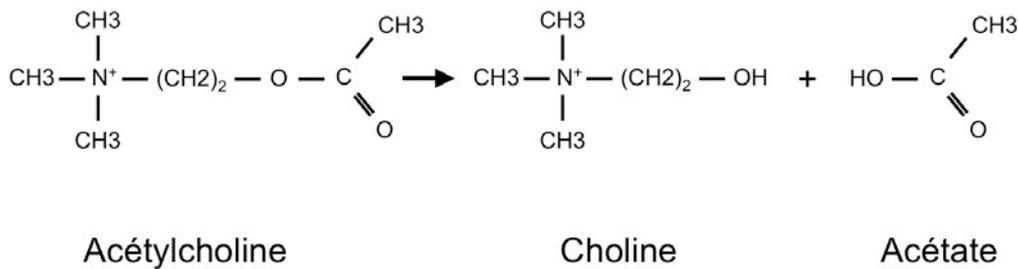


Figure III-3 : Mécanisme catalytique de l'Acétylcholinestérase

Elle appartient à la famille des hydrolases et elle est exprimée au niveau du système nerveux central et des muscles, son rôle comme décrit ci-dessus est d'hydrolyser le neurotransmetteur acétylcholine afin de terminer la transmission de l'influx nerveux et restaurer ainsi l'excitabilité des synapses cholinergiques.

L'acétylcholinestérase est une protéine complexe qui possède un centre actif, une multitude de sites périphériques et de nombreux domaines hydrophobes (Figure III-4).

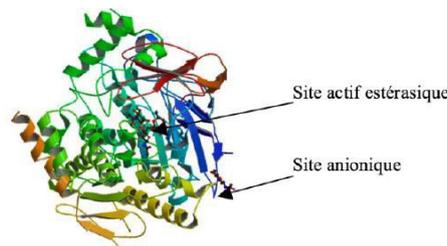


Figure III-4 : Représentation schématique de l'Acétylcholinestérase.²⁴

Le site actif, région particulière de l'enzyme où se déroule la réaction enzymatique, possède une taille restreinte par rapport à la taille globale de l'enzyme. La machinerie catalytique de l'AChE se trouve au fond d'une gorge profonde (env. 20 Å) et étroite (env. 5 Å) et comprend le groupement hydroxyle de la sérine qui réagit avec l'ACh, on distingue deux sous-sites : le site anionique et le site estérasique.

Le site estérasique correspond au locus au niveau duquel la portion acétyl de la molécule d'ACh se fixe et forme l'intermédiaire tétraédrique. L'ACh est alors clivée, libérant ainsi la choline et l'intermédiaire enzyme acylée. Ensuite a lieu la déacétylation, qui régénère l'enzyme libre en libérant l'acétate²⁵.

4. Inhibition

L'approche la plus générale pour la détermination des PO est basée sur leur inhibition de l'activité de l'AChE.

Les agents neurotoxiques sont en général propagés sous forme d'aérosols, et pénètrent ensuite par voie cutanée. L'une des cibles primaires des OP est alors l'AChE, et plus précisément l'AChE du système cholinergique lorsque les toxiques ont franchi la barrière hémato-encéphalique (BHE)²¹.

L'inhibition de l'AChE par un ester organophosphoré a lieu par l'intermédiaire d'une réaction chimique dans laquelle la partie hydroxyle de la sérine est phosphorylée au niveau du site actif de l'enzyme, d'une manière analogue à la réaction d'acétylation de l'AChE, déjà présentée sur la Figure III-3.

Par rapport à l'enzyme acétylée, qui est rapidement régénérée en libérant de l'acide acétique, l'enzyme phosphorylée est très stable. Dans quelques cas, selon les groupements fixés à l'atome de phosphore (R et R'), elle est inhibée irréversiblement. Le groupement hydroxyle de la sérine, bloqué par un groupement phosphoryle n'est plus capable de participer à l'hydrolyse de l'ACh. La réaction d'inhibition a lieu en deux étapes comme indiqué dans la Figure III-5²⁶.

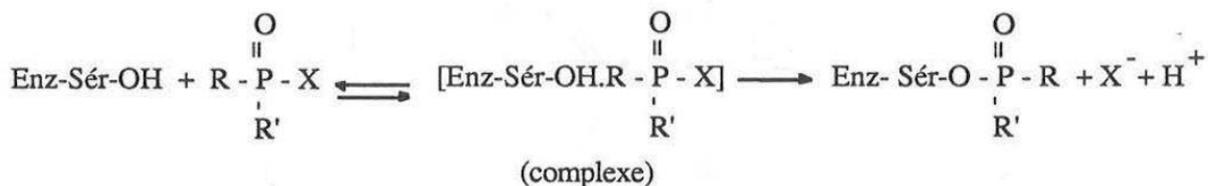


Figure III-5 : Inhibition de l'Acétylcholinestérase par les organophosphates

5. Réactivation d'Acétylcholinestérase inhibée

La régénération d'Acétylcholinestérase inhibée par des organophosphates a été étudiée très largement par de nombreux auteurs et est maintenant bien connue²⁷⁻²⁸. L'enzyme peut être réactivée en traitant le complexe enzyme-inhibiteur à l'aide de réactifs chimiques ayant une affinité nucléophile pour le phosphore, en substituant l'atome de phosphore de l'enzyme par un agent chimique²⁹⁻³². L'hydroxylamine et la plupart de ses dérivés, en particulier les acides hydroxamiques et les oximes, restaurent l'activité de l'enzyme inhibée. La réactivation par les oximes repose sur l'attaque nucléophile de l'atome de phosphore de l'OP lié à la sérine catalytique par la fonction oximate (NO-) de l'oxime. Dans un premier temps, l'oxime se lie à l'adduit OP, formant un conjugué oxime-phosphyle- AChE réversible (état de transition penta-coordonné). La sérine catalytique est ensuite libérée par le départ de l'oxime

phosphylée. L'état de protonation de l'oximate est crucial pour la réactivation : l'efficacité des oximes dépend donc du pH¹⁹.

La Figure III-6 présente le schéma réactionnel de la réactivation de l'AChE inhibée par un organophosphate à l'aide d'iodure de méthyl- 1 aldoxime- 2 pyridine (PAM). D'autres oximes utilisées pour la réactivation de l'AChE inhibée par un organophosphate sont le TMB-4 (1,1'-triméthylène-bis(4-formyl-pyridinium bromure) dioxime) et le MINA (monoisonitroso-acétone)^{26,33}.

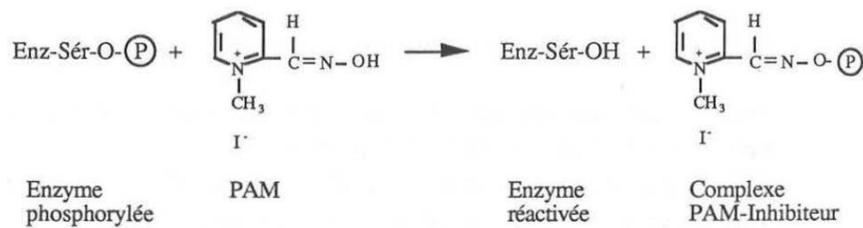


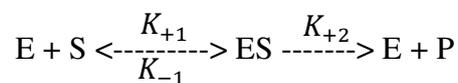
Figure III-6 : Réactivation par le PAM du cholinestérase inhibé par un organophosphate

6. La cinétique enzymatique

L'activité enzymatique est la quantité de substrat converti en produit par unité de temps dans des conditions réactionnelles spécifiques de pH et de température.

- *L'activité spécifique* est définie en termes d'unités d'enzyme par mg de protéine enzymatique.
- V_{max} est la vitesse de l'activité enzymatique de la concentration saturée de substrat.³⁴

La transformation d'un substrat en un produit, en présence d'une enzyme, peut être schématisée par la réaction suivante :



Ou,

E : représente l'enzyme,

S, le substrat,

ES, le complexe enzyme-substrat,

P, le produit,

K_{+1} , k_{-1} et k_{+2} sont les constantes de la vitesse de la réaction.

Suivant la théorie de Michaelis et Menten qui suppose un état stationnaire pour ES, la vitesse de la réaction s'écrit :

$$V = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = V_m \left\{ \frac{[S]}{K_m + [S]} \right\} \quad (1)$$

K_m : est la constante de Michaelis $K_m = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}}$

V_m : est la vitesse de réaction maximale. Pour $[S] \gg K_m$; $V_m = (K_{+2}[E_0])$,

$[E_0]$: est la concentration initiale de l'enzyme,

$[S]$ et $[P]$ sont respectivement la concentration du substrat et la concentration du produit.

L'équation de Michaelis-Menten est utilisée pour démontrer que, à la concentration de substrat qui produit exactement la moitié de la vitesse maximale de réaction, $\frac{1}{2}V_m$, la concentration du substrat est numériquement égale à K_m .

La représentation graphique permet de décrire le comportement cinétique de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat spécifique (Figure III-7).

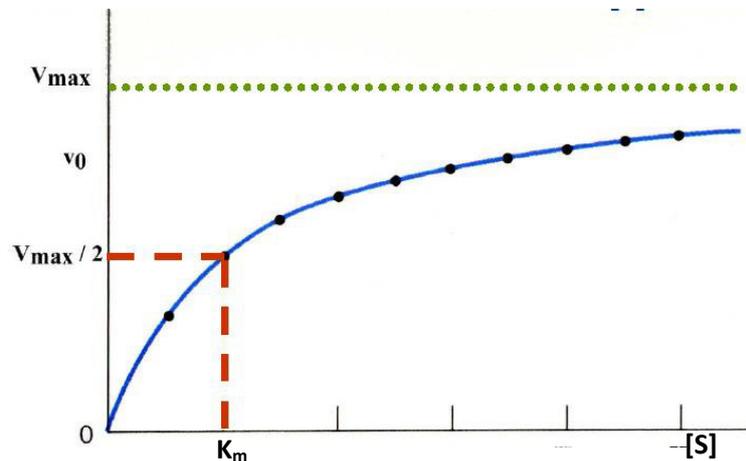


Figure III-7 : Vitesse initiale en fonction de $[S]$

La détermination graphique directe de V_m et K_m n'est pas toujours très précise, et d'autres méthodes ont été proposées. La transformation algébrique est la représentation la plus utilisée qui fut publiée 1935 par Hans Lineweaver et Dean Burk : elle a été effectuée afin de permettre une utilisation plus aisée. Elle repose sur une linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten: en prenant l'inverse de la vitesse, $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$, on obtient:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (2)$$

C'est une droite de pente K_m/V_m (Figure III-8).

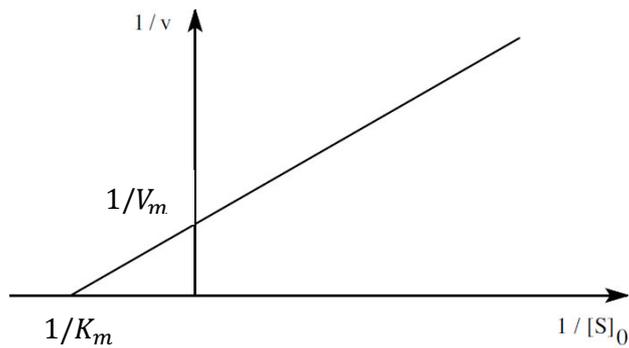


Figure III-8 : Représentation graphique de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten : graphique de Lineweaver –Burk

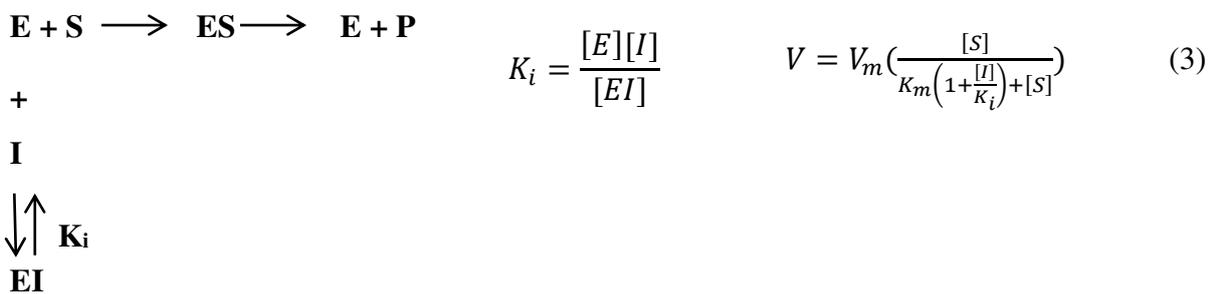
En présence d'inhibiteurs, la vitesse de la réaction enzymatique est réduite.

L'inhibition de l'enzyme peut être classée en deux catégories principales : inhibition réversible et inhibition irréversible, selon que l'élimination de l'inhibiteur restaure ou non l'activité initiale de l'enzyme. Les inhibiteurs réversibles sont classés en :

- Inhibiteur compétitif
- Inhibiteur non compétitif
- Inhibiteur incompétitif

- *Inhibiteur compétitif*

L'inhibiteur ressemble au substrat et entre en compétition avec lui pour s'introduire dans le site actif.



La constante de la dissociation de EI, est la même que K_m mais vis-à-vis de l'inhibiteur I.

La portion d'enzyme mobilisée par l'inhibiteur n'est pas disponible pour substrat et modifie donc le K_m (Figure III-9).

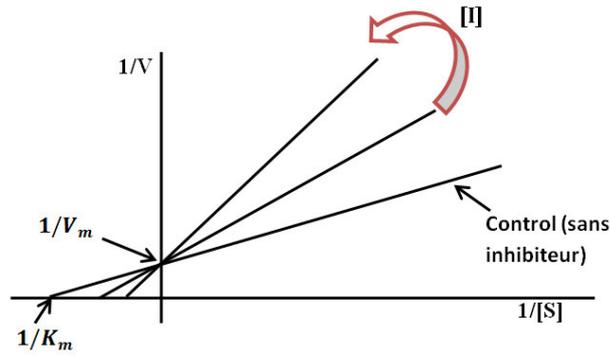


Figure III-9 : Représentation de Lineweaver-Burk d'une inhibition compétitive

La V_m reste inchangée car elle représente une situation où la totalité de l'enzyme est impliquée dans le complexe [ES] donc indépendante de [I].

- Inhibiteur non compétitive

Une inhibition non-compétitive peut se fixer sur [E] et sur [ES] (mais n'est pas en compétition avec [S] pour sa fixation à l'enzyme) il ne peut être déplacé par augmentation de [S].

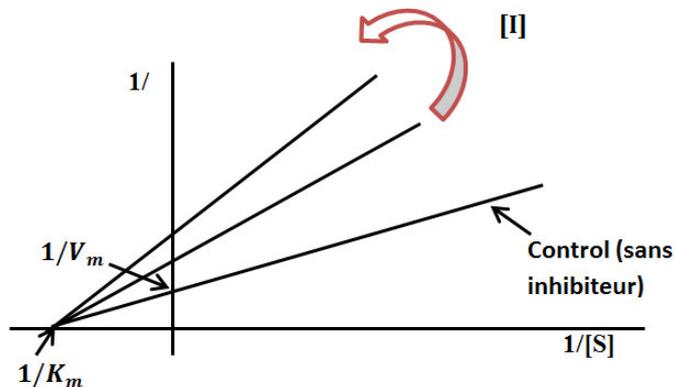
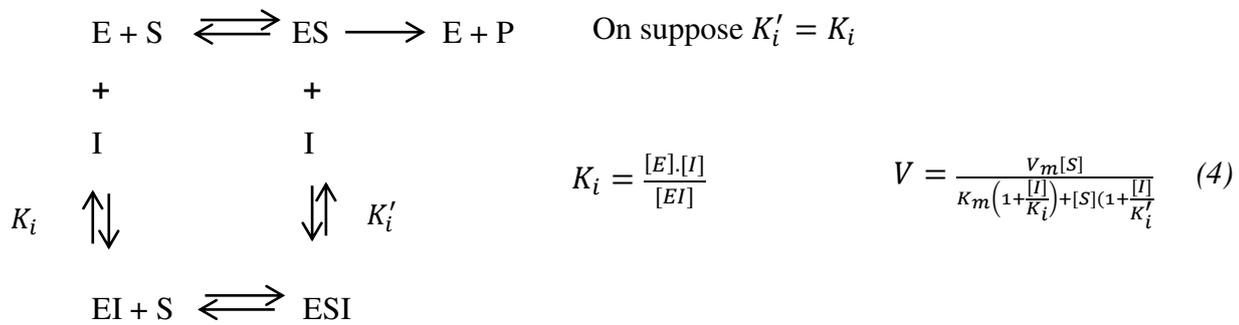


Figure III-10 : Représentation de Lineweaver-Burk d'une inhibition non-compétitive

Pour différentes valeurs fixées de [I], les droites obtenues en portant 1/V en fonction de 1/[S] se coupent, après extrapolation, sur l'axe des 1/[S] en un point d'abscisse $-(1/K_m)$ (Figure III-10). Quand [I] augmente, V_m diminue, K_m ne varie pas. L'inhibition ne peut être levée par un excès d'analyte.

- Inhibiteur incompétitif

Un inhibiteur incompétitif ne se fixe que sur le complexe ES (le site de fixation de I est induit par celle de S) (Figure III-11).

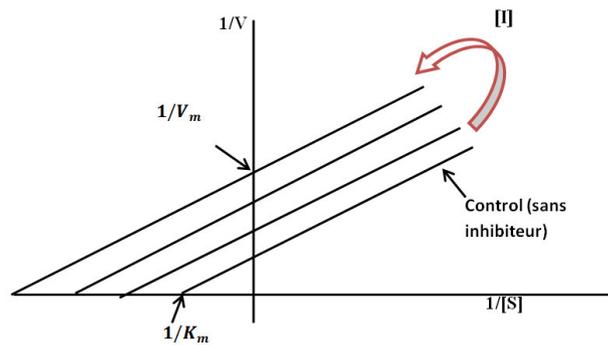
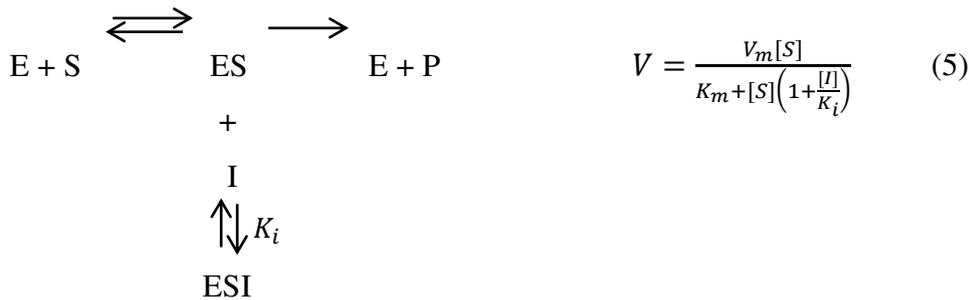


Figure III-11 : Représentation de Lineweaver-Burk d'une inhibition incompétitive

Pour différentes valeurs fixées de [I], les droites obtenues en portant 1/V en fonction de 1/[S] se sont des lignes droites parallèles.

Pour plus de détail voir les références 35-38

7. Méthode d'Ellman

La procédure d'Ellman⁹ est la méthode standard utilisée pour la détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase. Dans ces expériences l'acétylthiocholine (ATCI) est disposé à la place de l'acétylcholine (ACI) parce que son comportement cinétique qualitatif similaire fournit la surveillance de l'hydrolyse par la méthode de l'Ellman. Elle est basée sur le clivage de l'acétylthiocholine par l'ACHé ; cette réaction produit de la thiocholine qui réagit à son

tour avec le 5,5'- dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un anion de couleur jaune qui est détecté par spectrophotométrie avec une bande d'absorption à 412 nm (Figure III-12).

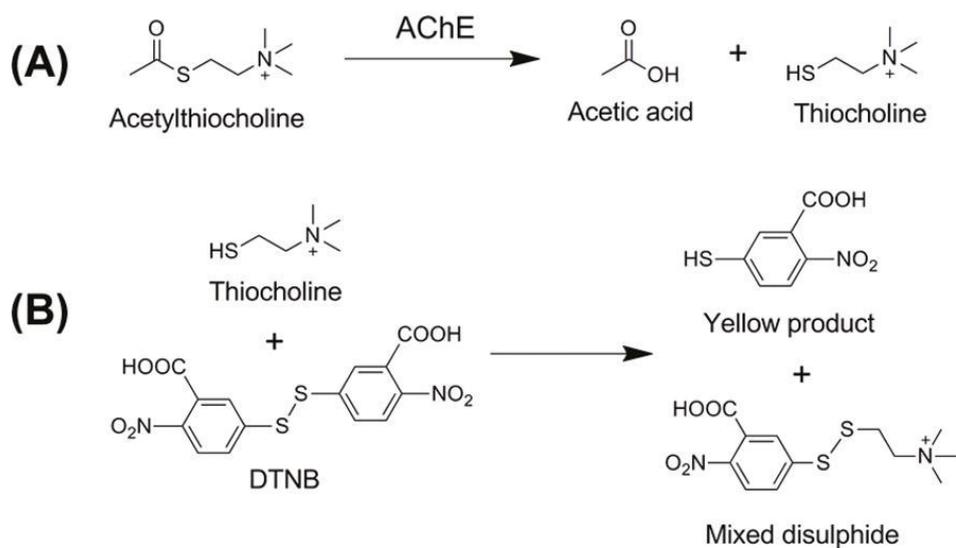


Figure III-12 (A) Hydrolyse du substrat d'acétylthiocholine en présence d'AChE. (B) Réduction de 5,50-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB), en présence de thiocholine conduit à la formation d'un produit de couleur jaune (acide 2-nitro-5-thiobenzoïque).

Mode opératoire

1. Procédé expérimental

L'activité de l'acétylcholinestérase immobilisée sur la surface de Si et SiP a été étudiée par des mesures de spectrophotométrie UV-Vis. Les mesures UV / Vis ont été effectuées avec un spectrophotomètre Evolution 300 UV-visible à double faisceau (CARY500), facilité avec VARIAN logiciel.

Le taux réactionnel d'AChE immobilisée a été déterminé selon la méthode d'Ellman⁹ décrite précédemment. La concentration d'enzymes AChE actives immobilisées peut être tirée au moyen d'une courbe d'étalonnage.

Les solutions mères : ATCl (0.075 M) et DTNB (0.01 M) ont été préparées dans du PBS 1X.

2. Évaluation de l'activité enzymatique

2.1. *Surface de Si modifiée Si-AChE*

- *Courbe d'étalonnage*

Différentes solutions avec différentes concentrations de l'AChE (de 0 à 0.51 nM) ont été préparées. Pour les mesures d'absorption UV-Vis, des solutions AChE (30 µl) ont été versées dans une cuvette en quartz contenant 25 µl d'ATCL et 100 µl de DTNB et la solution tampon PBS 1X ont été ajoutés de manière à parvenir à un volume final de 3.0 ml.

La figure III-13-a montre les spectres UV-Vis (enregistrés toutes les 2 min) pour une concentration d'AChE de 0.15 nM. La présence de la réaction enzymatique est mise en évidence par l'apparition et la montée progressive de la bande d'absorption centrée à 412 nm, indiquant la formation de la TNB. L'évolution de l'intensité de la bande varie linéairement avec le temps (insère dans la Figure III-13- a). La pente donne la vitesse de la réaction enzymatique, celle-ci a été déterminée pour les différentes concentrations de l'AChE. Les résultats sont représentés sur la Figure III-13-b. Comme prévu, le taux augmente de façon linéaire avec la quantité de l'acétylcholinestérase en solution. La courbe d'étalonnage ainsi établie est utilisée pour évaluer la concentration de l'AChE active immobilisée sur les surfaces de silicium.

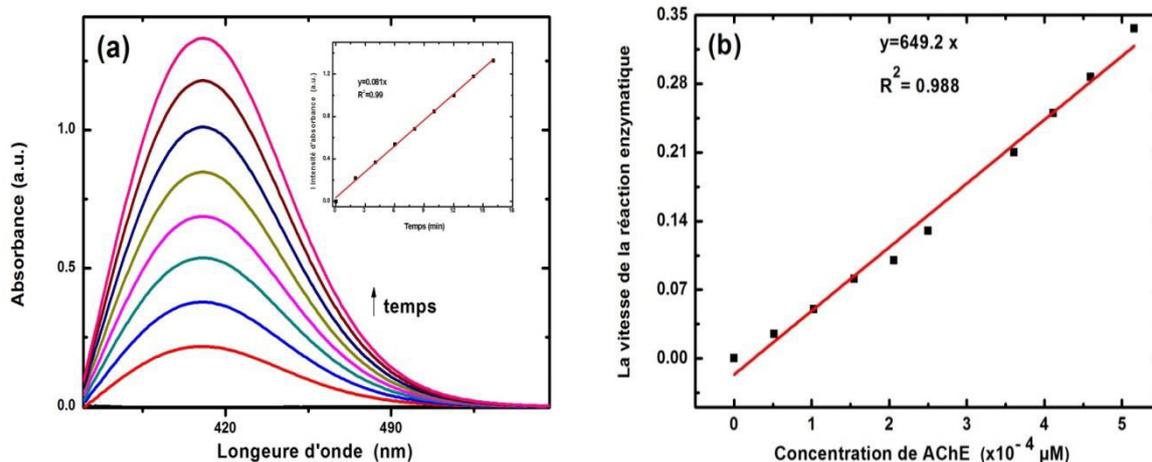


Figure III-13 (a) Evolution temporelle des spectres UV-Vis d'une solution contenant l'acétylcholinestérase (0.15 nM), 25 µl de ATCL (0.01 M), et 100 µl de DTNB (0,075 M). Le tracé dans insère dans cette figure montre les variations de l'intensité du pic en fonction du temps. (b) la courbe d'étalonnage de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration de l'AChE.

Figure III-14 montre les spectres UV / vis de solution de DTNB et ATCL en contact avec une surface de silicium plat modifiée avec AChE (Si-AChE). La surface a été préparée par exposition de la surface de silicium greffe et active à une solution enzymatique AChE de concentration 0.084 µM. La surface Si-AChE était immergée dans une solution de 3.0 ml contenant 25 µl de ATCL et 100 µl de DTNB et une solution de tampon PBS 1X. Après 2 min d'incubation, l'échantillon est retiré et le mélange de solutions est versé dans une cuve en quartz, les spectres UV-Vis enregistrés par rapport à une base du même mélange de solutions (sans incubation de la surface immobilisé).

La présence d'enzymes de l'AChE actives sur la surface est mise en évidence par l'apparition et l'intensité croissante de la bande d'absorption associée à TNB avec le temps. Un taux de 0.011 u.a / min de réaction est déterminé à partir du tracé du maximum d'absorbance en fonction du temps (Figure III-14-a), ce qui donne, d'après la courbe d'étalonnage de la Figure III-13-b, une concentration de surface des enzymes actives de $\Gamma \approx 1,72 \times 10^{10}$ AChE cm^{-2} .

Si nous comparons cette valeur avec celle obtenue avec l'analyse quantitative IR de l'AChE immobilisée à 0.084 μM , nous pouvons estimer une concentration proche de 1.1×10^{11} molécules cm^{-2} (Figure II-28), ce qui suggère qu'environ 16% des enzymes immobilisées sont actifs.

La vitesse de formation de TNB (0.011 / min) que nous avons trouvée est ~ 10 fois inférieure à celle rapportée pour un système similaire dans la référence 39 (8.6×10^{-2} / min), mais si l'on compare la densité déduite de l'Acétylcholinestérase active, dans les deux cas, cela à partir des courbes d'étalonnage d'absorbance UV/Vis (8.4×10^{11} / cm^2 à l'article et 1.72×10^{10} / cm^2 dans notre cas), nous trouvons un facteur de ~ 49 .

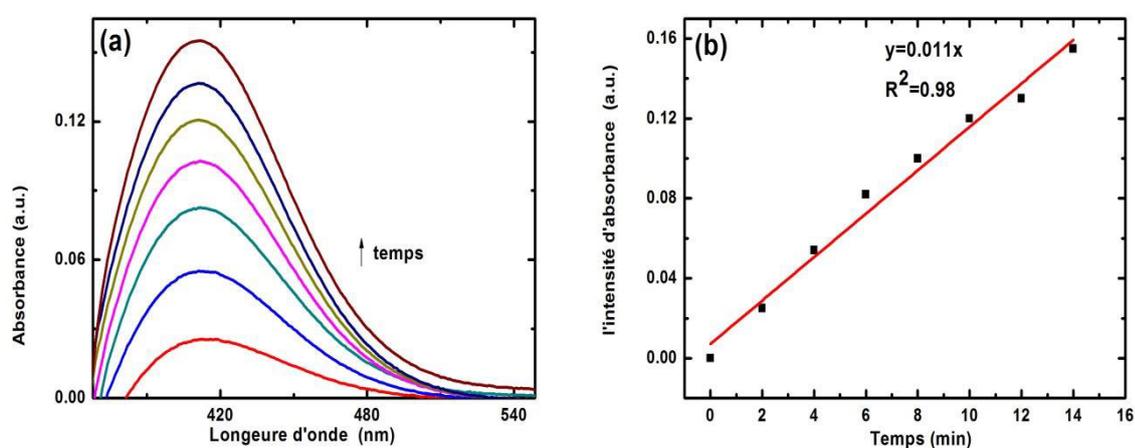


Figure III-14 : (a) Spectres UV-Vis d'une solution contenant ATCl (0.075 M) et DTNB (0.01 M) après l'immersion d'une surface de silicium à modification AChE. Les spectres (de bas en haut) ont été enregistrés à 2 min temps d'incubation. (b) l'absorption maximale en fonction du temps. La pente donne un taux de réaction de 0.011 a.u./minute.

3. Activité enzymatique de l'acétylcholinestérase immobilisée sur une surface de silicium Poreux

Différentes concentrations de l'AChE ont été mises à réagir en solution de 3.0 ml contenant ATCl, de DTNB et le tampon PBS1X. La progression de la réaction enzymatique a été évaluée en surveillant par UV-Vis spectrophotométrie la formation de TNB. Les spectres UV-Vis correspondant ont été enregistrés chaque 1 minute. La vitesse de la réaction enzymatique a été déterminée pour les différentes concentrations de l'AChE. La Figure III-15 représente la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de différentes concentrations de l'AChE. Le taux augmente de façon linéaire avec la quantité de l'acétylcholinestérase en solution. La courbe d'étalonnage ainsi établie est utilisée pour évaluer la concentration d'AChE immobilisée active sur les surfaces de silicium poreux modifié avec deux différentes méthodes (silicium poreux silanisé : SiP-NH et silicium poreux activé : SiP-COOSuc).

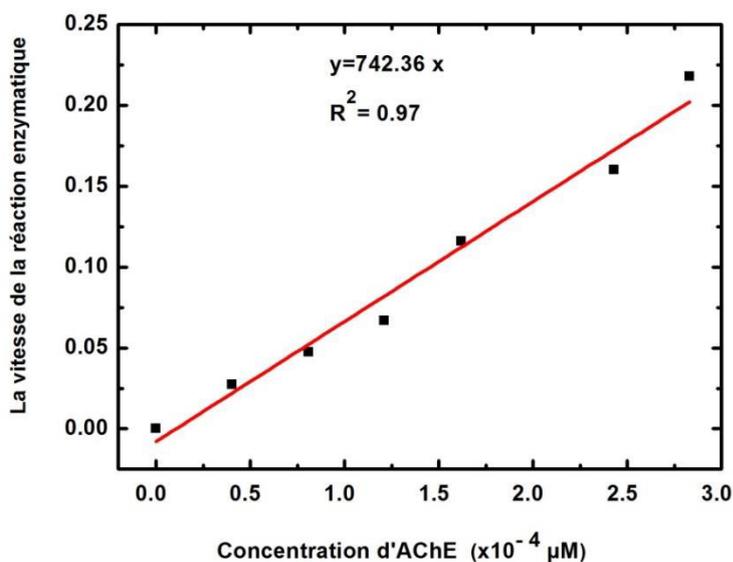


Figure III-15 : Courbe de calibration du taux enzymatique en fonction de la concentration AChE.

Des mesures UV-Vis ont été effectuées pour évaluer l'activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase immobilisée. Les Figures III-16-a et III-16-b montre les spectres UV-Vis de solutions ATCl et DTNB en contact avec les surfaces silicium poreux activée immobilisé (SiP-CONH-AChE) et la surface de silicium poreux silanisée immobilisée (SiP-NH-AChE), respectivement (regarder chapitre II).

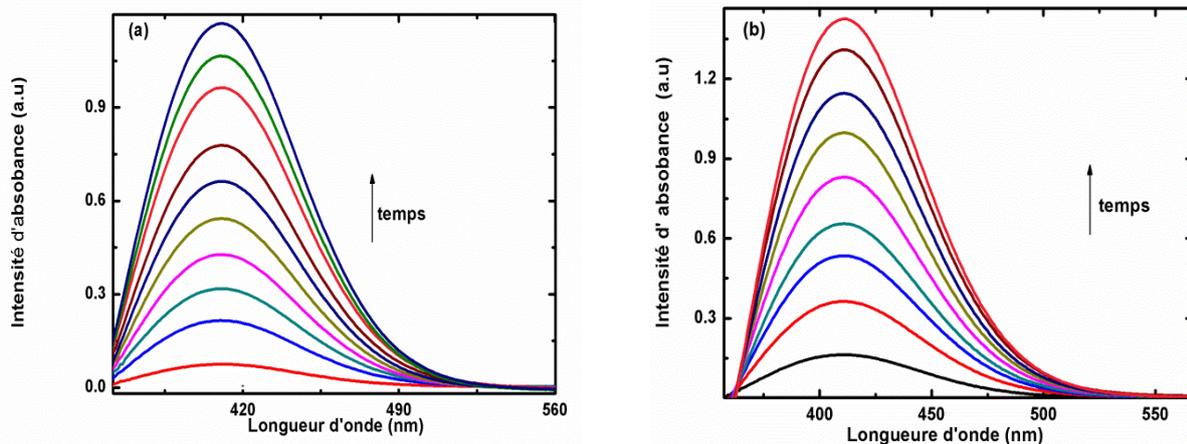


Figure III-16 : Evolution temporelle des spectres UV-Vis de la solution ATCl et DTNB en contact avec : (a) la surface SiP-CONH-AChE, (b) la surface SiP-NH-AChE. Les spectres (de bas en haut) ont été enregistrés chaque minute (temps d'incubation).

Les spectres ont été enregistrés chaque minute. Une bande d'absorption correspondant au produit jaune acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (TNB) est apparente à 412 nm et elle augmente au cours du temps indiquant l'évolution de la réaction enzymatique.

La variation du maximum d'absorbance en fonction du temps est indiquée dans les figures III-17- a et III-17-b pour chaque surface. Nous remarquons toujours une dépendance linéaire, la pente des deux courbes donne des taux de réaction enzymatique de 0.11 au/min pour la surface SiP-CONH-AChE figure III-17- a et 0,157 a.u / min pour la surface SiP-NH-AChE figure III-17-b.

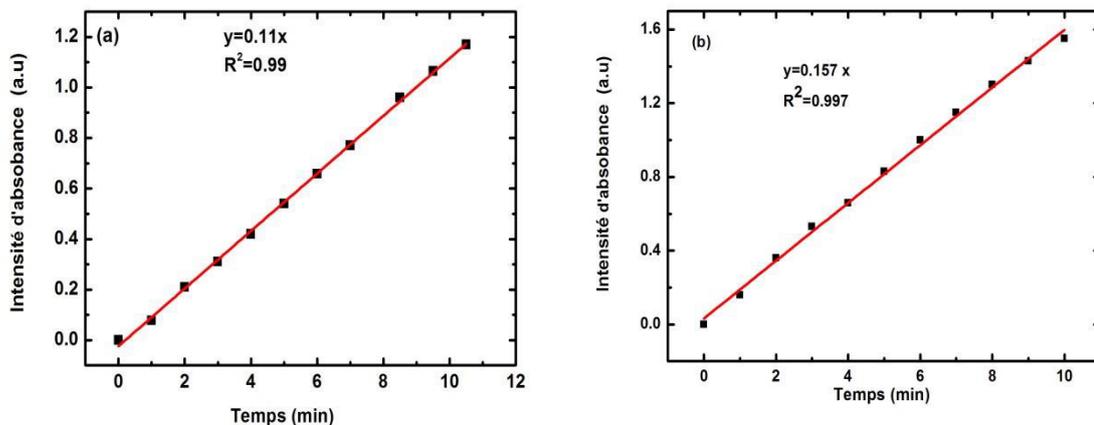


Figure III-17 : Changement de maximum d'absorption en fonction du temps : (a) la surface SiP-CONH-AChE, (b) la surface SiP-NH-AChE

Le taux d'AChE immobilisée active sur différentes surfaces a été évalué au moyen d'une courbe d'étalonnage de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en solution AChE figure III-15. Nous avons obtenu une valeur de $1.5 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$, correspondant à une couverture de surface de $2.7 \cdot 10^{11}$ molécules cm^{-2} pour la surface de SiP-COOH-AChE et d'une valeur de $2.1 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$ correspondant à une couverture de surface de $\Gamma \approx 3.8 \cdot 10^{11}$ molécules cm^{-2} pour la surface de SiP-NH₂-AChE. Nous pouvons noter que la quantité d'enzymes immobilisées actives sur la surface SiP-NH₂ est plus élevée que celles immobilisées sur la surface SiP-COOSuc. En raison du caractère hydrophobe de la surface de SiP-COOSuc, les biomolécules hydrophiles ne peuvent pas pénétrer facilement à la surface de SiP, conduisant à la diminution de l'efficacité de l'immobilisation sur cette surface par rapport à la surface SiP-NH₂ plus hydrophile. En outre, comme le montre la section 4.2 d'angle de contact dans le chapitre II, l'interaction de l'AChE et la surface hydrophobes de SiP-COOSuc favorise l'immobilisation de l'AChE avec le site actif vers la surface modifié. Cette orientation de l'enzyme rend difficile l'accès aux sites actifs conduisant à la réduction de l'activité enzymatique.

Conclusion

L'activité enzymatique évaluée par spectrophotométrie UV-Vis a été conservée pour les différentes surfaces étudiées. L'activité enzymatique est influencée par la structure de surface, la morphologie et l'orientation de l'enzyme.

L'activité de l'AChE est plus efficace sur la surface SiP-COOSuc que sur le Si plan à cause de la grande surface spécifique de SiP, par contre l'activité AChE est plus efficace sur la surface SiP-NH₂ puisque les sites actifs de l'enzyme sont plus accessibles à la différence de la surface PSi-COOSuc où les sites actifs sont confinés à la surface.

Références

1. **Miao Y.Q., He N.Y., Zhu J.J.**, *Chem. Rev.* 2010, 110, p. 5216.
2. **Kandimalla V.B., Ju H.X.**, *Chem. Eur. J.* 2006, 12, p. 1074.
3. **Liu G.D., Lin Y.H.**, *Anal. Chem.* 2006, 78, p. 835.
4. **Pavlov V., Xiao Y., Willner I.**, *Nano Lett.* 2005, 4, p. 649.
5. **Du D., Ding J.W., Cai J., Zhang A.D.**, *Sens. Actuators B-Chem.* 2008,134, p. 908.
6. **Anzolini, ieira.C.C., Corr A., Cardoso C.L., Cass Q.B.**, *J. Med. Chem.* 2013, 56, p. 2038.
7. **Bartolini M., Cavrini V., Andrisano V.**, *J. Chromatogr. A*, 2007,1144, p. 102.
8. **Arduini F., Errico I., Amine A., Micheli L., Palleschi G., Moscone D.**, *Anal. Chem.* 2007 79, p.3409.
9. **Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Jr., Featherstone R. M.**, *Biochem. Pharmacol.* 1961, 7, p. 88.
10. **Istamboulie G.** Biocapteur associant l'acétylcholinestérase et la phosphotriestérase pour un contrôle environnemental des insecticides organophosphorés. Thèse de doctorat de l'université de Perpignan. 2009
11. **Elersek T., Filipic M.**, 2011. Organophosphorous Pesticides - Mechanisms of Their Toxicity, Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure, Prof. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN:978-953-307-531-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-the-impacts-of-pesticidesexposure/organophosphorous-pesticides-mechanisms-of-their-toxicity>.
12. <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Environnement-et-sante/Biosurveillance/Index-de-A-a-Z/P/Pesticides-organophosphores>
13. **Marielle WANDHAMMER** "Etude structural de l'inhibition des cholinestérases par neurotoxique organophosphorés, stratégie de réaction, thèse doctorat, Université de Strasbourg, 2012.
14. **Flessel P., Quintana P.J., Hooper K.**, *Environ. Mol. Mutagen.*, 1993, 22, p. 7.
15. **Roberts R.J.**, *Head lice. New Engl. J. Med.*, 2002, 346, p.1645.
16. **Palumbo A.J., TenBrook P.L., Fojut T.L., Faria I.R., Tjeerdema R.S.**, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2012, 216, p.1.

17. **Héla TOUMI**, Ecotoxicité de la deltaméthrine et du malathion sur différentes souches de *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera): apport de la protéomique dans la recherche de nouvelles cibles cellulaires, thèse doctorat, Université Lorrain, 2013.
18. **Lejus C., Blanloeil Y., Burnat P., Souron R.** 1998 ;17, p.1122.
19. **Cardon N, Vaillant C, Cren P, Gruffat B, Rappold JP, Corbé H**, Intoxication aiguë au pesticide organophosphoré et activités des cholinestérases *Annales de Biologie Clinique*. 2005,63(3), p. 329.
20. **Silman I., Sussman J.L.**, 2005, 5, p. 293.
21. **Benoît Sanson** « La dynamique structurale de l'Acétylcholinestérase : étude réalisée par cristallographie aux rayons X et une méthode spectroscopique complémentaire » thèse doctorat, Université JOSEPH FOURIER, 2009.
22. **Aurélié Urbain**, Isolement de xanthones et coumarines inhibitrices de l'Acétylcholinestérase, respectivement à partir de *Gentianella campestris* (L.) Börner et *Gentianella amarella* (L.) Börner ssp. *acuta* (Michx.) J.M.Gillett (Gentianaceae), et *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch (Apiaceae), Université de Genève,2007.
23. **Bocquené G, Galgani F, Walker C.H.** In : *Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris1997, p. 209-/240.
24. **Kryger G., Silman I, Sussman J. L.** *Structure* 1999, 7, p. 297.
25. **Jacques-Philippe COLLETIER**, Étude des relations structure – dynamique – fonction au sein de l'acétylcholinestérase, thèse doctorat, Université JOSEPH FOURIER, 2006.
26. **Satish Kumaran**, Immobilisation d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs : Analyse par injection en flux continu (FIA) : Applications au dosage des composés polluants, thèse doctorat, 1991.
27. **DA VIES D. R., GREEN A. L.**, *Biochem. J.* 1956, 63, p.529.
28. **CHILDS A. F., DA VIES D. R., GREEN, A. L., RUTLAND J. P.**, *Brit. J. Pharmacol.*, 1955,10, p.462.
29. **ALDRIGE W. N., DA VINSON A, N.**, *Biochem. J.*, 1953, 55, p.763.
30. **ALDRIGE W. N.**, *Chem. and Ind.*, 1954, p.473.
31. **WILSON I. B.**, *J. Biol. Chem.*, 1951,190, p.110.
32. **WILSON I. B.**, *J. Biol. Chem.*, 1952, 199, p.113.
33. **TRAMMEL A. M., SIMMONS J. E., BORCHARDT R. T.**, *Pharm.Res.*, 1984, p.115-120.
34. **Matthews C.K., Van Holde K.E., Ahern K.G.** (2004) 3rd edition Ambrosiana, Milan.

35. **Stryer L.**, Biochemistry (4th Edition) W.H. Freeman and Co., San Francisco 1995, Chapter 8, 9 and 10. (A good introduction to enzymes and kinetics.)
36. **Lehninger A.L.**, Biochemistry, Second Edition, Worth Publishers, Inc., New York, 1975, Chapters 8 and 9.
37. **Mahler H.R., Cordes E.H.**, Biological Chemistry, Second Edition, Harper and Row, New York, 1971, Chapters 6 and 7. (A more technical treatment.)
38. **Dixon M., Webb E.C.**, Enzymes, 3rd Edition, Academic Press, Inc., New York, 1979.
39. **Milkani E.**; Lambert C. R.; McGimpsey W. G. Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor. *Anal. Biochem.* 2011, 408, 212–219.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a été consacré à l'immobilisation d'Acétylcholinestérase à la surface de silicium et de SiP pour l'étude de l'activité enzymatique par voie électrochimique et par spectroscopie UV-Vis des surfaces obtenues et ce dans la perspective de développer des dispositifs pour la détection électrochimique des organophosphorés en solution.

Les substrats de SiP mésoporeux ont été élaborés par voie électrochimique dans HF. Les surfaces de silicium hydrogéné H-Si(111) atomiquement planes ont été préparées dans NH₄F, et les surfaces de silicium SiH_x rugueuses ont été préparées dans l'HF. La modification de ces surfaces par l'enzyme AChE a été réalisée en suivant un procédé multi-étapes compatible avec les méthodes douces requises pour l'accrochage de ces molécules sans les endommager.

Nous avons suivi deux stratégies pour l'immobilisation de l'AChE, La première méthode consiste à choisir une monocouche d'acide comme surface de départ et ce dans le but d'accrocher les enzymes AChE par une réaction d'amidation entre l'amine contenue dans les lysines de cette enzyme et les terminaisons acides en surface. Cette monocouche organique portant un groupement acide en bout de chaîne a été greffée par une réaction d'hydrosilylation entre un acide undécylénique et la surface hydrogénée de Silicium et de silicium poreux. La réaction a lieu par la double liaison C=C de l'acide undécylénique et mène à la formation d'une monocouche organique greffée de manière covalente à la surface à travers les liaisons Si-C. Aucune oxydation de surface n'a été observée. Deux méthodes de greffage ont été utilisées : l'hydrosilylation thermique et l'hydrosilylation photochimique. Toutefois, il apparaît que la modification par voie thermique conduit à des couches plus denses. Afin d'accrocher l'enzyme, l'activation de ces terminaisons acides est nécessaire pour que la réaction d'amidation ait lieu. Cette activation a été réalisé en utilisant N-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de l'agent de couplage N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) afin de transformer les terminaisons acides en ester succinimidyle.

Dans la deuxième méthode nous avons utilisé des surfaces de SiP oxydées. Les sites Si-OH ont été utilisés pour la modification chimique de surface. L'organosilane l'APTES réagit avec les Si-OH pour conduire à la création des liaisons -Si-O-Si-, chimiquement très stables. Après le greffage de l'APTES la surface de SiP est recouverte par des terminaisons NH₂. Une réaction d'aminolyse se fait entre les groupes NH₂ et les résidus de groupes acides carboxylique sur l'AChE activé avec un mélange de EDC / NHS pour former des liaisons amides.

Nous avons examiné en temps réel l'immobilisation de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) sur une surface activée à l'aide de spectroscopie IR en réflexion totale atténuée (ATR) géométrie (ex situ et in situ).

La quantification des enzymes immobilisées a été réalisée en utilisant la spectroscopie FTIR en exploitant les deux bandes de vibrations spécifiques et dominantes (amide I et amide II) associés aux groupes amides.

Les procédures d'immobilisation décrites dans ce travail offrent des moyens simples pour l'immobilisation stable et efficace de l'acétylcholinestérase sur une surface de silicium modifiée. Des mesures d'angle de contact ont mis en évidence l'orientation des enzymes immobilisées sur les différents types de surfaces fonctionnalisées. L'activité enzymatique évaluée par la spectrophotométrie UV / Vis a été conservée pour les deux surfaces.

Toutefois, selon l'orientation de l'enzyme sur les différentes surfaces, l'activité de l'AChE est plus efficace sur la surface SiP-NH₂ puisque les sites actifs de l'enzyme sont plus accessibles à la différence de la surface SiP-COOSuc où les sites actifs sont confinés à la surface, comme expliqué dans des mesures d'angle de contact.

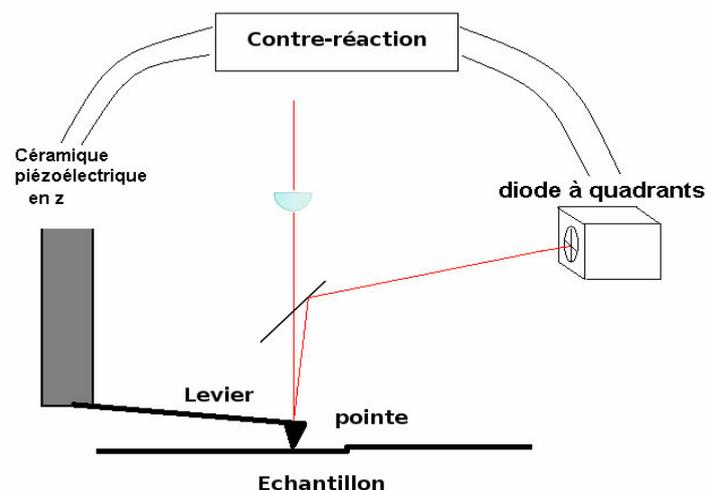
Enfin, la détection ampérométrique de l'activité de l'acétylcholinestérase est principalement basée sur l'oxydation du produit de l'hydrolyse enzymatique, le thiocholine ester. La méthode proposée est rapide, sensible et montre une bonne relation linéaire et une faible limite de détection dans la détermination de l'inhibiteur de l'enzyme. La méthode utilisée, nous a permis de déterminer la quantité des enzymes immobilisées et de déterminer la constante de Michaelis, ce qui rend cette méthode utile pour des applications réelles.

ANNEXE

Annexe 1 : Microscopie à Force Atomique

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

Le microscope utilisé est un AFM Nanoscope (Digital Instruments) avec des pointes en nitrure de silicium Si_3N_4 ayant un rayon de courbure de 10 nm et une constante de raideur de $0,12 \text{ Nm}^{-1}$. Les surfaces sont imagées en mode topographique, ou « force constante ». Une boucle d'asservissement, ou contre-réaction, agit sur la céramique piézo-électrique en z pour maintenir la force entre la pointe et la surface constante. L'analyse de l'évolution de la contre-réaction permet de connaître la topographie de la surface.



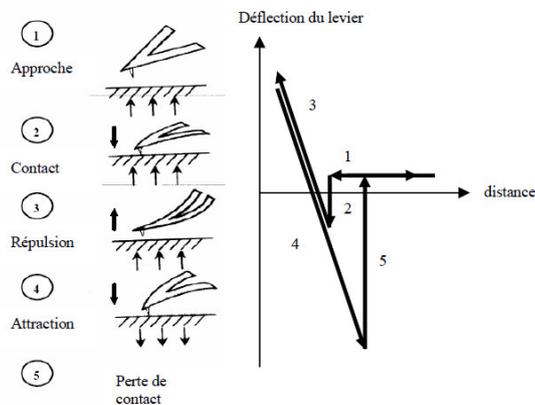
Annexe a : Schéma général de fonctionnement d'un microscope à force atomique.

D'un point de vue expérimental, après l'éventuel remplacement de la pointe AFM, la première étape consiste à placer, hors contact entre la pointe et la surface, le laser au niveau

du levier utilisé pour l'imagerie, de façon à lire un signal maximum sur le détecteur. Après positionnement de l'échantillon, le détecteur est déplacé à l'aide de vis afin d'avoir le spot réfléchi du laser le plus au centre de l'écran possible. L'approche de la pointe (en réalité, c'est l'échantillon qui monte mais cela ne change pas le raisonnement) peut alors commencer, celle-ci étant programmée pour s'arrêter quand le contact semble établi.

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

L'hydrophilicité de la surface peut être estimée par l'importance de l'adhésion de la pointe (témoin de la quantité d'eau présente en surface) lors de l'éloignement de la pointe (étape 4).



Annexe b : principe de l'approche de la pointe

Une zone carrée de la surface est alors balayée ligne par ligne, en maintenant la déflexion du levier à la valeur de consigne. La vitesse de balayage est de 1 Hz (une ligne par seconde). Le temps d'acquisition d'une image est d'environ 5 minutes. On obtient ainsi la topographie de la surface, dont la résolution dépend du rayon de courbure de la pointe utilisée (typiquement 10-50 nm) et de la taille du carré balayé (les images comportent au maximum 512×512 pixels). Les images obtenues en mode "force constante" sont ensuite traitées à l'aide du logiciel SPIP. Les images sont « aplaties » (l'échantillon n'est jamais exactement dans le même plan que le plan de balayage de la pointe) et la courbure provoquée par le déplacement de la pointe est corrigée (la pointe parcourt un arc de cercle : la luminosité n'est donc pas la même au centre et aux bords de l'image).

Annexe 2 :

1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

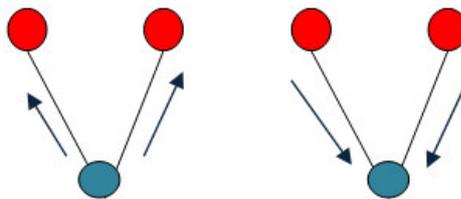
Afin de suivre l'évolution de la surface de silicium avant et durant les différentes phases de l'attaque chimique, nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge.

1.1. Principe de la spectroscopie infrarouge vibrationnelle

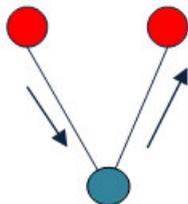
Il existe de nombreuses interactions entre un rayonnement infrarouge (IR) incident et une molécule. Un phénomène de résonance peut intervenir lorsqu'un faisceau IR traverse la molécule ou s'y réfléchit. Si la fréquence de résonance du rayonnement est différente de celle des vibrations moléculaires rencontrées ; la radiation n'est pas absorbée. Dans le cas contraire, la radiation perd une partie de son énergie : la molécule (ou une partie de la molécule) dont les atomes sont animés d'un mouvement de fréquence identique, absorbe cette énergie. Les mouvements moléculaires sont classés en différentes catégories.

Dans une molécule on peut avoir différents modes de vibration de liaison et une liaison peut avoir différents modes de vibration. Ces modes sont :

➤ Modes d'élongation:

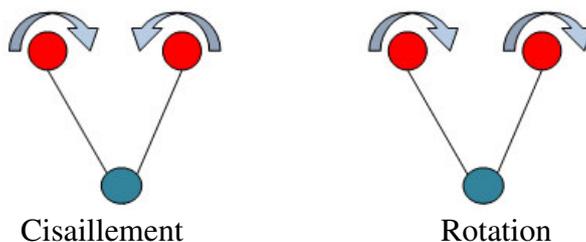


Le mode d'élongation symétrique

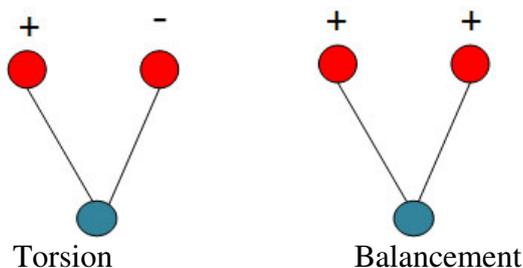


Le mode d'élongation antisymétrique

➤ **Modes de déformation:**



Déformations dans le plan



Déformations hors plan

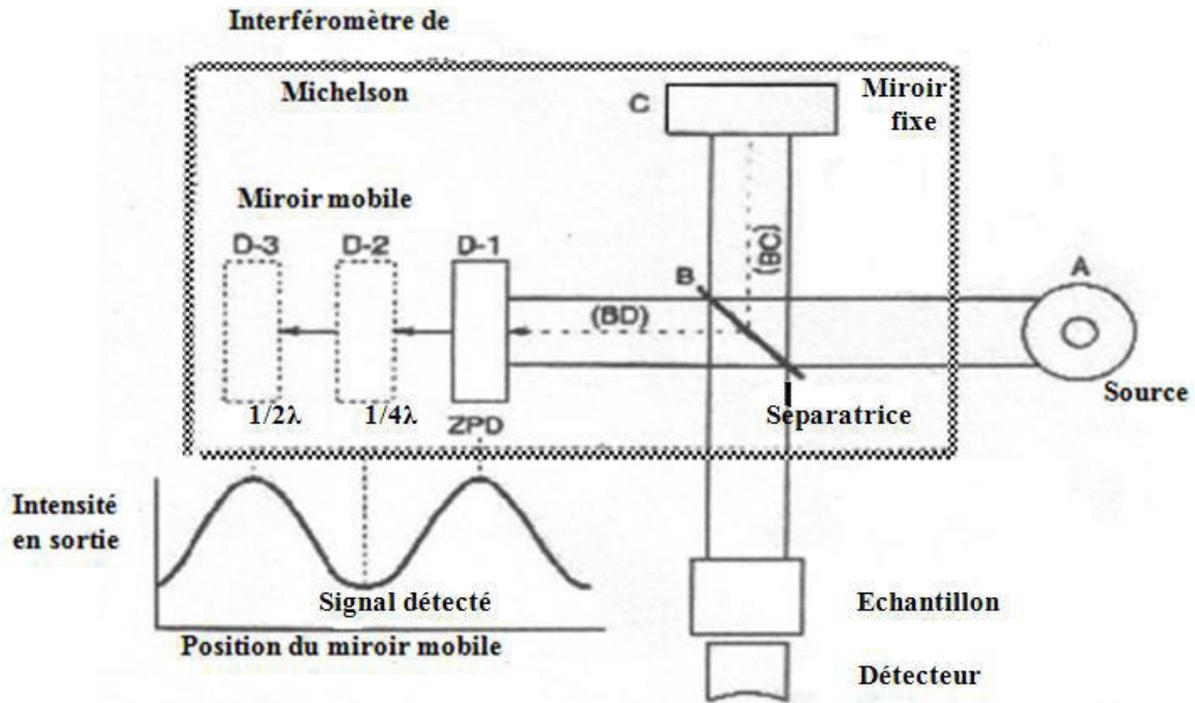
+ Signifie que le groupe se déplace vers l'avant.

– Signifie que le groupe se déplace vers l'arrière.

1.2. Principe de fonctionnement du spectromètre FTIR

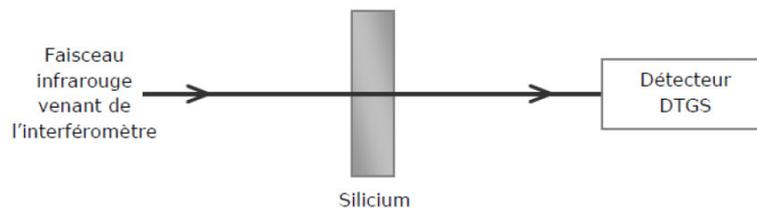
Le spectromètre FTIR est constitué de deux compartiments interconnectés : le banc optique et le compartiment de l'ordinateur.

Le banc optique contient une source qui émet une radiation infrarouge, un interféromètre de Michelson et un détecteur. La figure 1 décrit le schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier. Le rayon infrarouge produit par la source est dirigé vers l'interféromètre. A l'intérieur de ce dernier, le faisceau est immédiatement dévié en deux moitiés par la séparatrice. Une partie de la lumière est délivrée sur un miroir fixe et l'autre sur un miroir mobile, ce dernier a un mouvement de va et vient. Les deux rayonnements qui ont été réfléchis par les deux miroirs se recombinaient au niveau de la séparatrice pour continuer et atteindre l'échantillon. Après avoir traversé l'échantillon, le faisceau atteint un détecteur qui enregistre l'interférogramme qui représente l'intensité du signal en fonction de la différence de marche produit par les différentes positions du miroir mobile de l'interféromètre. La transformée de Fourier de ce signal fournit le spectre infrarouge en fonction du nombre d'onde.



1.3. Mesures infrarouges en transmission

Les mesures infrarouges en transmission effectuées sur les échantillons de silicium poreux ont été réalisées en plaçant l'échantillon à 90° par rapport à la direction du faisceau incident. Le faisceau infrarouge traverse l'échantillon pour être ensuite mesuré par un détecteur, le DTGS (Deuterated Tri Glycine Surface) travaillant à température ambiante (annexe d). Tous les spectres ont été enregistrés entre 400 et 4000 cm^{-1} , avec 100 scans et une résolution de 4 cm^{-1} .



Le dispositif avec lequel les spectres d'absorption infrarouge ont été obtenus est un spectromètre à transformée de Fourier de type « Thermo-Nicolet ».

Dans ce travail, les spectres FTIR sont montrés en absorbance. Cela correspond à des pics positifs pour les espèces qui apparaissent sur la surface mesurée par rapport à une surface de référence qui est une surface de silicium hydrogénée. L'absorbance A (ou densité optique) est reliée à la concentration des espèces chimiques par la loi de Beer-Lambert :

$$A = l \varepsilon C$$

ε : Coefficient d'extinction molaire caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée en $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

l : Epaisseur traversée en cm

C : la concentration en mol L^{-1}

L'absorbance A est déduite de l'intensité I du spectre étudié et de l'intensité I_0 d'un spectre de référence par la relation : $A = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right)$

Ainsi, les changements d'absorption observés permettent de connaître l'évolution (disparition ou apparition) des différents groupements chimiques présents.

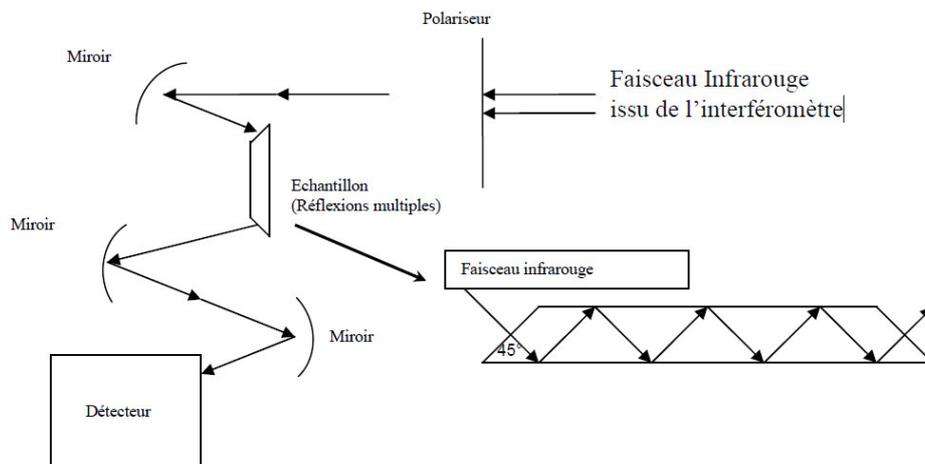
2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) en mode ATR (Attenuated Total Reflection)

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

Les spectres d'absorption sont obtenus à partir d'interférogrammes (enregistrement du signal en fonction de la différence de marche produite par l'interféromètre). Une opération mathématique, la transformée de Fourier de l'interférogramme, permet de restituer le spectre

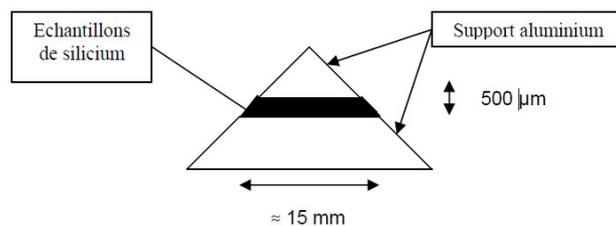
d'absorption infrarouge. A partir d'un spectre classique de transmission pour un échantillon volumique, l'absorbance, ou densité optique a , est reliée à la concentration des vibrateurs, les groupements chimiques, par la loi de Beer-Lambert $a = \epsilon.l.C$ où ϵ est le coefficient d'extinction molaire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

La spectroscopie de surface exige une sensibilité bien plus grande que la spectroscopie conventionnelle car le nombre de groupements chimiques est beaucoup plus faible sur 1 cm^2 de surface qu'au sein d' 1 cm^3 de solution. La spectroscopie en mode ATR est une méthode permettant de réaliser des spectres infrarouges de molécules greffées en surface d'un matériau transparent à l'infrarouge avec une bonne sensibilité grâce à une amplification du signal associée aux réflexions multiples au sein de l'échantillon étudié. A cette fin, celui-ci doit avoir une forme particulière : celle d'un prisme (annexe f). Cela permet en effet au faisceau infrarouge de réaliser un grand nombre de réflexions dans le cristal, lui permettant de visiter plusieurs fois l'interface et d'augmenter le signal utile.



Annexe e : Principe de fonctionnement du spectromètre IR en mode ATR (vues de dessus)

Afin de donner la forme prismatique particulière aux échantillons, des morceaux d'une tranche de silicium sont collés à la cire dans un support en aluminium (annexe d) puis polis en différentes étapes à l'aide de papiers abrasifs de 5 tailles de grains décroissantes puis de pâtes diamantées (tailles des grains de 3 à 1 μm .)



Annexe f : Polissage de l'échantillon de silicium

Comme il est précisé dans le rapport, une partie du prisme obtenu avec deux faces polies est volontairement dépolie, afin d'assurer une protection cathodique de la partie polie à l'aide de l'anode sacrificielle constituée de la partie dépolie.

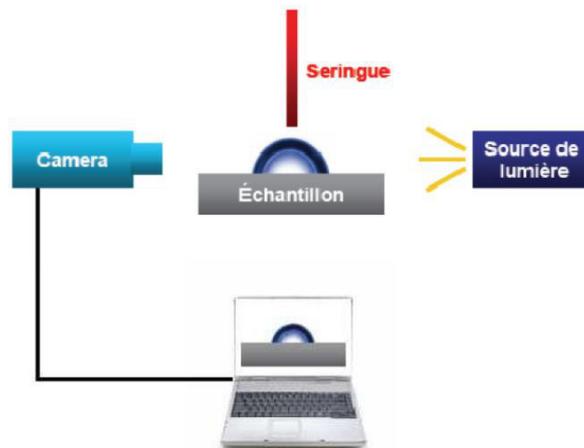
Le détecteur du spectromètre infrarouge utilisé requiert une attention particulière. Etant un semi-conducteur (jonction p-n) de très petit gap (absorption dans la zone des grandes longueurs d'onde), il est conducteur à température ambiante, et doit être refroidi à chaque utilisation à l'azote liquide (l'énergie thermique à l'ambiante étant suffisante pour franchir le gap). Le vase Dewar contenant le détecteur est pompé sous vide chaque semaine durant une douzaine d'heures afin d'assurer une isolation thermique maximale. Enfin, lors d'une mesure, le compartiment échantillon du spectromètre est purgé sous atmosphère d'azote afin de faire disparaître les traces d'eau et de CO₂ présents dans l'atmosphère ambiante et ne pas voir ces signaux parasites lors du tracé des rapports entre des spectres pris à différents moments.

Le nombre de réflexions N à l'intérieur du prisme est déterminé par le rapport entre la longueur de l'échantillon et son épaisseur. Dans les prismes utilisés, les grandeurs caractéristiques ($L=14$ mm, $e= 500$ μm et $\varphi= 45^\circ$) donnent $N= L/(e \times \tan(\varphi)) = 28$. Cette donnée permet de connaître l'absorbance de l'interface pour chaque réflexion et donc de réaliser une calibration réellement quantitative des groupements étudiés. Celle-ci a été décrite pour les spectres enregistrés *ex situ* dans le travail de Faucheux *et al* .

Annexe 3 : Mesure d'angle de contact

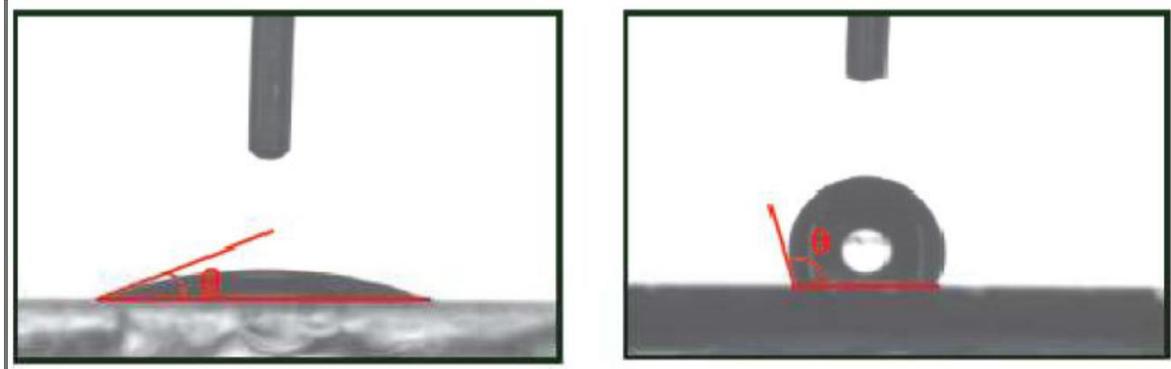
La mesure de l'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. La mesure de l'angle de contact permet la détermination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide / solide. Il est ainsi possible de déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe de l'échantillon. L'angle de contact dépend fortement de l'état de surface. Cette dernière se doit d'être exempte de tout contaminant. De plus, la rugosité ainsi que l'hétérogénéité chimique influe fortement sur cet angle. Il est à noter que le liquide sonde la surface sur plusieurs angströms en profondeur, ainsi l'angle ne dépend pas uniquement de la couche atomique superficielle mais aussi des groupements présents plus en profondeur.

D'un point de vue pratique, une goutte d'eau ultra-pure de 3 μL est déposée à l'aide d'une seringue sur la surface de l'échantillon à analyser. Ce dernier est éclairé sur le côté par un faisceau de lumière blanche afin que la caméra puisse enregistrer l'ombre de la goutte (Figure.3).



Annexe g : Dispositif expérimental de mesure de l'angle de contact.

La mesure de l'angle se fait à partir d'images capturées par un PC *via* une caméra. Le logiciel Visio drop permet de numériser le contour de la goutte par traitement des images. Il détermine ensuite l'angle de contact grâce à des méthodes d'interpolation. La mesure de l'angle de contact se fait sur un appareil *DigiDrop* équipé d'une caméra USB.



Annexe h : Goutte d'eau sur une surface hydrophile $\theta = 5^\circ$ (gauche) et sur surface hydrophobe (droit)

- tension interfaciale solide-liquide γ_{SL} (J/m^2)
- tension interfaciale solide-vapeur γ_{SV} (J/m^2)
- tension interfaciale liquide-vapeur γ_{LV} (J/m^2)

Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation de Young qui est la base de la plupart des méthodes de calcul de l'énergie de surface : $\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cdot \cos\theta$.

Active Acetylcholinesterase Immobilization on a Functionalized Silicon Surface

K. Khaldi,^{*,†,‡} S. Sam,^{*,†} A. C. Gouget-Laemmel,^{*,§} C. Henry de Villeneuve,[§] A. Morailon,[§] F. Ozanam,[§] J. Yang,[§] A. Kermad,[‡] N. Ghellai,[‡] and N. Gabouze[†]

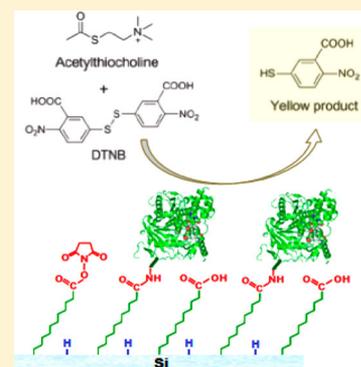
[†]Division Thin Films Surfaces & Interfaces, Centre de Recherche en Technologie des Semi-conducteurs pour l'Energétique (CRTSE), 02 Bd. Frantz Fanon, B.P. 140, Alger-7 Merveilles, Algiers, Algeria

[‡]Unité de Recherche Matériaux et Energies Renouvelables (URMER), Département de Physique, Faculté des Sciences, Université Abou Baker Belkaid, B.P. 119, 13000 Tlemcen, Algeria

[§]Physique de la Matière Condensée, Ecole Polytechnique-CNRS, 91128 Palaiseau, France

Supporting Information

ABSTRACT: In this work, we studied the attachment of active acetylcholinesterase (AChE) enzyme on a silicon substrate as a potential biomarker for the detection of organophosphorous (OP) pesticides. A multistep functionalization strategy was developed on a crystalline silicon surface: a carboxylic acid-terminated monolayer was grafted onto a hydrogen-terminated silicon surface by photochemical hydrosilylation, and then AChE was covalently attached through amide bonds using an activation EDC/NHS process. Each step of the modification was quantitatively characterized by ex-situ Fourier transform infrared spectroscopy in attenuated-total-reflection geometry (ATR-FTIR) and atomic force microscopy (AFM). The kinetics of enzyme immobilization was investigated using in situ real-time infrared spectroscopy. The enzymatic activity of immobilized acetylcholinesterase enzymes was determined with a colorimetric test. The surface concentration of active AChE was estimated to be $\Gamma = 1.72 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$.



INTRODUCTION

Acetylcholinesterase (AChE) is an important enzyme for the central nervous system. It hydrolyzes the neurotransmitter acetylcholine to acetate and choline.¹ AChE activity can be inhibited by organophosphorous (OP) compounds to form a phosphorylated adduct (OP-AChE), which leads to acetylcholine accumulation at cholinergic receptor sites causing various clinical complications such as respiratory paralysis and death.² Owing to this high toxicity, rapid determination and reliable quantification of trace level of OP compounds are important. Traditional analytical methods require expensive instrumentation. Recently, enzyme-based biosensors have been considered to be an alternative to conventional techniques because of the advantages of simplicity, rapidity, reliability, and low cost.^{3,4} The choice of solid supports and immobilization strategies presents the key challenge in enzyme biochip development in terms of sensitivity, stability, response time, and reproducibility.^{5,6} The crucial point is the retention of the catalytic activities of the immobilized enzymes.

Among other substrates, silicon has attracted special interest because its surface offers chemistry possibilities controlled down to the atomic scale,⁷ which open the way to the use of silicon substrates as transducers in efficient and sensitive (bio)chips on biocompatible and well-controlled surfaces.^{8–11} In this framework, it is now possible to anchor different probes through the formation of silicon–carbon bonds.^{12–14} The hydrosilylation of functionalized 1-alkene is of particular

interest for obtaining well-controlled and densely packed functionalized monolayers on silicon.¹⁵ For example, carboxydecyl-terminated silicon surfaces were largely studied as they allow for the further coupling of biomolecules such as peptides,¹⁶ DNA,¹⁷ and proteins^{18,19} under physiological conditions using an amidation reaction promoted by the well-known carbodiimide *N*-ethyl-*N'*-(3-(dimethylamino)propyl)-carbodiimide (EDC) in the presence of *N*-hydroxysuccinimide (NHS).^{20,21} Whereas enzyme immobilization was reported on various substrates in the literature,^{22–25} there is no study on active AChE grafted on modified flat silicon surfaces.

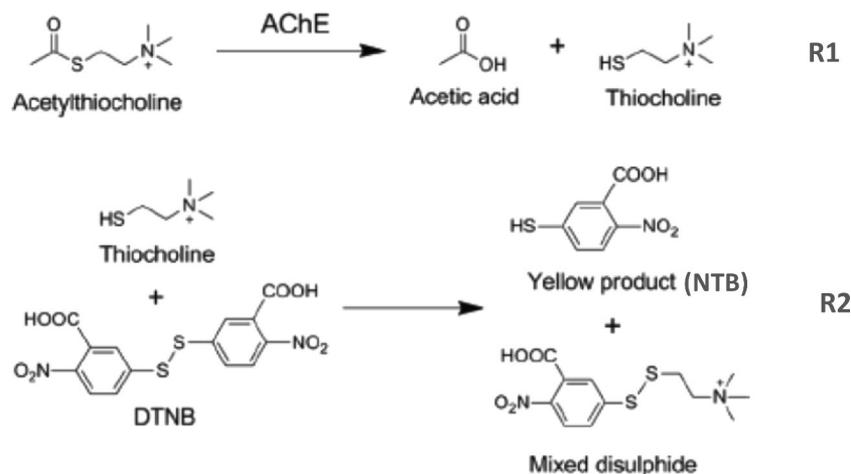
In this work, we investigated the immobilization of the AChE enzyme on a succinimidyl ester-terminated monolayer grafted onto a hydrogenated silicon surface by using ex situ and in situ real-time IR spectroscopy in attenuated total reflection (ATR) geometry. Enzyme quantification can be achieved using FTIR spectroscopy by exploiting the two specific and dominant vibrational bands (labeled amide I and amide II) associated with amide groups. The AChE activity can be determined with a standard photometric assay described by Ellman,²⁶ based on the assessment of the absorbance at 412 nm of a yellow product (2-nitro-5-thiobenzoic acid) resulting from the hydrolysis of acetylthiocholine by AChE.

Received: May 26, 2015

Revised: June 29, 2015

Published: July 7, 2015

Scheme 1. Reaction Scheme of the Colorimetric Assay



The results showed the attachment efficiency of AChE enzymes on functionalized silicon surfaces. Moreover, the enzymatic activity of AChE was preserved after immobilization, and the density of active enzymes was determined.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Acetylcholinesterase enzymes (AChE) (EC 3.1.1.7) from *Electrophorus electricus*, acetylthiocholine chloride (ATCl), 5:5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), *N*-(3-(dimethylamino)propyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) 98%, and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) 98% were purchased from Sigma-Aldrich and used as purchased without additional purification. Undecylenic acid (99%) was purchased from Acros Organics. All reagents used for the cleaning (hydrogen peroxide 30%; sulfuric acid 96%) and for the etching (NH_4F 40%; HF 50%) as well as glacial acetic acid were of electronic grade and supplied by Carlo Erba. Ultrapure water (18 M Ω cm, Millipore) was used for the preparation of solutions and rinses. Phosphate buffer solution (PBS, 10 \times , pH 7.4) was purchased from Ambion.

Sample Preparation. Silicon samples were cut from n-type silicon (111) wafers (Siltronix, France). The Si samples were cleaned in 1/3 (by volume) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ piranha solution at 100 °C for 30 min and rinsed with ultrapure water prior to etching. FZ-purified and double-side-polished Si wafers (10–30 Ω cm) were used for FTIR analysis. Prior to surface functionalization the surfaces were hydrogenated by etching in 50% HF (atomically rough SiH_x).²⁷ For AFM characterizations, samples were cut in CZ-purified well-oriented Si wafers (5–10 Ω cm) with a lengthwise 0.2° miscut, and the etching was performed in oxygen-free 40% NH_4F solution so as to obtain hydrogenated surfaces H–Si(111) exhibiting ~100-nm-wide, atomically flat Si(111) terraces well suited for high-resolution AFM imaging.²⁸

Surface Functionalization. Acid Monolayer Grafting and Activation. The freshly hydrogenated silicon surfaces were placed in a Schlenk tube containing outgassed undecylenic acid and irradiated under UV light (312 nm, 6 mW cm^{-2}) for 3 h. After grafting, the Si-COOH acid-terminated surfaces were rinsed in hot acetic acid (75 °C, 30 min) and blown dry under a flow of nitrogen.¹⁵

The acid-terminated surfaces were then activated by reacting the acid end-groups with NHS in the presence of EDC as coupling reagents in order to convert the acid groups into semistable succinimide ester. The Si-COOH surfaces were transferred into a Schlenk tube containing a mixture of 5 mM EDC and 5 mM NHS. The solutions were outgassed prior to the introduction of the Si-COOH surface and kept under bubbling argon. The reaction was allowed to proceed for 90 min at 15 °C.^{29,20} After reaction completion, the Si-COOSuc activated surface was copiously rinsed with ultrapure water (2 min) and blown dry under nitrogen.

Acetylcholinesterase Immobilization on Activated Si-COOSuc Surfaces. Solutions with various AChE concentrations (0.1, 1, 3.12, and 8.16 μM) were prepared by rehydrating the AChE enzymes in 1 \times PBS. Thirty microliters of the AChE enzymatic solutions was deposited on the activated Si-COOSuc surfaces, and the sample was kept in a hybridization chamber overnight. For FTIR measurements, 30 μL of the enzymatic solution was deposited on either face of the sample. The AChE-modified surfaces were then successively washed in 1 \times PBS for 2 min, 1 \times PBS for 10 min, 0.2 \times PBS for 5 min, 0.1 \times PBS for 2 min, and finally with ultrapure water and then blown dry under a stream of nitrogen.

Infrared Spectroscopy. ATR-FTIR spectra were recorded using a Bruker Equinox 55 spectrometer equipped with a liquid-nitrogen-cooled MCT photovoltaic detector. The silicon samples were shaped as prisms by polishing two bevels at ~48°. Spectra were recorded with s- and p-polarized IR beams over the 900–4000 cm^{-1} spectral range (4 cm^{-1} resolution).

AFM Characterization. AFM images were recorded in contact mode using a Pico SPM microscope (Molecular Imaging, Phoenix, AZ). Silicon nitride cantilevers (Nanoprobe, spring constant 0.2 N m^{-1}) were used, and imaging was carried out under an N_2 atmosphere.

AChE Activity Assay. The activity of AChE was assessed by investigating their ability to hydrolyze acetylthiocholine (ATCl). The reaction scheme of the activity assay is displayed in Scheme 1. In the presence of AChE, ATCl is hydrolyzed, leading to the formation of acetic acid and thiocholine (R1, Scheme 1). The formation of thiocholine can be detected indirectly through its reaction with Ellman's reagent (5:5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)), which leads to the formation of a yellow 2-nitro-5-thiobenzoic acid (NTB) product (R2, Scheme 1) whose formation can be monitored by UV/vis spectrophotometry.

Calibration of the Enzymatic Reaction Rate. Stock solutions of acetylthiocholine (ATCl, 0.075 M) and 5,5'-dithio-2-nitro-benzoic acid (DTNB, 0.01 M) were prepared in 1 \times PBS buffer solution (pH 7.4). Different solutions with various concentrations of AChE (from 0 to 0.51 nM) were prepared. For the UV/vis absorption measurements the AChE solutions were poured into a quartz cuvette containing 25 μL of ATCl and 100 μL of DTNB stock solutions, and 1 \times PBS buffer solution was added so as to reach a final volume of 3.0 mL. UV/vis measurements were performed with an Evolution 300 UV/visible double-beam spectrophotometer (CARY500) equipped with Varian software. Spectra were recorded every 2 min at room temperature.

Activity Assessment of Immobilized AChE. An AChE-modified surface (1.8 cm^2) was immersed in 3.0 mL of an activity assay solution containing 25 μL of ATCl, 100 μL of DTNB stock solutions, and 1 \times PBS buffer solution. After 2 min of incubation, the sample was removed and the activity assay solution was poured into a quartz cuvette to record UV/vis spectra.

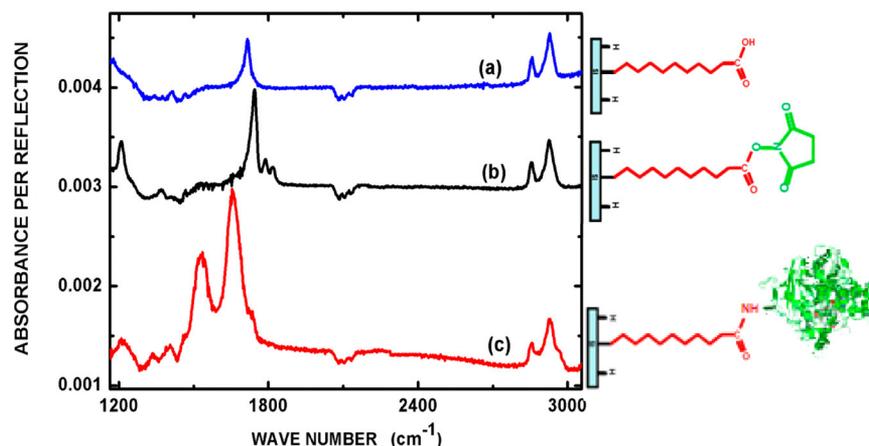


Figure 1. Ex situ ATR-FTIR spectra of a SiH_x surface after the grafting of an acid-terminated monolayer (a). The same surface after EDC/NHS activation (b) and after exposure of the activated Si-COOSuc surface in $3.12 \mu\text{M}$ acetylcholinesterase solution (c). In all cases the reference is the SiH_x surface prior to the grafting of the acid monolayer. The wavenumbers and assignments of the different peaks are summarized in the Supporting Information (Table 1).

As a control, an Si-COOH acid-terminated surface was immersed in the activity assay solution for at least 10 min, and no formation of yellow product was observed.

RESULTS AND DISCUSSION

FTIR Characterization of Si-AChE-Modified Surfaces.

The photochemical hydrosilylation of undecylenic acid with a hydrogen-terminated surface leads to the covalent grafting of carboxydecyl monolayers through the formation of Si-C bonds. The ATR-FTIR spectrum recorded after the grafting of an acid monolayer is displayed in Figure 1a. The reference is the hydrogenated SiH_x surface prior to the grafting. The negative bands indicate the disappearance of SiH_x bonds, and the positive bands indicate the presence of the carboxylic acid chains on the surface. We clearly observe the absorption bands assigned to the stretching modes of the methylene groups of the alkyl chains: νsCH_2 at 2855 cm^{-1} and νaCH_2 at 2925 cm^{-1} . The intense band centered at 1715 cm^{-1} is characteristic of the stretching mode $\nu\text{C=O}$ of the carbonyl involved in carboxylic acid groups. Another band assigned to $\nu\text{C-O-H}$ in plane mode is observed at 1415 cm^{-1} . From a quantitative analysis of the integrated absorbance of the carbonyl band, we estimate a surface concentration of 1.7×10^{14} acid chains cm^{-2} .¹⁵

Figure 1b displays the FTIR spectrum of the same surface after activation in EDC/NHS solution. One can observe the quasi-disappearance of the carbonyl band at 1715 cm^{-1} and the appearance of three new bands assigned to the $\nu\text{C=O}$ carbonyl vibration mode of succinimidyl ester groups COOSuc . The main peak at 1745 cm^{-1} is usually ascribed to the antisymmetric stretching mode of the carbonyl groups of the succinimidyl ring; the smaller peak at 1785 cm^{-1} is ascribed to the corresponding symmetric mode, and that at 1820 cm^{-1} is assigned to the ester $\nu\text{C=O}$ stretching mode.^{30,31} Other characteristic bands of the terminal succinimidyl ester groups are observed at 1210 and 1370 cm^{-1} and correspond to the antisymmetric and symmetric stretching modes of the C-N-C group.²⁰

The surface concentration of the COOH groups on the surface and the activation yield ($\text{COOH} \rightarrow \text{COOSuc}$) were determined using a true quantitative analysis method based on FTIR measurements with s- and p-polarized IR beams and on the calibration of absorbance cross sections in solution.^{15,29} The

results indicate a nominal surface concentration of COOH anchoring sites of $1.69 \times 10^{14} / \text{cm}^2$ and their quasi-total conversion into succinimidyl ester.

After exposure of the activated Si-COOSuc surface in the AChE enzymatic solution, the observation of broad and intense bands for amide I at $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ and amide II at $\sim 1530 \text{ cm}^{-1}$ clearly indicates the presence of the enzymes on the surface (Figure 1c). The amide bands may be assigned to a large extent to the peptide linkage making the enzyme backbone. The amide I band is assigned to $\nu\text{C=O}$ stretching vibrations, and the amide II band results mostly from the combination of $\delta\text{N-H}$ bending and $\nu\text{C-N}$ stretching modes.^{32–35} The weak bands in the region of $1200\text{--}1405 \text{ cm}^{-1}$ are assigned to amide III ($\nu\text{C-N}$ stretch and $\nu\text{N-H}$ bend near 1300 cm^{-1}).³⁶ Part of the amide bands could also arise from the covalent attachment of the enzymes through the reaction of amino side groups of their lysine residues with the succinimidyl ester groups. If the formation of amide linkage may be anticipated, it is difficult to identify the existence of such a covalent attachment because if it exists a relative weak contribution to the total intensity of the amide bands is expected. Anyway, the observation of the enzyme-related amide bands after different rinsing steps indicates a robust immobilization of AChE on the surfaces. A shoulder on the right side of the amide I band can be observed, which suggests the presence of carboxylic acid groups. This peak may be related either to carboxylic acid groups belonging to the enzyme backbone or to residual surface COOH groups. Indeed, $\text{COOSuc} \rightarrow \text{COOH}$ hydrolysis is anticipated as being a possible side reaction during the enzyme immobilization in PBS at $\text{pH} \sim 7.4$.

Figure 2a displays the narrow spectral range corresponding to the region of amide bands. The spectra were recorded on activated Si-COOSuc surfaces exposed overnight to enzymatic solutions with different AChE concentrations from 0.1 to $8.16 \mu\text{M}$. An increase in the intensity of the amide I and amide II bands is observed when the enzyme concentration in solution increases, which indicates the immobilization of more and more enzymes on the surface. The evolution of the surface concentration as a function of the AChE concentration in solution is plotted in Figure S1.

The surface concentration C_{AChE} was assessed from the integrated absorbance of the amide I band as measured on s-

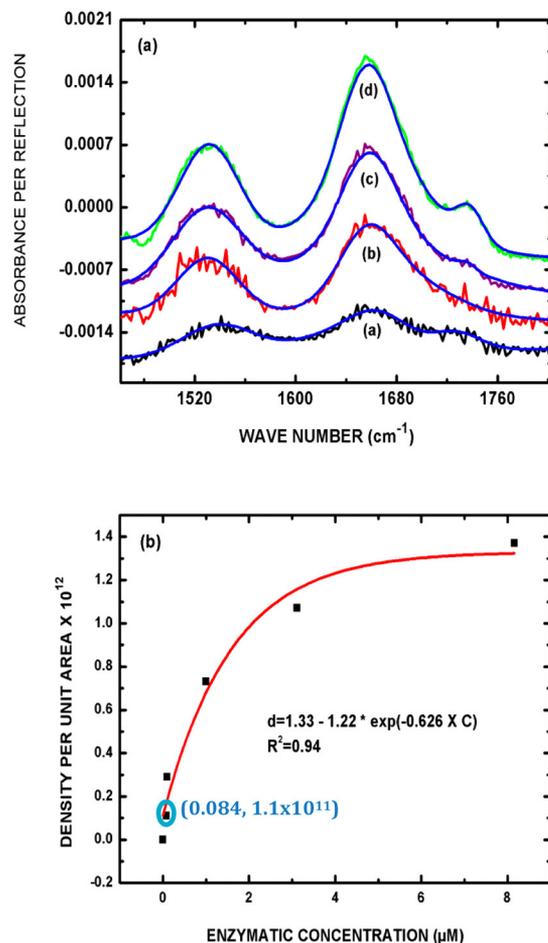


Figure 2. (a) Experimental FTIR spectra and resulting fitting curves (blue plots) of the amide I and II bands. The spectra were recorded after exposure in enzymatic solutions to different AChE concentrations: (a) 0.1, (b) 1, (c) 3.12, and (d) 8.16 μM . (b) Surface concentration of AChE as a function of the enzymatic concentration in solution.

and p-polarization spectra and using a calibrated cross section of the amide I band determined from absorbance measurements of bovine serum albumin (BSA) in solution (Figure 2b).³⁷ The amount of enzymes on the surface progressively grows and tends to stabilize to a threshold value indicating surface saturation. At saturation, $C_{\text{AChE}} = 1.4 \times 10^{12}/\text{cm}^2$, which is close to the expected maximum packing density of AChE enzymes $[(0.7\text{--}1.6) \times 10^{12}/\text{cm}^2]$ calculated from their tetrameric structures (size of $\sim 13 \text{ nm} \times 10 \text{ nm} \times 7 \text{ nm}$, as reported in the Protein Databank).³⁸

This result suggests the formation of a dense enzyme layer. It is noteworthy that the coverage obtained at saturation is comparable to those reported in the case of AChE immobilized on succinimidyl-terminated SAMs on gold³⁹ or CdS nanoparticles.⁴⁰

AFM Characterization. Figure 3 displays an AFM image of an activated Si-COOSuc prior to and after one night of exposure in 8.2 μM AChE solution (Figure 3b,c). Prior to enzyme immobilization (Figure 3a), the surface topography is similar to that of the as-prepared H-Si(111) surface. The surface exhibits a staircase structure with flat Si(111) terraces separated by atomic steps (3.1 Å high). The terraces are smooth (rms ~ 0.5 Å), which indicates the grafting of a dense

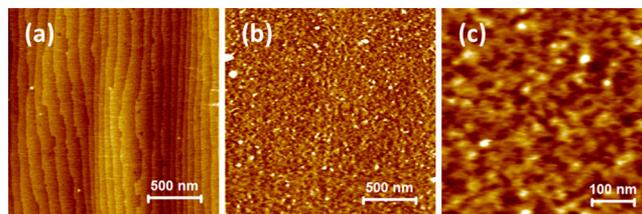


Figure 3. AFM images of a Si-COOSuc surface prior to (a) and after exposure to 8 and 16 μM AChE solutions (b, c). Prior to enzyme immobilization (a), the surface exhibits a staircase structure with atomically smooth Si(111) terraces separated by 3.1-Å-high atomic steps. After exposure to the AChE solution, the terraces and steps are no longer visible, indicating the presence of a homogeneous enzyme layer on the surface. The roughnesses as measured on image (c) are 0.55 nm (rms) and 4.75 nm (peak to valley).

monolayer of acid chains and a well-controlled and high conversion yield of the carboxylic acid end-groups into succinimidyl ester.⁴¹ After exposure into the enzymatic solution, a huge change in surface topography is observed. The staircase structure is no longer visible, indicating the formation of a homogeneous and dense layer covering the terraces. No significant physisorption was observed after exposure in blank PBS solutions (without enzyme), meaning that the topography change can be assigned to enzyme immobilization. The homogeneous coverage observed on the AFM images and the masking of the staircase structure are in quite good agreement with the FTIR measurements that indicate a surface saturation for enzyme concentration above 3 μM (Figure 2b).

Kinetics of Enzyme Immobilization. The kinetics of enzyme immobilization has been investigated by in situ ATR-FTIR measurements. For this purpose, freshly prepared activated Si-COOSuc surfaces were exposed to a flowing AChE enzymatic solution (1 or 2 μM) using a homemade vitroceraic IR flow cell with a volume of 0.1 mL fitted with inlet and outlet PTFE tubes (0.8 mm inner diameter) to circulate the solution. The real immobilization time of the enzymes on the surface was monitored by following the evolution of the amide-related absorption bands on the FTIR spectra (spectral region between 1450 and 1900 cm^{-1})

Figure 4a shows differential spectra recorded successively in 2 μM AChE solution. The reference spectrum was recorded immediately after exposing the Si-COOSuc surface to the enzymatic solution, and thus the absorbance variations over time shown on Figure 4a can be directly related to the enzymes anchored on the surface (and not to enzymes in solution). From the first minutes, we observe the progressive disappearance of the succinimidyl ester-related peaks (negative bands at 1745, 1785, and 1820 cm^{-1}), and the appearance of two amide bands at 1650 and 1530 cm^{-1} . Over time the amount of enzymes immobilized on the surface increases as stated by the rising of the amide bands. On the other hand, there is no appearance of the peak at 1715 cm^{-1} related to the acid groups indicating that there is no hydrolysis of the succinimidyl ester functions.

The time evolution of the intensity of the amide I, the amide II, and the main succinimidyl ester band (at 1745 cm^{-1}) is plotted in Figure 4b. The integrated absorbance of each relevant band has been determined by fitting the experimental spectra using five pseudo-Voigt peaks (three negative peaks

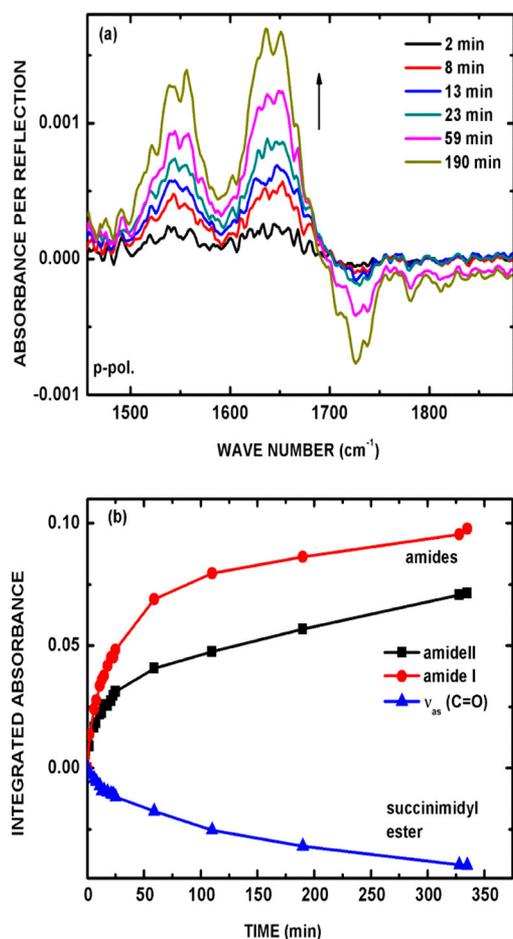


Figure 4. (a) Time evolution of FTIR spectra of an activated Si-COOSuc surface in contact with a $2 \mu\text{M}$ AChE solution. The different spectra were recorded after different exposure times (from 2 to 190 min). The reference spectrum was recorded just after the introduction of the solution into the cell. (b) Variations of the enzyme concentration on the surface as a function of time.

accounting for the succinimidyl ester and two positive peaks accounting for amide bands).

As expected, the succinimidyl ester loss is correlated with the simultaneous formation of the amide I and amide II bands. The evolution does not appear to obey a single-exponential profile, which would be the case for simple first-order kinetics as has been found for the amidation with hexylamine.²¹ The curve of the succinimidyl ester band in Figure 4b was fitted to a linear combination of two exponential functions using the expression below (as shown in Figure S2)

$$I = I_0 \left(1 - A_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - A_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \right) \text{ with } A_1 + A_2 = 1 \quad (1)$$

where t is the reaction time after the injection of the AChE solution and A_1 and A_2 are related to two process contributions. The first exponential is dominant in the first part of the curve, with $\tau_1 = 10$ min; the second time constant ($\tau_2 = 218$ min) mostly accounts for the slow evolution at long time. We also investigated the variation of the characteristic times upon changing the enzymatic solution concentration (Figure S2). We found that the long characteristic time τ_2 is increased by a factor of 1.5 when the enzyme concentration is decreased by a factor

of 2. This behavior is reminiscent of the dependence of the rate constant of the amidation reaction of hexylamine on the activated surface, a behavior explained by electrostatic interactions between adsorbing molecules prior to grafting. In addition, it was verified that the amidation could not be total even if we allowed the reaction to proceed for 24 h. The noncomplete reaction is likely due to the steric effect between these huge enzymes. As found from the absolute IR quantification, AChE covers a large area when immobilized on a functionalized surface.

Assessment of Enzyme Activity. The enzymatic activity of AChE was first investigated in solution in order to establish a calibration curve of the enzymatic reaction rate as a function of the AChE concentration in solution. For this purpose, different concentrations of AChE (from 0 to 0.51 nM) were reacted with acetylthiocholine (ATCl, 0.075 M) in the presence of dithionitrobenzoic acid (DTNB, 0.01 M), and the advancement of the enzymatic reaction was assessed by monitoring the formation of thionitrobenzoic acid (TNB) by UV/vis spectrophotometry. Figure 5a shows the UV/vis spectra

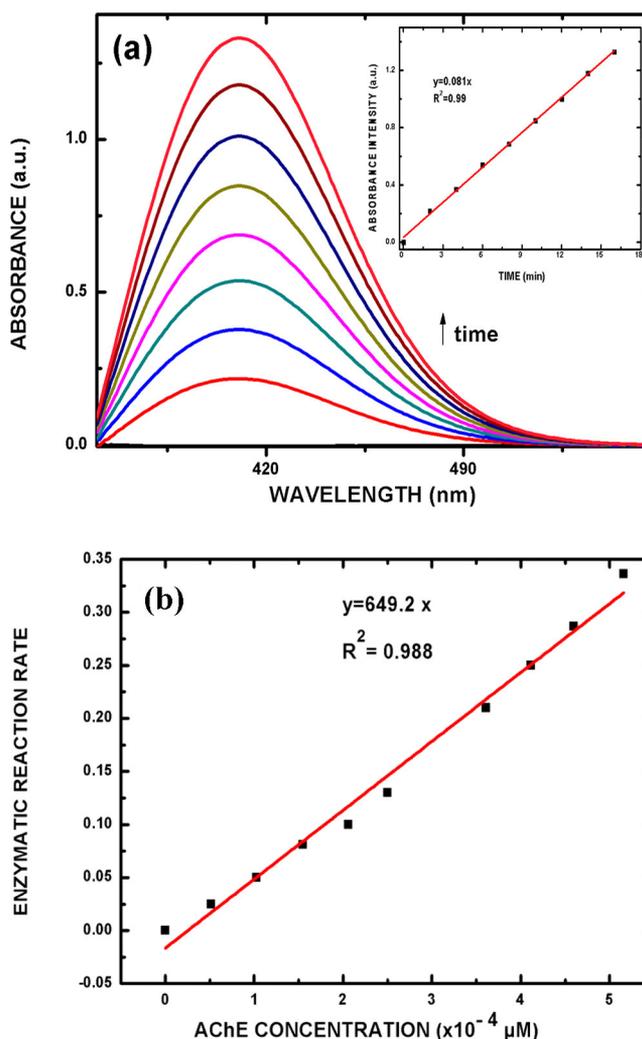


Figure 5. (a) Time evolution of UV/vis spectra of a solution containing AChE (0.15 nM), ATCl (0.01 M), and DTNB (0.075 M). The plot in the inset displays the variations of the peak intensity as a function of time. (b) Calibration curve of the enzymatic rate as a function of the AChE concentration.

(recorded every 2 min) for an AChE concentration of 0.15 nM. The occurrence of the enzymatic reaction is evidenced by the appearance and the progressive rising of the absorption band centered at 410 nm, indicating the formation of TNB. The evolution of the band intensity scales linearly with time (inset in Figure 5a). The slope gives an enzymatic reaction rate.

The rate of the enzymatic reaction was determined for the different AChE concentrations. The results are plotted on Figure 5b. As expected, the rate increases linearly with the amount of AChE in solution. The calibration curve thus established has been used to assess the fraction of active AChE immobilized on the silicon surfaces.

Enzymatic Activity of AChE Immobilized on a Silicon Surface. Figure 6a displays UV/vis spectra of ATCl and

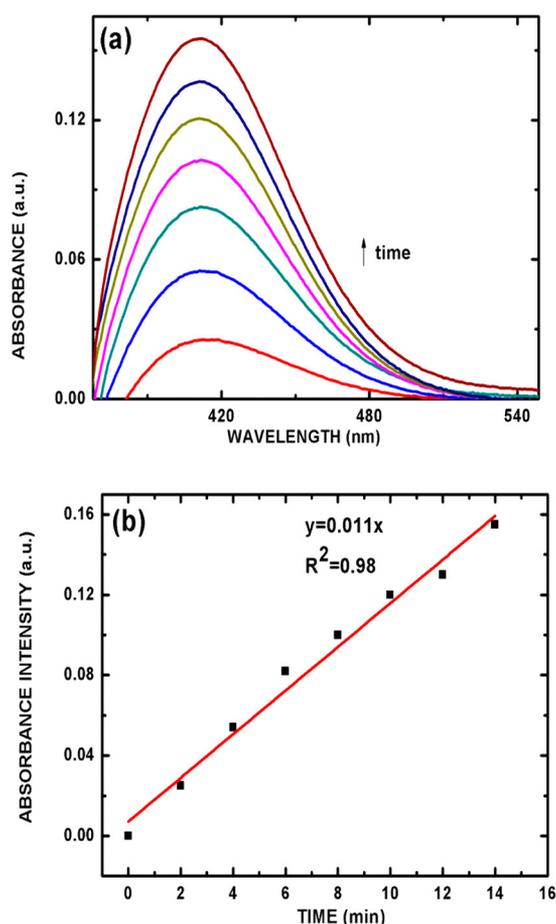


Figure 6. (a) UV/vis spectra of a solution containing ATCl (0.075 M) and DTNB (0.01 M) after the immersion of an AChE-modified silicon surface. The spectra (from bottom to top) were recorded at 2 min incubation times. (b) Maximum absorbance as a function of time. The slope gives a reaction rate of 0.011 au per minute.

DTNB solution in contact with an AChE-modified surface. The surface was prepared by exposure in 0.084 μM AChE solution. The spectra were recorded every 2 min. The presence of active AChE enzymes on the surface is evidenced by the appearance and the increasing intensity of the absorption band related to TNB over time. A reaction rate of 0.011 au/min is determined from the plot of the maximum absorbance as a function of time (Figure 6b), which gives, according to the calibration curve of Figure 5b, a surface concentration of active enzymes of $\Gamma \approx 1.72 \times 10^{10}$ AChE cm^{-2} .

From the IR quantitative analysis of AChE immobilized at 0.084 μM , we can estimate a concentration close to 1.1×10^{11} molecules cm^{-2} (Figure 2b), suggesting that $\sim 16\%$ of the immobilized enzymes are active.

The formation rate of TNB (0.011/min) that we found is ~ 10 times less than that reported for a similar system in ref 39 ($8.6 \times 10^{-2}/\text{min}$). This could at first glance account for the lower density of AChE enzymes on the surface, but if we compare the density of active AChE inferred, in both cases, from the UV/vis absorbance calibration curves ($8.4 \times 10^{11}/\text{cm}^2$ in the ref and $1.72 \times 10^{10}/\text{cm}^2$ in our case), we find a factor of ~ 49 .

CONCLUSIONS

In this work we have successfully immobilized AChE enzymes onto silicon surfaces previously functionalized by a succinimidyl-ester terminated monolayer. The presence of AChE was confirmed by FTIR measurements and AFM surface characterizations. The immobilized enzyme concentration was determined from the FTIR measurements using a true quantitative analysis method based on the calibration of the IR absorption cross sections. A dense enzyme layer was formed with a concentration at saturation of $1.4 \times 10^{12}/\text{cm}^2$.

In-situ real time infrared spectroscopy in ATR geometry allowed us to bring out two reaction schemes for enzyme immobilization. A fast process is observed at the beginning of the reaction, and in a second step over time, a slow kinetic process is recorded due to the steric interaction between the enzymes prior to grafting.

To assess the activity of immobilized AChE enzymes, a photometric assay was used. By assuming that the activity of immobilized enzyme is similar to the enzyme activity in solution, the calculation revealed that 1.72×10^{10} enzymes/ cm^2 are active on the surface, corresponding to $\sim 16\%$ of the total amount of immobilized AChE enzymes.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Peak assignments in the ATR-FTIR spectra. Integrated IR absorbance of amide bands as a function of the enzymatic concentration in the amidation solution. Integrated in-situ IR band absorbance of the succinimidyl ester as a function of time for different concentrations of AChE. The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01928.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: sabrina.sam@polytechnique.edu. Tel/Fax: + 213 21 43 26 30.

*E-mail: khadidjaphy@yahoo.fr. Tel/Fax: + 213 21 43 26 30.

*E-mail: anne-chantal.gouget@polytechnique.fr. Tel: +33 1 69 33 48 80.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the financial support of the National Research Fund (DGRSDT), the Centre de Recherche en Technologie des Semiconducteurs pour l'Energétique (CRTSE), and the European Commission NaS-ERA project

(FP7-INCO-2011-6.2, ERA WIDE). We thank Mr. Hamid Menari for the UV/vis measurements.

REFERENCES

- (1) Čolović, M.; Krstić, D.; Lazarević-Pašti, T.; Bondžić, A.; Vasić, V. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* **2013**, *11*, 315–335.
- (2) Worek, F.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2237–2248.
- (3) Chen, A.; Du, D.; Lin, Y. Highly sensitive and selective immuno capture /Electrochemical assay of Acetylcholinesterase activity in red blood cells: A biomarker of exposure to organophosphorus pesticides and nerve agents. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 1828–1833.
- (4) Ben Oujji, N.; Bakas, I.; Istambouli, G.; Ait-ichou, I.; Ait-Addi, E.; Rouillon, R.; Noguier, T. A simple colorimetric enzymatic-assay, based on immobilization of Acetylcholinesterase by adsorption, for sensitive detection of organophosphorus insecticides in Olive oil. *Food Control* **2014**, *46*, 75–80.
- (5) Spahn, C.; Minter, S. D. Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent Pat. Eng.* **2008**, *2*, 195–200.
- (6) Samanta, D.; Sarkar, A. Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2567–2592.
- (7) Chazalviel, J.-N.; Allongue, P.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Moraillon, A.; Ozanam, F. Covalent functionalizations of silicon surfaces and their application to biosensors. *Sci. Adv. Mater.* **2011**, *3*, 332–353.
- (8) Boukherroub, R. Chemical reactivity of hydrogen-terminated crystalline silicon surfaces. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2005**, *9*, 66–72.
- (9) Buriak, J. M. Organometallic chemistry on silicon and germanium surfaces. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1271–1308.
- (10) Wayner, D. D. M.; Wolkow, R. A. Organic modification of hydrogen terminated silicon surfaces. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2002**, *2*, 23–34.
- (11) Touahir, L.; Sam, S.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N.; Allongue, P.; Henry de Villeneuve, C.; Gabouze, N.; Djebbar, S.; Gouget-Laemmel, C. Functionalized silicon surfaces for biological and chemical sensors. *Sens. Lett.* **2010**, *8*, 447–456.
- (12) Bocking, T.; James, M.; Coster, H. G. L.; Chilcott, T. C.; Barrow, K. D. Structural characterization of Organic multilayers on silicon (111) formed by immobilization of molecular films on functionalized Si–C linked monolayers. *Langmuir* **2004**, *20*, 9227–9235.
- (13) Strother, T.; Cai, W.; Zhao, X. S.; Hamers, R. J.; Smith, L. M. Synthesis and characterization of DNA-modified silicon (111) surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1205–1209.
- (14) Strother, T.; Hamers, R. J.; Smith, L. M. Covalent attachment of Oligodeoxyribonucleotides to amine-modified Si (001) surfaces. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3535–3541.
- (15) Faucheux, A.; Gouget-Laemmel, A.; Henry de Villeneuve, C.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N. Well-defined carboxyl-terminated alkyl monolayers grafted onto H-Si (111): packing density from a combined AFM and quantitative IR study. *Langmuir* **2006**, *22*, 153–162.
- (16) Sam, S.; Gouget-Laemmel, A. C.; Chazalviel, J.-N.; Ozanam, F.; Gabouze, N. GlyHisGlyHis immobilization on silicon surface for copper detection. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *269*, 166–170.
- (17) Voicu, R.; Boukherroub, R.; Bartzoka, V.; Ward, T.; Wojtyk, J. T. C.; Wayner, D. D. M. Formation, characterization, and chemistry of undecanoic acid-terminated silicon surfaces: Patterning and immobilization of DNA. *Langmuir* **2004**, *20*, 11713–11720.
- (18) Patel, N.; Davies, M. C.; Hartshorne, M.; Heaton, R. J.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.; Williams, P. M. Immobilization of Protein Molecules onto Homogeneous and Mixed Carboxylate-Terminated Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **1997**, *13*, 6485–6490.
- (19) Hu, L.; Xu, S.; Pan, C.; Zou, H.; Jiang, G. Preparation of biochip on porous silicon and application for label-free detection of small molecule-protein interactions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1277–1281.
- (20) Sam, S.; Touahir, L.; Salvador Andresa, J.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Gabouze, N.; Djebbar, S. Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. *Langmuir* **2010**, *26*, 809–814.
- (21) Moraillon, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N. Amidation of Monolayer on Silicon in Physiological Buffer: A Quantitative IR Study. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 7158–7167.
- (22) Walker, J. P.; Asher, S. A. Acetylcholinesterase-based organophosphate nerve agent sensing photonic crystal. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1596–1600.
- (23) Tran, D. N.; Balkus, K. J., Jr. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 956–968.
- (24) Xue, R.; Kang, T.-F.; Lu, L.-P.; Cheng, S.-Y. Immobilization of Acetylcholinesterase via biocompatible interface of silk fibroin for detection of organophosphate and carbamate pesticides. *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258*, 6040–6045.
- (25) Cabral, M.; Barrios, J.; Kataok, E.; Machado, S. S.; Carrilho, E.; Garcia, C.; Ayon, A. Computational, electrochemical, and spectroscopic studies of Acetylcholinesterase covalently attached to carbon nanotubes. *Colloids Surf., B* **2013**, *103*, 624–629.
- (26) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M., Jr. A new and rapid colorimetric determination of Acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
- (27) Burrows, V. A.; Chabal, Y. J.; Higashi, G. S.; Raghavachari, K.; Christman, S. B. Infrared spectroscopy of Si(111) surfaces after HF treatment — hydrogen termination and surface-morphology. *Appl. Phys. Lett.* **1988**, *53*, 998–1000.
- (28) Munford, M. L.; Cortès, R.; Allongue, P. The preparation of ideally ordered flat H–Si (111) surfaces. *Sens. Mater.* **2001**, *13*, 259–269.
- (29) Touahir, L.; Chazalviel, J.-N.; Sam, S.; Moraillon, A.; Henry de Villeneuve, C.; Allongue, P.; Ozanam, F.; Gouget-Laemmel, A. C. Kinetics of activation of carboxyls to succinimidyl ester groups in monolayers grafted on silicon: an in situ real-time infrared spectroscopy study. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 6782–6787.
- (30) Arnold, R.; Azzam, W.; Terfort, A.; Wöll, C. Preparation, modification, and crystallinity of aliphatic and aromatic carboxylic acid terminated self-assembled monolayer. *Langmuir* **2002**, *18*, 3980–3992.
- (31) Willey, T. M.; Vance, A. L.; van Buuren, T.; Bostedt, C.; Terminello, L. J.; Fadley, C. S. Chemically transformable configurations of Mercaptohexadecanoic acid self-assembled monolayers adsorbed on Au (111). *Langmuir* **2004**, *20*, 2746–2752.
- (32) Frey, B. L.; Corn, R. M. Covalent attachment and derivatization of poly (L-lysine) monolayers on gold surfaces as characterized by polarization-modulation FT-IR spectroscopy. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3187–3193.
- (33) Kong, J.; Yu, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 549–559.
- (34) Xiao, S.-J.; Brunner, S.; Wieland, M. J. Reactions of surface amines with heterobifunctional cross-linkers bearing both succinimidyl ester and maleimide for grafting biomolecules. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 16508–16517.
- (35) Gorne-Tschelnokow, U.; Naumann, D.; Weise, C.; Hucho, F. Secondary structure and temperature behaviour of Acetylcholinesterase studies by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 1235–1242.
- (36) Adochitei, A.; Drochioiu, G. Rapid characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy. *Rev. Roum. Chim.* **2011**, *56*, 783–791.
- (37) Yang, J.; Chazalviel, J. N.; Siriwardena, A.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Szunerits, S.; Gouget-Laemmel, A. C. Quantitative assessment of the multivalent protein–carbohydrate interactions on silicon. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10340–10349.

(38) Harel, M.; Sussman, J. L. Native Monoclinic Form of Torpedo Acetylcholinesterase [online], Jun 24, 2008, Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2j3d> (accessed March 3, 2015).

(39) Milkani, E.; Lambert, C. R.; McGimpsey, W. G. Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor. *Anal. Biochem.* **2011**, *408*, 212–219.

(40) Pardo-Yissar, V.; Katz, E.; Wasserman, J.; Willner, I. Acetylcholine esterase-labeled CdS nanoparticles on electrodes: photoelectrochemical sensing of the enzyme inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 622–623.

(41) Touahir, L.; Allongue, P.; Aureau, D.; Boukherroub, R.; Chazalviel, J.-N.; Galopin, E.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Moraillon, A.; Niedziółka-Jönsson, J.; Ozanam, F.; Salvador Andresa, J.; Sam, S.; Solomon, I.; Szunerits, S. Molecular monolayers on silicon as substrates for biosensors. *Bioelectrochemistry* **2010**, *80*, 17–25.

Résumé

Ce travail de thèse a été consacré à l'immobilisation d'Acétylcholinestérase à la surface de silicium plan et de silicium poreux (SiP) pour l'étude de l'activité enzymatique par voie électrochimique et par spectroscopie UV-Vis des surfaces obtenues et ce dans la perspective de développer des dispositifs pour la détection électrochimique des organophosphorés en solution.

Les substrats de SiP mésoporeux ont été élaborés par voie électrochimique. Les surfaces de silicium H-Si(111) atomiquement planes ont été préparées dans NH_4F , et les surfaces de silicium SiHx rugueuses ont été préparées dans l'HF. Par la suite la modification de ces surfaces par l'enzyme AChE a été réalisée en suivant un procédé multi-étapes compatible avec les méthodes douces requises pour l'accrochage de ces molécules sans les endommager. Nous avons examiné en temps réel l'immobilisation de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) sur une surface activée à l'aide de spectroscopie IR en réflexion totale atténuée géométrie (ex situ et in situ).

La quantification des enzymes immobilisées a été réalisée en utilisant la spectroscopie FTIR en exploitant les deux bandes de vibrations spécifiques et dominantes (amide I et amide II) associés aux groupes amides.

L'activité enzymatique évaluée par la spectrophotométrie UV / Vis a été conservée pour les différentes surfaces préparées.

Enfin, la nouvelle méthode de la détection ampérométrique proposée est rapide, sensible et montre une bonne relation linéaire et une faible limite de détection dans la détermination de l'inhibiteur de l'enzyme. La méthode utilisée, nous a permis de déterminer la quantité des enzymes immobilisées et de déterminer la constante de Michaelis.

Abstract

This work was dedicated to the immobilization of acetylcholinesterase on plane silicon surface and porous silicon (SiP) for the study of enzyme activity by electrochemical and UV-Vis spectroscopy of the obtained surfaces and this in the purpose to develop devices for the electrochemical detection of organophosphate solution. Mesoporous SiP substrates were prepared electrochemically in HF. Silicon surfaces H-Si (111) plane atomically were prepared in NH_4F and SiHx rough silicon surfaces were prepared in HF. Then the modification of those surfaces by AChE enzyme was carried out by following a multi-step process compatible with the gentle methods required for attaching these molecules without damaging them. We examined in real time the immobilization of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) on an activated surface using IR spectroscopy in attenuated total reflection (ATR) geometry (ex situ and in situ). Quantification of immobilized enzyme was carried out using FTIR spectroscopy by exploiting two specific bands and dominant vibrations (amide I and amide II) associated with the amide groups. Enzyme activity evaluated by spectrophotometry UV / Vis was stored for different prepared surfaces.

Finally, the new method proposed amperometric detection is rapid, sensitive and shows a good linear relationship and a low detection limit in the determination of enzyme inhibitor. The method used allowed us to determine the amount of immobilized enzymes and determine the Michaelis constant.

تلخيص

خصص هذا العمل لتثبيت الأنزيم أستيلكولين أستراز على سطحي السيليكون والسليكون المسامي وذلك لدراسة نشاط هذا الأنزيم بواسطة التحليل الطيفي الأشعة فوق البنفسجية و بواسطة الكهروكيميائية للأسطح التي تم الحصول عليها وهذا بهدف تطوير أجهزة للكشف الكهروكيميائي عن الأسمدة الفوسفاتية العضوية. تم إعداد أسطح السلكون المسامية بواسطة الطريقة الكهروكيميائية وذلك بإستعمال الحمض HF, أما سطوح السيليكون المستوي و المهدرج (111) H-Si فقد أعدت بإستعمال حمض NH_4F وأعدت $SiHx$ السطوح السيليكون الخام في HF. بعد ذلك تم تعديل هذه السطوح بتثبيت انزيم أستيلكولينستراز عليها معتمدين على عملية متعددة الخطوات متوافقة مع الأساليب لطيف اللازمة لربط هذه الجزيئات دون تعرضها للتلف درسنا في الوقت الحقيقي عملية تثبيت الإنزيم (أستيلكولينستراز) على سطح مفعّل باستخدام تقنية الأشعة تحت الحمراء الطيفي FTIR (ATR) كما قمنا بتكميم عدد الأنزيمات المثبتة باستخدام نفس التقنية FTIR من خلال استغلال شريطين والاهتزازات المهمة (أميد الأول والثاني أميد) المرتبطة مع المجموعات أميدية. بإستعمال تقنية القياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية تم إثبات أن النزييمات المثبتة على مختلف الأسطح المعدة حافظت على نشاطها. وأخيراً، الطريقة الجديدة للكشف الكهروكيميائية المقترحة هي سريعة وحساسة وتبين وجود علاقة خطية جيدة وحد اكتشاف منخفض في تحديد مثبط الإنزيم. الطريقة المستخدمة سمحت لنا بتحديد كمية الإنزيمات المثبتة وتحديد ثابت ميخائيل.