

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE
Faculté de génie
Département de génie électrique et de génie informatique

DÉVELOPPEMENT D'UN BIOCAPTEUR COUPLANT LA RÉSONANCE DES PLASMONS DE SURFACE ET LA MICROCALORIMÉTRIE POUR LE SUIVI DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES À L'INTERFACE LIQUIDE/SOLIDE

Thèse de doctorat en cotutelle
Spécialité : génie électrique

Rémy BÉLAND

Jury : Paul G. CHARETTE (codirecteur Sherbrooke)
Vincent AIMEZ (codirecteur Sherbrooke)
Jean-Pierre CLOAREC (codirecteur Lyon)
Yann CHEVOLOT (codirecteur Lyon)
Thierry LIVACHE (Externe)
Luc FRÉCHETTE (Rapporteur)

Sherbrooke (Québec) Canada Novembre 2013

RÉSUMÉ

Dans un avenir proche, les dispositifs de détection médicaux miniaturisés en temps réels (lab-on-chip) seront au centre de la révolution des méthodes de diagnostics médicaux et d'identification des processus biologiques et cela, autant au niveau clinique qu'au niveau de la recherche. Pour y arriver, il est important de développer des chimies de surface stables et spécifiques, ce qui demande une compréhension des interactions intermoléculaires à l'interface liquide/solide. Pour bien comprendre ces interactions, il est important de développer des instruments adaptés à la mesure près de l'interface liquide/solide des différentes caractéristiques à identifier. Ce projet de recherche présente la conception, la fabrication et les expériences tests d'un capteur multimodal pour l'identification de processus biologiques à l'interface basés sur des technologies de résonance des plasmons de surface (SPR) et de microcalorimétrie. Ces deux technologies mises ensemble vont permettre d'effectuer des mesures de la cinétique des interactions ainsi que des caractéristiques thermodynamiques.

En premier lieu, les caractéristiques d'une interaction intermoléculaire à l'interface d'une réaction d'hybridation d'ADN furent définies afin d'en déduire un cahier des charges pour les transducteurs. Suite à cela, la conception des transducteurs microcalorimétrique et SPR furent réalisés en tenant compte des contraintes de chacun des transducteurs.

Suite à la conception théorique des différentes parties du capteur, un procédé de fabrication compatible avec les méthodes de fabrication standard de la microélectronique fut défini et testé. Afin de s'assurer de la fonctionnalité des dispositifs ainsi fabriqués, des tests de fonctionnalisation de surface furent appliqués sur les échantillons afin de tester la compatibilité du procédé de fonctionnalisation avec les méthodes de fabrication et avec une chimie de surface type.

Pour terminer, un système de mélange actif fut testé et caractérisé avec le dispositif de microcalorimétrie afin de s'assurer qu'il était possible de mélanger les fluides avec les produits biologiques pour s'assurer de la qualité de la réaction de surface.

Le système développé pourra être utilisé pour effectuer la mesure d'hybridation d'ADN à l'interface. Le système intègre deux modalités permettant la caractérisation en temps réel des interactions intermoléculaires à l'interface liquide/solide. Ce type de système permet la mesure de la cinétique de différents modèles biologiques tels que les puces à sucre encore certains récepteurs cellulaires ou la mesure de conformation moléculaire à l'interface. Des mesures d'oxydation du glucose catalysée par la glucose oxydase sont montrées.

Mots-clés : Microcalorimétrie, résonance des plasmons de surface (SPR), chimie de surface, ondes de surface, microfabrication

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Mise en contexte.....	4
1.1.1 Introduction à la biodétection.....	5
1.1.2 Transport de masse	7
1.2 Solution privilégiée.....	7
1.2.1 Choix du biorécepteur	8
1.2.2 Transducteur.....	11
1.2.3 Intérêt de la mesure couplée.....	13
1.2.4 Stratégie pour le transport de masse.....	13
1.3 Organisation du mémoire	14
CHAPITRE 2 ÉTAT DE L'ART	15
2.1 Biorécepteur.....	15
2.1.1 Principe de fonctionnalisation d'un brin monobrin d'ADN	15
2.2 Microcalorimétrie	17
2.2.1 Conduction thermique appliquée à la microcalorimétrie.....	17
2.2.2 Convection.....	20
2.2.3 Introduction à la calorimétrie.....	22
2.2.4 Transducteur à l'intérieur des calorimètres	27

2.2.5	Microcalorimètre microfabriqué	32
2.2.6	Microcalorimétrie microfabriquée pour l'analyse moléculaire	34
2.3	Résonance des plasmons de surfaces (SPR).....	34
2.3.1	Propagation d'une onde à une interface métal/diélectrique.....	35
2.3.2	Excitation des plasmons de surface	36
2.3.3	Couplage	37
2.3.4	Utilisation de capteur SPR appliquée à la détection biologique	42
2.4	Transfert de masse	44
2.4.1	Diffusion de la matière	45
2.4.2	Convection de matière	46
2.4.3	Limite de diffusion	47
2.4.4	Méthode de mélange.....	48
2.5	Conclusion	49
CHAPITRE 3 MODÉLISATION DU CAPTEUR.....		53
3.1	Modèle de l'hybridation de l'ADN et ses caractéristiques.....	53
3.1.1	Modélisation de l'hybridation pour la SPR.....	54
3.1.2	Énergie et puissance thermique dégagées lors de l'hybridation d'ADN.....	56
3.2	Impacts liés à la fonctionnalisation biomoléculaire de surface	60
3.2.1	Force de la liaison thiol-or versus avidin-biotine.....	62
3.2.2	Densité de la couche de BSA neutravidine pour la fonctionnalisation.....	63
3.2.3	Impact de la fonctionnalisation sur les modalités de mesure	64
3.3	Conception du microcalorimètre.....	67
3.3.1	Choix du transducteur pour la microcalorimétrie.....	67
3.3.2	Choix du substrat pour la fabrication du microcalorimètre.....	77
3.3.3	Intégration d'un système de calibration dans le microcalorimètre	82

3.3.4	Intérêts d'utiliser une fonctionnalisation de surface pour un calorimètre planaire	84
3.4	Résonance de plasmon de surface (SPR)	86
3.4.1	Choix du type de modulation du système SPR.....	86
3.4.2	Conséquence de la présence du système SPR sur le système microcalorimétrique	89
3.5	Utilisation d'un système actif pour effectuer le transport de masse.....	92
3.6	Conclusion.....	95
CHAPITRE 4	PROCÉDÉ DE FABRICATION (ARTICLE).....	99
4.1	Mise en contexte de l'article.....	99
4.2	Fiche d'identification de l'article du procédé de fabrication.....	104
4.2.1	Contribution de l'article à la thèse	104
4.2.2	Résumé en français de l'article.....	104
4.3	Article sur le procédé de fabrication	106
4.3.1	Abstract	106
4.3.2	Introduction.....	106
4.3.3	Materials and Methods.....	106
4.3.4	Results and Discussion	110
4.3.5	Conclusion	111
4.3.6	Acknowledgments.....	111
CHAPITRE 5	MÉTHODE DE MÉLANGE ACTIF PAR ONDES ACOUSTIQUES DE SURFACE	
	113	
5.1	Avant-propos de l'article	113
5.1.1	Microcalorimètre pour les tests de mélanges	113
5.1.2	Banc de test calorimétrique.....	114

5.2	Fiche d'identification de l'article sur le mélange actif.....	116
5.2.1	Contribution de l'article à la thèse.....	116
5.2.2	Résumé en français de l'article	116
5.3	Article	118
5.3.1	Abstract.....	118
5.3.2	Introduction	118
5.3.3	Materials and Methods.....	120
5.3.4	Result and discussion	125
5.3.5	Conclusion.....	131
5.3.6	Acknowledgements	131
5.4	Mesure Biologique.....	133
CHAPITRE 6 DISCUSSION ET CONCLUSION		137
6.1	Retour sur le cahier de charge du capteur	138
6.2	Comparaison du dispositif microcalorimétrique versus d'autres systèmes semblables.....	141
6.3	Retour sur les résultats obtenus, les résultats attendus et contributions à l'avancement.....	144
6.3.1	Résultats obtenus versus les résultats attendus.....	144
6.3.2	Contribution à l'avancement.....	145
6.4	Possibilités d'applications et améliorations possibles du dispositif.....	145
ANNEXE A DÉMONSTRATION		147
A.1	Démonstration de l'équation du flux thermique, équation (2.2)	147
A.2	Démonstration de l'équation (2.4).....	148
A.3	Démonstration de l'équation (2.5).....	150
ANNEXE B RADIATION.....		153

B.1	Radiation d'une surface vers l'ambient	154
ANNEXE C EFFET THERMOÉLECTRIQUE ET TRANSDUCTEUR DE TEMPÉRATURE ..		155
C.1	Effet thermoélectrique	155
C.1.1	Effect Seebeck	155
C.1.2	Effet Peltier	158
C.1.3	Effet Thomson.....	158
C.1.4	L'effet Joule	158
C.1.5	Bruit Johnson.....	159
C.2	Transducteur de température.....	159
C.2.1	Thermocouples.....	160
C.2.2	Résistance détectrice de température (RTD)	162
C.2.3	Thermistance	163
C.2.4	Jonction de semi-conducteur (Diode).....	164
ANNEXE D PROCÉDÉ DE FABRICATION		166
D.1	Révision.....	166
	Étapes du procédé de fabrication des guides d'ondes SPR.....	167
D.2	Préparation des substrats.....	169
D.3	Nettoyage des substrats.....	169
D.4	Formation du guide d'onde	169
D.4.1	Guide en SiO ₂	169
D.4.2	Guide en KMPR ou SU-8	170
D.4.3	Guide en KMPR.....	170
D.4.4	Guide en SU-8.....	171
D.5	Fabrication des thermopiles	171
D.5.1	Dépôt du chrome	171

D.5.2	Métallisation du chrome.....	171
D.5.3	Photolithographie du Chrome (Photomasque 1).....	171
D.5.4	Gravure du chrome.....	172
D.5.5	Dépôt du Nickel.....	172
D.5.6	Photolithographie du Nickel 1, ouverture du marque d'alignement (Photomasque 6).....	172
D.5.7	Seconde métallisation du Nickel	173
D.5.8	Soulèvement.....	173
D.5.9	Photolithographie du Nickel 2, gravure du Nickel (Photomasque 2 version 2) 173	
D.5.10	Gravure du Nickel	173
D.6	Formation des plots de réaction SPR et des connecteurs	174
D.6.1	Dépôt de l'or pour les connexions	174
D.6.2	Photolithographie de l'or (PhotoMasque 3)	174
D.6.3	Métallisation de l'or.....	174
D.6.4	Soulèvement.....	175
D.7	Passivation.....	175
D.8	Formation des plots de réactions de la calorimétrie	176
D.8.1	Photolithographie de l'or pour la calorimétrie (PhotoMasque 4).....	176
D.8.2	Métallisation de l'or.....	176
D.8.3	Soulèvement.....	176
D.9	Ouverture des connecteurs.....	177
D.9.1	Photolithographie d'ouverture des connecteurs (PhotoMasque5).....	177
D.9.2	Gravure du SiO ₂	177
D.10	Photomasques.....	178

D.10.1	Photomasque 1.....	178
D.10.2	Photomasque 2.....	179
D.10.3	Photomasque 3.....	179
D.10.4	Photomasque 4.....	180
D.10.5	Photomasque 5.....	180
D.10.6	Photomasque 6.....	181
ANNEXE E PROTOCOLE DE FONCTIONNALISATION		182
E.1	Introduction	182
E.2	Information générale	182
E.3	Protocole.....	182
E.3.1	Préparation des échantillons	182
E.3.2	Formation de la monocouche de BSA	183
E.3.3	Formation de la couche de neutravidine.....	183
E.3.4	Greffe de l'ADN sonde	184
E.3.5	Détection des brins d'ADN ciblent par hybridation	185
ANNEXE F DÉTAIL DE LA SIMULATION COMSOL.....		186
ANNEXE G MOLÉCULE D'ADN.....		187
ANNEXE H VALEURS PHYSIQUES.....		189
LISTE DES RÉFÉRENCES.....		191

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : WOLFGANG PAULI (1900-1958), LAURÉAT DU PRIX NOBEL DE PHYSIQUE EN 1945.....	1
FIGURE 1.2 REPRÉSENTIONS DE L'INTERACTION ENTRE DEUX TYPES DE MOLÉCULE DANS UN VOLUME CONSTITUÉ PAR UN FLUIDE CONTINU.	2
FIGURE 1.3 REPRÉSENTATION D'UNE INTERACTION INTERMOLÉCULAIRE PRÈS D'UNE INTERFACE ENTRE UN SOLIDE ET UN FLUIDE	3
FIGURE 1.4 : SCHÉMA DE CONCEPT D'UN SYSTÈME DE DÉTECTION INTERMOLÉCULAIRE À L'INTERFACE SOLIDE LIQUIDE	5
FIGURE 1.5 SCHÉMA D'UN BRIN D'ADN [31]	9
FIGURE 1.6 RECONNAISSANCE ENTRE DEUX BRINS D'ADN COMPLÉMENTAIRES [32]	10
FIGURE 1.7 BIORÉCEPTEUR CONSTITUÉ DE BRINS D'ADN (SS-ADN) IMMOBILISÉS À LA SURFACE DU TRANSDUCTEUR	10
FIGURE 1.8 BIOCAPTEUR AVEC LES DEUX TRANSDUCTEURS, MICROCALORIMÉTRIE ET SPR AVEC LE MÊME BIORÉCEPTEUR.	12
FIGURE 1.9 CONCEPT FINAL DU BIOCAPTEUR AVEC LE BIORÉCEPTION CONSTITUÉ DE BRINS D'ADN ET DEUX TRANSDUCTEURS	13
FIGURE 2.1 ILLUSTRATION D'UNE CHAÎNE DE <i>N</i> -ALKANETHIOL (<i>N</i> EST LE NOMBRE DE MOLÉCULES DE CHARBONNE DE LA CHAÎNE) [43]	16
FIGURE 2.2 SCHÉMA MONTRANT UNE SURFACE D'OR FONCTIONNALISÉ PAR DES BRINS D'ADN (SS-ADN) SIMPLE GREFFÉ À LA SURFACE PAR DES <i>N</i> -ALKANETHIOL.	16
FIGURE 2.3 SCHÉMA MONTRANT UNE SURFACE D'OR FONCTIONNALISÉE PAR DES BRINS D'ADN BIOTINILISÉE (SS-ADN-BIOTINE) SIMPLE IMMOBILISÉS SUR LA SURFACE PAR L'ENTREMISE D'UN COMPLEXE BSA-BIOTINE-NEUTRAVIDINE	17
FIGURE 2.4 REPRÉSENTATION D'UN SYSTÈME AVEC PRODUCTION DE CHALEUR EN RÉGIME PERMANENT.	19
FIGURE 2.5 REPRÉSENTATION DU PRINCIPE DE LA CONVECTION	21
FIGURE 2.6 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UN CALORIMÈTRE AVEC LA CHAMBRE CALORIMÉTRIQUE (CC) SOIT LE LIEU DE LA RÉACTION THERMIQUE ET LA GAINÉ THERMOSTATÉE SOIT LA PARTIE QUI ISOLE LE CALORIMÈTRE DE L'ENVIRONNEMENT	23
FIGURE 2.7 SIGNAL THÉORIQUE D'UN CALORIMÈTRE ISOTHERME SUITE À UNE RÉACTION EXOTHERMIQUE.	26
FIGURE 2.8 MESURE CALORIMÉTRIQUE RÉELLE RÉALISÉE POUR UNE ÉVAPORATION DE 5 μ L.....	27
FIGURE 2.9 REPRÉSENTATION D'UN THERMOCOUPLE.....	28
FIGURE 2.10 SCHÉMA D'UNE THERMOPILE CONSTITUÉ DE TROIS PAIRES OU TROIS THERMOCOUPLES.....	29
FIGURE 2.11 MICROCALORIMÈTRE DE XESOR POUR DES MESURES EN MILIEUX AQUEUX [66]	33
FIGURE 2.12 EXPLICATION DU PRINCIPE DU CALORIMÈTRE À MEMBRANE	33
FIGURE 2.13 REPRÉSENTATION DE L'ONDE ÉVANESCENTE SPR À L'INTERFACE MÉTAL/DIÉLECTRIQUE	35
FIGURE 2.14 REPRÉSENTATION DE L'EXCITATION DES PLASMONS PAR UNE ONDE INCIDENTE.....	36
FIGURE 2.15 GRAPHIQUE REPRÉSENTANT L'INDICE EFFECTIF SPR EN FONCTION DE LA LONGUEUR D'ONDE	37
FIGURE 2.16 EXEMPLE DE COUPLAGE PAR PRISME	38
FIGURE 2.17 RÉFLECTIVITÉ (A) ET CHANGEMENT DE LA PHASE (B) EN FONCTION DE L'ANGLE POUR LE SYSTÈME MONTRÉ À LA FIGURE 2.16.	40
FIGURE 2.18 RÉFLECTIVITÉ EN FONCTION DE LA LONGUEUR POUR UNE MESURE SPR LORSQUE L'ANGLE EST CONSTANT	41
FIGURE 2.19 REPRÉSENTATION D'UN GUIDE D'ONDE QUI EXCITE DES PLASMONS DE SURFACE À PARTIR D'UN MODE GUIDÉ.	42

FIGURE 2.20 REPRÉSENTATION DU PRINCIPE DE L'UTILISATION DE LA SPR	43
FIGURE 2.21 RÉFLECTIVITÉ DE L'ONDE POUR DEUX INDICES DE RÉFRACTION DU DIÉLECTRIQUE JUSTE AU DESSUS DU MÉTAL	44
FIGURE 2.22 EXEMPLE DU PRINCIPE DE DIFFUSION	46
FIGURE 2.23 REPRÉSENTATION DE L'EFFET DE BORD SUR L'ÉQUATION DE DIFFUSION À DIFFÉRENTS MOMENTS DANS LE TEMPS (1) INITIAL (2), (3) ET (4) INTERMÉDIAIRE ET (5) FINAL [89]	48
FIGURE 2.24 DIAGRAMME MONTRANT LA GÉNÉRATION D'ONDES ACOUSTIQUES DE SURFACE ET L'INTERACTION DE CELLE-CI AVEC UN FLUIDE [93].....	49
FIGURE 2.25 RÉCAPITULATIF DE SYSTÈME COMPLET AVEC LES CARACTÉRISTIQUES	52
FIGURE 3.1 SCHÉMA UTILISÉ POUR LA SIMULATION DE L'HYBRIDATION SPR ET L'ANALYSE CALORIMÉTRIQUE	54
FIGURE 3.2 RÉSULTAT DE LA SIMULATION DE LA RÉSONANCE SPR POUR L'ADN	55
FIGURE 3.3 REPRÉSENTATION DU MODÈLE DE L'HYBRIDATION DE CIBLE D'ADN À DES SONDAS D'ADN IMMOBILISÉES SUR UNE SURFACE [102]	58
FIGURE 3.4 PUISSANCE DE L'HYBRIDATION POUR LES DEUX BRINS TEST D'ADN EN FONCTION DU RAYON D'UNE AIRE DE RÉACTION RONDE	59
FIGURE 3.5 REPRÉSENTATION DU BIORÉCEPTEUR AVEC LA BSA, LA NEUTRAVIDINE ET L'ADN.....	60
FIGURE 3.6 ÉTAPE DE LA FONCTIONALISATION DU BIORÉCEPTEUR	61
FIGURE 3.7 SCHÉMA DE COUVERTURE DE LA BSA SUR UNE LAME D'OR.....	64
FIGURE 3.8 SCHÉMA DU BIORÉCEPTEUR TEL QUE CHOISI AVEC LA HAUTEUR DES DIFFÉRENTES PARTIES	65
FIGURE 3.9 SIMULATION DE LA RÉPONSE SPR AVANT ET APRÈS HYBRIDATION POUR UNE EXCITATION EN LUMIÈRE BLANCHE	66
FIGURE 3.10 AMPLITUDE DU CHAMP ÉVANESCENT À LA RÉSONANCE SPR POUR LE SYSTÈME SPR D'INTÉRÊTS	66
FIGURE 3.11 UTILISATION D'UNE THERMOPILE POUR EFFECTUER UNE MESURE CALORIMÉTRIQUE SANS ZONE DE RÉFÉRENCE	69
FIGURE 3.12 UTILISATION D'UNE THERMOPILE POUR EFFECTUER UNE MESURE CALORIMÉTRIQUE AVEC UNE ZONE DE RÉFÉRENCE.....	69
FIGURE 3.13 COEFFICIENTS DE SEEBECK, OR [115], NICKEL [116], CHROME [117] EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE	72
FIGURE 3.14 TAUX DE SIGNAL SUR BRUIT DE L'ÉTUDE DE CAS POUR UNE THERMOPILE FAITE AVEC UN COUPLE CR-NI ET UNE THERMOPILE FAITE AVEC LE COUPLE AU-NI.	74
FIGURE 3.15 PROFILE TYPIQUE DE LA TEMPÉRATURE ENTRE LES DEUX JONCTIONS D'UNE THERMOPILE DANS UN CALORIMÈTRE ISOTHERME DIFFÉRENTIEL PLAN EN RÉGIME PERMANENT POUR UNE RÉACTION THERMIQUE SUR LA JONCTION $T_{IN_RÉACT.}$	75
FIGURE 3.16 SIMULATION DES PROFILS DE TEMPÉRATURE POUR UN CALORIMÈTRE SUR UN SUBSTRAT DE VERRE DE 200 μM POUR DIFFÉRENTES PUISSANCES THERMIQUES DÉGAGÉES DANS LA ZONE DE RÉFÉRENCE.....	76
FIGURE 3.17 SCHÉMA DU CAPTEUR AVEC LE MICROCALORIMÈTRE ISOTHERME DIFFÉRENTIEL PLAN, AVEC LA CHAMBRE DE RÉFÉRENCE ET LA CHAMBRE DE RÉACTION. LA THERMOPILE EST SUR UN SUBSTRAT DE VERRE DE 200 μM	80
FIGURE 3.18 SIMULATION PAR ÉLÉMENT DE L'AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE DU MICROCALORIMÈTRE POUR UNE HYBRIDATION D'ADN À L'INTERFACE ENTRE LE SUBSTRAT DU MICROCALORIMÈTRE ET UNE CELLULE FLUIDIQUE CONSTITUÉE D'EAU.	81
FIGURE 3.19 PROFIL DE TEMPÉRATURE EN RÉGIME PERMANENT DE L'ÉLEVATION DE TEMPÉRATURE À L'INTERFACE DU MICROCALORIMÈTRE (AU DESSUS DU SUBSTRAT DE VERRE) POUR UNE HYBRIDATION D'ADN.	82

FIGURE 3.20 SCHÉMA FINAL DU MICROCALORIMÈTRE POUR LA MESURE DE L'HYBRIDATION DE L'ADN À L'INTERFACE LIQUIDE/SOLIDE. IL EST POSSIBLE DE VOIR LES DIFFÉRENTES PARTIES DANS LA CONFIGURATION DE CALORIMÈTRE PLAN.	84
FIGURE 3.21 REPRÉSENTATION DE L'AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE À L'INTERFACE POUR UNE RÉACTION À L'INTERFACE DU SUBSTRAT ET POUR LA MÊME RÉACTION, MAIS CETTE FOIS DANS LE VOLUME DE LA CHAMBRE.	85
FIGURE 3.22 SCHÉMA DU SYSTÈME SPR SPECTROSCOPIQUE PROPOSÉ POUR COUPLER LA MICROCALORIMÉTRIE.	87
FIGURE 3.23 SCHÉMA 3D DU SYSTÈME SPR TEL QUE MONTÉ SUR LE BANC DE TEST. SEULEMENT LES PARTIES QUI SONT À L'INTÉRIEUR DE LA GAINÉ THERMOSTATÉE SONT MONTRÉES ICI.	88
FIGURE 3.24 SPECTRE SPR DU SYSTÈME SPR SPECTROSCOPIQUE POUR DIFFÉRENTE HUILE D'INDICE.	89
FIGURE 3.25 SIMULATION À ÉLÉMENTS FINIS DE L'AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE DUE À UNE HYBRIDATION D'ADN POUR UN CALORIMÈTRE AVEC LE PRISME SPR ET SANS LE PRISME SPR.	90
FIGURE 3.26 AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE À LA SURFACE DU MICROCALORIMÈTRE POUR UNE HYBRIDATION D'ADN, POUR LA CONFIGURATION SANS PRISME DE COUPLAGE SPR ET AVEC PRISME DE COUPLAGE SPR.	91
FIGURE 3.27 SCHÉMA REPRÉSENTATIF DES DEUX POSSIBILITÉS POUR LE SYSTÈME SPR.	92
FIGURE 3.28 SCHÉMA DE CONCEPT DU SYSTÈME COMPLET.	93
FIGURE 3.29 SCHÉMA REPRÉSENTATIF DU DISPOSITIF CONÇUS.	95
FIGURE 4.1 SCHÉMA DU SYSTÈME SPR DE L'ÉCOLE CENTRALE DE LYON.	101
FIGURE 4.2 MESURE TYPE EFFECTUÉE PAR LE SYSTÈME SPR « FANBEAM » DE LYON.	102
FIGURE 4.3 SIGNAL SPR OBTENU À PARTIR DU SYSTÈME SPR « FANBEAM » DE L'ÉCOLE CENTRALE.	103
FIGURE 4.4 CROSS-SECTION OF THE WSPR WAVEGUIDE AND SPR SENSOR PADS.	107
FIGURE 4.5 (COLOR ONLINE) CROSS-SECTION OF THE HYBRID SENSOR WITH WSPR WAVEGUIDE AND SPR SENSING PADS IN GREY AND THE CALORIMETRIC DEVICE IN COLOR.	108
FIGURE 4.6 PICTURE OF INTEGRATED BIOSENSOR DEVICE.	109
FIGURE 4.7 SUMMARY CHART OF THE FABRICATION PROCESS.	109
FIGURE 4.8 AVIDIN/NEUTRAVIDIN PAIR USED AS A MODEL FOR VALIDATING SPR TRANSDUCTION.	110
FIGURE 4.9 SPR MONITORING OF MOLECULAR INTERACTION SPR MONITORING OF MOLECULAR INTERACTION.	111
FIGURE 5.1 SCHÉMA DU MICROCALORIMÈTRE UTILISÉ POUR EFFECTUER LA PREUVE DE CONCEPT DU SYSTÈME DE MÉLANGE PAR ONDES ACOUSTIQUES DE SURFACE.	114
FIGURE 5.2 SCHÉMA DU BANC DE TEST UTILISÉ POUR LA PREUVE DE CONCEPT DU SYSTÈME DE MÉLANGE UTILISANT LES ONDES ACOUSTIQUES DE SURFACE.	114
FIGURE 5.3 SIDE-VIEW SCHEMATIC DIAGRAM OF THE DEVICE SHOWING THE GLASS AND LiNbO ₃ SUBSTRATES WITH THE WATER FILM IMPEDANCE MATCHING LAYER, AS WELL AS THE INTERDIGITATED TRANSDUCER ELECTRODES (IDT)	121
FIGURE 5.4 MODELING RESULTS FOR A 10 µL DROPLET OF 2.5 M SUCROSE AQUEOUS SOLUTION.	126
FIGURE 5.5 THERMAL CAMERA MEASUREMENTS OF THE TEMPERATURE PERTURBATION PROFILE IN 10 µL DROPLETS RESULTING FROM A 30 dBm SAW EXCITATION PULSE TRAIN WITH A PERIOD OF 30s AND A DUTY CYCLE OF 1/30 (1 SEC ON AND 29 SEC OFF). ..	126
FIGURE 5.6 NUMERICAL SIMULATION IN COMSOL OF TEMPERATURE RELAXATION TIME IN A 10 µL DROPLET.	127

FIGURE 5.7 THERMOPILE DIFFERENTIAL VOLTAGE MEASUREMENTS OF PARASITIC HEAT INJECTED INTO THE FLUID RESULTING FROM SAW ACTION.....	128
FIGURE 5.8 THERMOPILE DIFFERENTIAL VOLTAGE MEASUREMENTS FROM TWO SUCROSE DISSOLUTION EXPERIMENTS, WITH AND WITHOUT SAW MIXING, AS WELL AS A NEGATIVE CONTROL (IDENTICAL DROPLETS, NO REACTION, WITH SAW).....	129
FIGURE 5.9 NORMALISED CUMULATIVE THERMAL ENERGY (HEAT) RELEASED BY A SUCROSE DILUTION AS A FUNCTION OF TIME, WITH AND WITHOUT SAW MIXING. THE CURVES ARE OBTAINED BY INTEGRATING MEASUREMENTS AS SHOWN IN FIG.6.....	130
FIGURE 5.10 TROIS RÉPÉTITIONS DE LA MESURE DE LA PUISSANCE DE LA RÉACTION D' OXYDATION DU GLUCOSE EN UTILISANT LA GLUCOSE OXYDASE COMME CATALYSEUR.	134
FIGURE 5.11 ÉNERGIE NORMALISÉE ACCUMULÉE DUE À LA RÉACTION D' OXYDATION DU GLUCOSE AVEC DE LA GLUCOSE OXYDASE. CETTE FIGURE EST OBTENUE EN INTÉGRANT LES PUISSANCES DE LA FIGURE 5.10.	135
FIGURE 6.1 SCHÉMA DU DISPOSITIF FINAL TEL QUE FABRIQUÉ.	138
FIGURE 6.2 PHOTO DU DISPOSITIF FINAL, IL EST POSSIBLE DE VOIR TROIS THERMOPILES SUR CETTE PHOTO.	138
FIGURE A.1 REPRÉSENTATION DU FLUX DE CHALEUR DÛ À LA CONDUCTION	147
FIGURE A.2 PROFIL DE TEMPÉRATURE POUR UN SYSTÈME UNIDIMENSIONNEL	149
FIGURE A.3 PROFIL DE TEMPÉRATURE À DIFFÉRENTS MOMENTS LORSQU'UN DOMAINE UNIDIMENSIONNEL EST INITIALEMENT AU REPOS (A), AUGMENTATION DE LA TEMPÉRATURE POUR UNE POSITION EN FONCTION DU TEMPS (B)	152
FIGURE B.1 SPECTRE DE L'ÉMISSION DU SOLEIL EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE. LA FIGURE EST SOUS LICENCE GNU FDL	153
FIGURE C.1 REPRÉSENTATION DU PRINCIPE DE L'EFFET SEEBECK	155
FIGURE C.2 DIAGRAMME D'UNE PILE	156
FIGURE C.3 SCHÉMA DU POTENTIEL DES PAIRES MÉTAUX/ÉLECTROLYTE D'UNE PILE	156
FIGURE C.4 REPRÉSENTATION DES POTENTIELS ÉLECTROCHIMIQUES DE DEUX MÉTAUX POUR DEUX TEMPÉRATURES	157
FIGURE C.5 COEFFICIENT DE SEEBECK DE DIFFÉRENTS MÉTAUX.....	157
FIGURE C.6 REPRÉSENTATION D'UN THERMOCOUPLE	160
FIGURE C.7 SCHÉMA D'UNE THERMOPILE CONSTITUÉE DE TROIS PAIRES OU TROIS THERMOCOUPLES.....	162
FIGURE C.8 MÉTHODE DE MESURE DES RÉSISTANCES THERMIQUES	162
FIGURE C.9 VALEUR DE L'IMPÉDANCE DE THERMISTANCE EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE [157]	164
FIGURE C.10 TRANSISTOR BIPOLAIRE EN CONFIGURATION POUR LA MESURE DE LA TEMPÉRATURE.....	165
FIGURE D.1 RÉSUMÉ DU PROCÉDÉ DE FABRICATION.....	168
FIGURE D.2 : SCHÉMA DU GUIDE D'ONDE EN SiO ₂	170
FIGURE D.3 : GUIDE D'ONDE EN RÉSINE (KMPPR OU SU-8).....	171
FIGURE D.4 : FORMATION DES THERMOPILES	174
FIGURE D.5 : FORMATION DES PLOTS D'OR POUR LE SPR.....	175
FIGURE D.6 : PASSIVATION DES THERMOPILES	175
FIGURE D.7 : DÉPÔT DES PLOTS POUR LA CALORIMÉTRIE.....	177
FIGURE D.8 : OUVERTURE DES CONNECTEURS	177

FIGURE D.9 : PHOTOMASQUE 1 (CHROME, CHAMP CLAIR)	178
FIGURE D.10 : PHOTOMASQUE 2 (NICKEL, CHAMP CLAIR)	179
FIGURE D.11 : PHOTOMASQUE 3 (OR, CHAMP FONCÉ)	179
FIGURE D.12 : PHOTOMASQUE 4 (OR, CHAMP FONCÉ)	180
FIGURE D.13 PHOTOMASQUE 5 (OUVERTURE DES PLOTS, CHAMP FONCÉ)	180
FIGURE D.14 PHOTMASQUE 6 (OUVERTURE DES MARQUES D'ALIGNEMENT POUR LE NICKEL)	181
FIGURE E.1 ÉCHANTILLONS DE DÉPART	182
FIGURE E.2 : ÉCHANTILLON AVEC LA MONOCOUCHE DE BSA-BIOTINE	183
FIGURE E.3 : FORMATION DE LA COUCHE DE NEUTRAVIDINE	184
FIGURE E.4 : GREFFE DE L'ADN SONDE	184
FIGURE E.5 : DÉTECTION D'ADN CIBLE PAR HYBRIDATION	185
FIGURE F.1 SCHÉMA DU SYSTÈME SIMULÉ AVEC LES DIFFÉRENTS DOMAINES ET CONDITION LIMITE	186
FIGURE G.1 REPRÉSENTATION D'UNE MOLÉCULE D'ADN	187
FIGURE G.2 RECONNAISSANCE ENTRE DEUX OLIGONUCLÉOTIDES COMPLÉMENTAIRES [32]	188

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1 EXEMPLES DE DIFFÉRENTS TYPES DE TRANSDUCTION UTILISÉ DANS LE DOMAINE DES BIOCAPTEURS [14]	6
TABLEAU 2.1 VALEUR TYPIQUE DES COEFFICIENTS DE TRANSFERT THERMIQUE POUR LA CONVECTION	21
TABLEAU 2.2 DIFFÉRENTS MODES CALORIMÉTRIQUES.....	23
TABLEAU 2.3 LES TROIS DIFFÉRENTES FAMILLES DE CALORIMÈTRE AVEC LE TYPE DE MESURE POUR CHACUNE DES FAMILLES AINSI QUE L'APPLICABILITÉ DES DIFFÉRENTS TRANSDUCTEURS UTILISÉS DANS LES MICROCALORIMÈTRES.....	32
TABLEAU 2.4 CAHIER DE CHARGE DU MICROCALORIMÈTRE	49
TABLEAU 2.5 CAHIER DE CHARGE DU SYSTÈME SPR	50
TABLEAU 2.6 CAHIER DE CHARGE DU SYSTÈME DE TRANSPORT DE MASSE.....	50
TABLEAU 2.7 RISQUES ASSOCIÉS À LA RÉALISATION DU SYSTÈME DONT IL DEVRAIT ÊTRE TENU COMPTE DANS LA RÉALISATION DU PROJET	51
TABLEAU 3.1 SÉQUENCES D'ADN UTILISÉES LORS DE LA MODÉLISATION.....	54
TABLEAU 3.2 PARAMÈTRES PHYSIQUES DES DIFFÉRENTES PARTIES DU MODÈLE UTILISÉ POUR LA SIMULATION SPR (VOIR FIGURE 3.1)	55
TABLEAU 3.3 MODÉLISATION DES PARAMÈTRES THERMODYNAMIQUES DE L'HYBRIDATION DE L'ADN DES DEUX GÈNES UTILISÉS COMME MODÈLES POUR LA CONCEPTION DU BIOCAPTEUR	56
TABLEAU 3.4 PARAMÈTRES UTILISÉS POUR DÉTERMINER LE TAUX D'HYBRIDATION	58
TABLEAU 3.5 LIMITE DE DÉTECTION DE CHACUNE DES MODALITÉS POUR LE SYSTÈME	60
TABLEAU 3.6 DIFFÉRENCE DE LA MESURE SPR DES DEUX TYPES DE FONCTIONNALISATION POUR UN SYSTÈME SPR EXCITÉ EN LUMIÈRE BLANCHE À UN ANGLE DE 75 °	65
TABLEAU 3.7 TABLE DES COEFFICIENTS DE SEEBECK POUR DIFFÉRENTS MATÉRIAUX [114] À 300 K.....	71
TABLEAU 3.8 RÉSISTIVITÉ DES PRINCIPAUX MÉTAUX DISPONIBLES À L'UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE	73
TABLEAU 3.9 RÉCAPITULATIF DES DIFFÉRENTES CARACTÉRISTIQUES DES MATÉRIAUX QUI FURENT CONSIDÉRÉS POUR LA FABRICATION DU MICROCALORIMÈTRE.....	79
TABLEAU 3.10 RÉSUMÉ DES CHOIX IMPORTANTS POUR LA CONCEPTION DU MICROCALORIMÈTRE.....	86
TABLEAU 3.11 RÉSUMÉ DES CHOIX DE CONCEPTION DU BIORÉCEPTEUR.....	95
TABLEAU 3.12 RÉSUMÉ DES CHOIX DE CONCEPTION DU MICROCALORIMÈTRE	96
TABLEAU 3.13 RÉSUMÉ DES CHOIX DE CONCEPTION POUR LA SPR.....	96
TABLEAU 3.14 RÉSUMÉ DES CHOIX POUR LE SYSTÈME DE MÉLANGE.....	96
TABLEAU 5.1 RÉSUMÉ DE L'ÉNERGIE DÉGAGÉE LORS DE LA RÉACTION D'OXYDATION DU GLUCOSE.....	133
TABLEAU 6.1 CAHIER DE CHARGE DU MICROCALORIMÈTRE	139
TABLEAU 6.2 CAHIER DE CHARGE DU SYSTÈME SPR	139
TABLEAU 6.3 CAHIER DE CHARGE DU SYSTÈME DE TRANSPORT DE MASSE.....	140
TABLEAU 6.4 RISQUES ASSOCIÉS À LA RÉALISATION DU SYSTÈME DONT IL DEVRAIT ÊTRE TENU COMPTE DANS LA RÉALISATION DU PROJET	140

TABEAU 6.5 COMPARAISON DES CARACTÉRISTIQUES DU SYSTÈME CALORIMÉTRIQUE AVEC LES GROUPES ACADÉMIQUES [20,59,60] ET D'UN DISPOSITIF COMMERCIAL[67].....	143
TABEAU C.1 RÉCAPITULATIF DES DIFFÉRENTS TRANSDUCTEURS DE TEMPÉRATURES	159
TABEAU C.2 REPRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS THERMOCOUPLES DISPONIBLE SUR LE MARCHÉ	161
TABEAU D.1 RÉSUMÉ DES ÉTAPES DE FABRICATION	167
TABEAU D.2 FORMATION DES COUCHES DE SiO ₂ POUR LA FORMATION DU GUIDE D'ONDE	169
TABEAU H.1 VALEUR D'INDICE DE RÉFRACTION DE L'OR	189
TABEAU H.2 VALEUR DE L'INDICE DE RÉFRACTION DU CHROME.....	190

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

« God made the bulk; the surface was invented by the devil. »



Figure 1.1 : Wolfgang Pauli (1900-1958), lauréat du prix Nobel de physique en 1945¹

¹ photo de Wikipedia (http://en.wikipedia.org/wiki/Wolfgang_Pauli)

La citation de Pauli exprime bien l'état d'esprit de cette thèse. Par surface, Pauli voulait possiblement dire l'interface, soit une interface à la limite d'un solide et d'un fluide. Dans un fluide continu, lorsque des molécules interagissent, celles-ci ne voient que le fluide autour d'elles. La figure 1.2 montre deux types de molécule dans un fluide qui sont en mesure d'interagir entre elles. Dans ce cas, les deux types de molécule vont agir selon leurs interactions avec le fluide, les autres molécules et la distance entre elles. La distance entre des molécules dans un fluide peut être assimilée à la concentration.

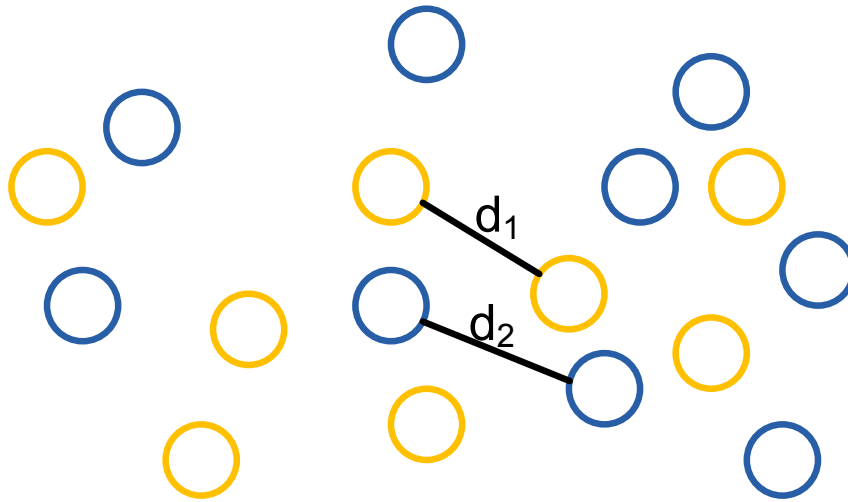


Figure 1.2 Représentations de l'interaction entre deux types de molécule dans un volume constitué par un fluide continu.

Est-ce que les interactions sont aussi simples à l'interface? Voici un cas de figure où les deux mêmes molécules doivent interagir entre elles, mais cette fois près d'une interface. Dans ce cas, les molécules ne voient plus seulement un fluide continu autour d'elles, mais un fluide, un solide, une interface et les distances entre les molécules, la figure 1.3 montre cette situation. Expliquer, comprendre et prévoir les interactions à l'interface est plus complexe versus des interactions dans un milieu continu puisque les interactions à l'interface sont reliées à la nature du fluide, la nature du solide et la nature des molécules mises en cause. La nature des interactions entre le solide et le fluide, entre le solide et les molécules, entre les molécules et le fluide et entre les différentes molécules doivent également être prises en cause. De plus, la recherche scientifique s'est intéressée traditionnellement à la compréhension des interactions en milieu continu (volume) plutôt qu'aux interfaces.

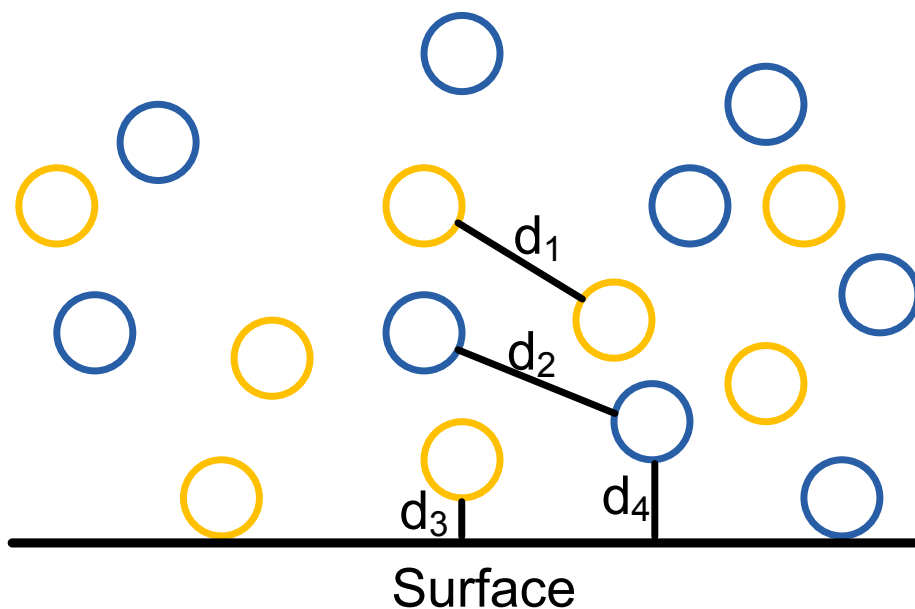


Figure 1.3 Représentation d'une interaction intermoléculaire près d'une interface entre un solide et un fluide

Malgré l'opinion de Pauli, il est très intéressant de comprendre les interactions intermoléculaires à l'interface liquide/solide, car celles-ci sont directement impliquées dans la mise en œuvre des nouveaux dispositifs de détection biologique intégrés. Ces systèmes de détection miniaturisés en temps réel « *lab-on-chip* » sont au centre de la révolution de l'identification des processus biologiques [1–3]. Autant au niveau du diagnostic clinique [4], des procédés de traitement des eaux [5], de l'agroalimentaire [6,7] et des procédés industriels. Le bon fonctionnement de ce type de dispositif est directement relié à la maîtrise des interactions intermoléculaires à l'interface liquide/solide². À l'interface liquide/solide, les molécules vont interagir de manière différente comparativement à un milieu continu. Cela provient des effets de bord provoqués par l'interface. L'interface devrait dès lors être considérée comme le lieu de la réaction. Les caractéristiques des réactions à l'interface sont mal connues et affectent de manière dramatique la réalisation de la réaction. Le développement de chimies de surfaces hautement spécifiques, stables et simples de mise en œuvre est la clé pour être en mesure de réaliser des détections à l'interface.

² L'interface liquide/solide est la surface séparant la partie solide de la partie liquide

L'objet de cette thèse est le développement d'un système de caractérisation des interactions intermoléculaires à l'interface liquide/solide pour l'étude de divers phénomènes moléculaires et biologiques à l'interface. Le système devait être en mesure d'identifier les caractéristiques de cinétique et de thermodynamique en temps réel et sans marquage pour des interactions intermoléculaires telles que l'hybridation de brin d'ADN.

Le but de cette thèse n'est pas le développement d'un biocapteur pour le diagnostic, mais le développement d'un instrument de caractérisation de diverses interactions intermoléculaires à l'interface liquide/solide dans le but de pouvoir utiliser ce savoir pour concevoir les prochaines générations de biocapteur utilisant des surfaces fonctionnalisées. Ce type d'étude est essentiel dans le développement de capteurs utilisant des chimies de surface.

1.1 Mise en contexte

La figure 1.4 montre le schéma de concept d'un système de suivi d'interaction intermoléculaire à l'interface liquide/solide avec les différents concepts d'importance qui vont être traités dans cette thèse afin d'arriver à un système complet qui pourra être utilisé. Le schéma montre la différence entre la partie chimique/biologique (Biorécepteur) et la partie électronique (Transducteur), ce sont ces deux parties mises ensemble qui peuvent être considérées comme un biocapteur. Il est possible de voir le phénomène de transfert de masse à une interface. Ce phénomène est très important particulièrement lors de la reconnaissance intermoléculaire à l'interface liquide/solide puisqu'il va être important de s'assurer qu'il est possible que les cibles soient mises en contact avec les sondes du biocapteur. Les travaux effectués dans cette thèse n'ont pas pour but de développer un biorécepteur et un transducteur, mais bien le développement d'un système intégré incluant un biorécepteur, un transducteur et une méthode d'analyse et d'interprétation du signal. La distinction est importante puisque chacune des parties fut conçue pour être intégrée dans un tout et non pas pour être efficace individuellement.

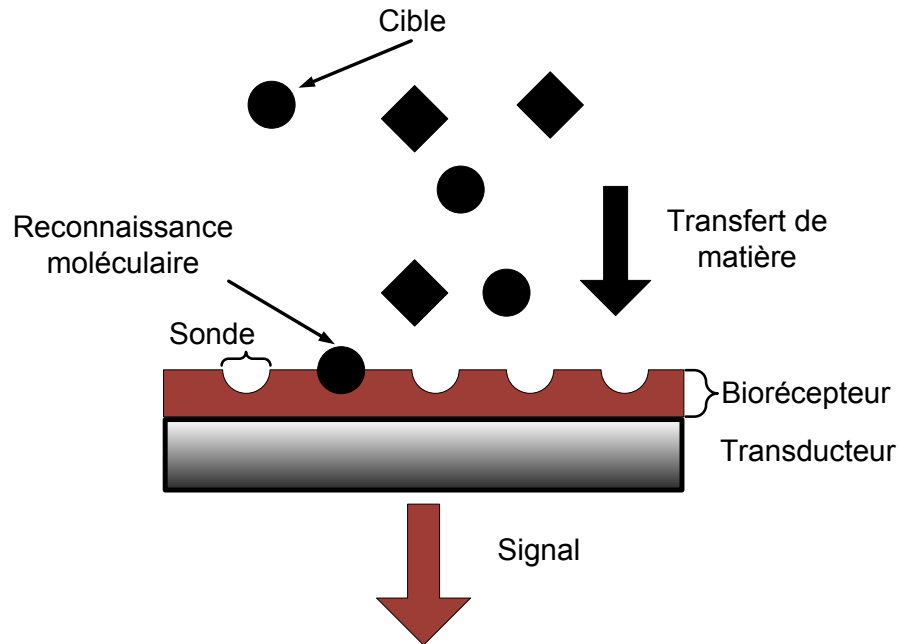


Figure 1.4 : Schéma de concept d'un système de détection intermoléculaire à l'interface solide liquide

Le système fut pensé et conçu afin d'avoir la capacité de mesurer les interactions entre différentes molécules biologiques. Nonobstant cela, il est possible de mesurer des interactions de molécule non biologique en modifiant le biorécepteur du système.

1.1.1 Introduction à la biodétection

Depuis l'invention du premier biocapteur par Leland Clark en 1953 [8] pour mesurer le taux d'oxygène dans le sang, d'énormes avancées furent réalisées dans ce domaine. Les biocapteurs sont utilisés aujourd'hui dans plusieurs domaines, tels que la recherche [9], le diagnostic clinique [10–13], l'agroalimentaire [6]. Un biocapteur a pour fonction de convertir un phénomène biologique, chimique ou physicochimique spécifique en signal interprétable (habituellement électrique). Les biocapteurs sont composés de deux différents éléments;

- Un biorécepteur (partie en rouge sur la figure 1.4)
- Un transducteur (partie en gris sur la figure 1.4)

Le biorécepteur :

Le biorécepteur est la partie du biocapteur qui interagit avec l'analyte ou la cible d'intérêt de manière spécifique. Il est composé de molécules, les sondes, qui ont la caractéristique

de réagir ou de se lier à une seconde molécule, la cible. Par exemple pour une détection d'un fragment d'ADN, le biorécepteur pourrait être composé du complémentaire de cet ADN. Habituellement les molécules qui composent le biorécepteur sont immobilisées sur le transducteur pour s'assurer d'une sensibilité maximale [14].

La réaction entre le biorécepteur et l'analyte se réalise par un appariement entre les sondes et les cibles à identifier. Ce phénomène est représenté à la figure 1.4 sous le nom de reconnaissance moléculaire. Sur cette figure il est possible de voir deux types de cibles ou molécules d'intérêts (les cercles et les losanges). Seulement les cibles en forme de cercles peuvent interagir avec les sondes du biorécepteur. C'est ce qui s'appelle la spécificité, en détections intermoléculaires la spécificité est la capacité d'un biorécepteur à interagir seulement avec les molécules d'intérêts.

Le transducteur :

La fonction du transducteur est de transformer l'interaction entre les cibles et les sondes du biorécepteur en un signal qui peut être amplifié, enregistré et analysé. Les transducteurs peuvent mesurer différents phénomènes physiques ou chimiques, l'important est de bien choisir le transducteur en fonction du principe de reconnaissance utilisé par le biorécepteur. Par exemple, si la reconnaissance biologique du biorécepteur induit un changement de température important, un thermocouple pourrait être utilisé pour traduire la réaction de reconnaissance en tension électrique mesurable. Le tableau 1.1 montre quelques exemples de différents types de transducteur ainsi que des types d'interaction mesurée.

Tableau 1.1 Exemples de différents types de transduction utilisé dans le domaine des biocapteurs [14]

Type de transducteur	Interaction mesurée	Exemple
Électrochimique	Transfert d'électron	[15,16]
Optique	Intensité, polarité, spectre	[17,18]
Masse	Changement de fréquence de résonance, déformation	[19]
Température	Dégagement/absorption de chaleur lors de réaction	[19,20]

1.1.2 Transport de masse

Les molécules cibles contenues dans le fluide biologique doivent pouvoir se déplacer jusqu'au biorécepteur pour interagir avec celui-ci et être détectées. Cela se nomme le transport de masse. Le transfert de masse est relié à différents mécanismes physiques de mouvement des espèces chimiques (ions, atome, molécules). La diffusion et la convection de masse sont les deux phénomènes de transfert de masse qui sont régulièrement utilisés pour décrire le transport de masse dans les systèmes fluidiques ou microfluidiques. La diffusion de matière se rapproche grandement du phénomène de conduction de chaleur³ et la convection de matière est pratiquement le même phénomène que la convection thermique⁴.

À l'interface, il est connu qu'il peut y avoir des problèmes de limite de diffusion [21]. La limite de diffusion est un état où le temps de diffusion des cibles vers la surface dans le fluide est le facteur limitatif dans la dynamique du système de détection versus un système où le facteur limitatif est la vitesse d'interaction entre les cibles et les sondes. Cela va entraîner un signal de mesure qui va être constitué de la convolution de l'interaction intermoléculaire entre les cibles et les sondes et du transport de masse des cibles vers l'interface. Dans la conception de biocapteur utilisant des biorécepteurs de surface, ce phénomène doit être pris en compte, car il peut changer la performance du capteur de manière très importante. C'est pour cela que plusieurs modèles [22,23], ainsi que des systèmes [24] sont souvent intégrés dans ce type de capteur pour diminuer l'impact de la limite de diffusion sur la qualité du signal final. Même avec le meilleur, le plus sensible, le plus spécifique des couples biorécepteur et transducteur, un biocapteur qui n'a pas la capacité d'apporter les cibles jusqu'au biorécepteur est pratiquement inutile [21,25].

1.2 Solution privilégiée

La réalisation d'un système de caractérisation des interactions intermoléculaires à l'interface liquide/solide va être traitée tout au long de cette thèse. Les choix qui ont été

³ Phénomène présenté à la section 2.2.1

⁴ Phénomène présenté à la section 2.2.2

faits au niveau du biorécepteur, du transducteur et du transfert de matière sont sommairement exposés ici.

1.2.1 Choix du biorécepteur

Le biorécepteur choisi pour le système est une couche de brin de monomère d'ADN (sonde) pour la détection des brins d'ADN complémentaires (cible). Avec ce type de biorécepteur il va être possible de détecter certaines séquences bien précises d'ADN.

La mesure de l'hybridation de brins d'ADN sur support solide fut choisie comme modèle biologique, car il est régulièrement utilisé dans les biocapteurs pour la détection de virus, pour la détection de gènes ou pour la détection de mutation [1,26–29]. Le choix de ce biorécepteur se justifie par l'utilisation courante de ce type de chimie de surface. De plus l'utilisation de l'ADN comme biorécepteur est un savoir-faire de l'Équipe Chimie et Nanobiotechnologies de l'INL⁵.

Pour comprendre le fonctionnement de ce modèle biologique comme biorécepteur, il est important d'analyser le fonctionnement de la molécule d'ADN.

Molécule d'ADN

La structure de la molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique) fut découverte par Watson et Crick en 1953 [30]. Cette molécule est présente dans tous les êtres vivants et est porteuse du code génétique. La molécule d'ADN a une structure à doubles brins qui sont complémentaires.

Il est possible d'utiliser l'ADN comme un biorécepteur en utilisant le principe de complémentarité de celle-ci. La molécule d'ADN est constituée de trois parties principales, un groupe phosphate, un sucre (désoxyribose) et une base azotée. Les groupes phosphate et les sucres forment un squelette sur lequel une base azotée est disposée pour former un nucléotide. Un brin d'ADN est formé d'un enchainement de plusieurs nucléotides. La figure 1.5 montre le schéma d'un brin d'ADN avec les trois différentes parties.

⁵ Institut des Nanotechnologie de Lyon

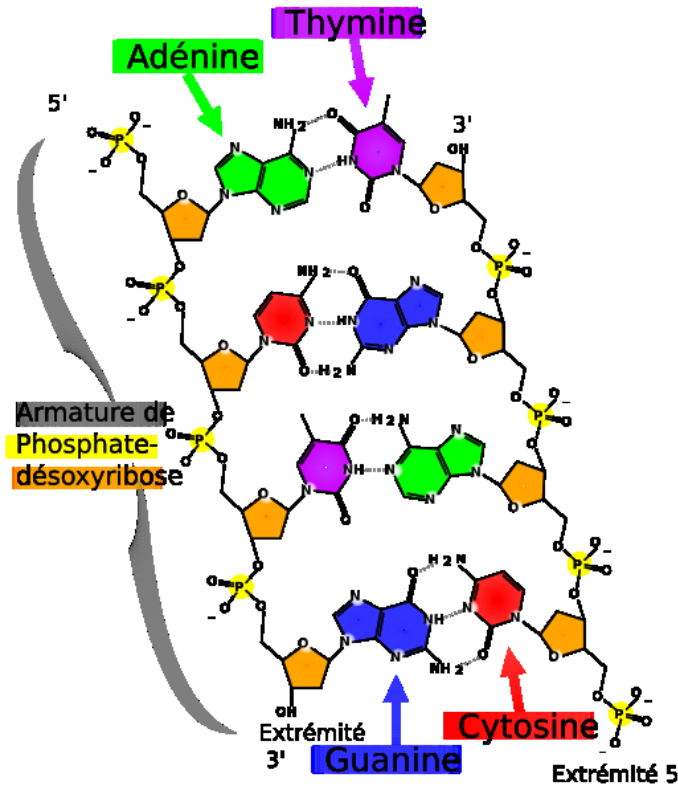


Figure 1.5 Schéma d'un brin d'ADN [31]

Il y a quatre types de bases azotées possibles sur un brin d'ADN, l'adénine, la thymine, la guanine et la cytosine. L'enchaînement de ces différentes bases le long du brin est la séquence d'ADN. C'est cette séquence qui constitue le message porté par la molécule.

Les bases azotées ont la propriété de l'associer spécifiquement deux à deux. Deux brins d'ADN s'associent grâce à des interactions hydrogènes entre les bases dites complémentaires. Les associations les plus stables obtenues sont :

- Adénine avec la Thymine
- Cytosine avec la Guanine

Ainsi lorsque d'un brin d'ADN possède une séquence complémentaire du deuxième brin, ces deux brins sont complémentaires et vont pouvoir s'associer.

Du fait de cette complémentarité, deux séquences d'ADN complémentaires ont la possibilité de s'associer spécifiquement, ce phénomène est nommé l'hybridation. La séparation de deux brins d'ADN est la dissociation. Dans le cas où deux brins non

complémentaires d'ADN viendraient à être en contact, les chances que l'hybridation se réalise sont très faibles. La figure 1.6 montre l'hybridation de deux brins d'ADN dont les séquences de nucléotides sont complémentaires.

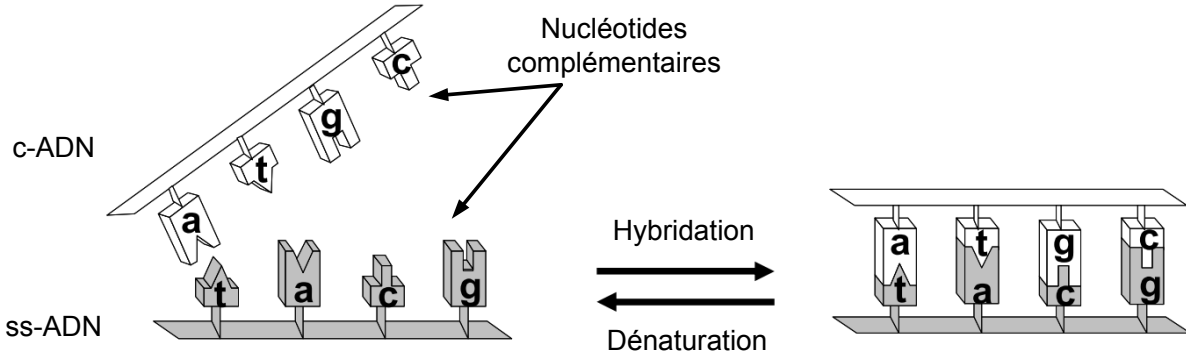


Figure 1.6 Reconnaissance entre deux brins d'ADN complémentaires [32]

En tirant profit de la spécificité de l'hybridation d'un brin simple d'ADN (ss-ADN) avec son complémentaire (c-ADN), il est possible de réaliser un biorécepteur spécifique et flexible [33]. Si les cibles à détecter sont des séquences d'ADN, le biorécepteur peut alors être composé des brins complémentaires immobilisés à la surface. Dans ce cas le biorécepteur de la figure 1.4 pourrait être schématisé par la figure 1.7.

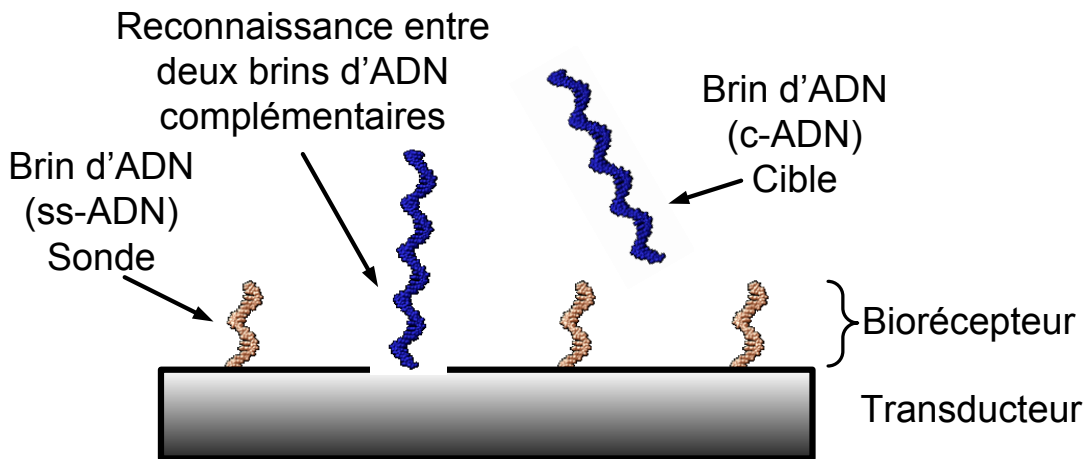


Figure 1.7 Biorécepteur constitué de brins d'ADN (ss-ADN) immobilisés à la surface du transducteur

1.2.2 Transducteur

Chaque transducteur permet d'avoir accès à la variation d'une grandeur physique à l'interface (indice de réfraction, dégagement de chaleur, etc.) qui peut être reliée à un apport de matière, un changement de propriétés électrique ou thermique dû à la reconnaissance.

La plupart des biocapteurs utilisent une seule méthode de transduction, par contre pour effectuer une caractérisation des interactions et non pas une mesure de concentration d'une cible il est difficile d'y arriver avec une seule méthode de transduction. Cela est dû au fait que les méthodes de transduction donnent des informations sur un seul phénomène physique ou biologique. Il est difficile avec la mesure d'un seul phénomène d'avoir une idée globale de ce qui est réellement arrivé à l'interface. C'est pour contrer ce problème que le système proposé va utiliser deux méthodes de transductions qui sont complémentaires, soit : une méthode de caractérisation thermodynamique basée sur une mesure des enthalpies de réaction à l'aide de techniques de microcalorimétrie et une méthode de caractérisation de cinétique sans marquage à l'interface basé sur des technologies de résonance de plasmon de surface (SPR). Ces deux modalités furent choisies pour être associées dues à leur complémentarité.

Mesure calorimétrique

Les mesures calorimétriques vont permettre de mesurer l'enthalpie ΔH due aux interactions intermoléculaires à l'interface liquide/solide. L'enthalpie d'une réaction est associée à la chaleur qu'une réaction va dégager ou absorber.

Cette mesure à l'aide de la microcalorimétrie va permettre de connaître la conformation de certaines molécules [34] et de définir une partie de l'équation de Gibbs :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.1)$$

où ΔG est l'énergie de Gibbs en joule, ΔH est l'enthalpie en joule, T est la température en Kelvin et ΔS est l'entropie en joule/Kelvin.

Résonance des plasmons de surface (SPR)

La mesure SPR permet de caractériser la cinétique des interactions de différentes molécules à l'interface liquide/solide. Cette modalité de transduction a l'avantage d'être sensible au changement d'indice de réfraction très près de l'interface, soit à environ 200 nm [18]. Tout comme la calorimétrie, le SPR est une technique sans marquage puisque c'est l'apport de cible au biorécepteur qui entraîne le changement d'indice et qui permet la mesure optique [35]. Le SPR peut également être très utile pour qualifier la formation de la couche du biorécepteur sur la surface.

Le couplage des deux techniques est complémentaire puisque d'une part il serait possible d'avoir des informations sur la présence et la cinétique des molécules cibles en même temps qu'il sera possible d'avoir des informations sur l'enthalpie de réaction à l'interface. La figure 1.8 montre l'évolution de la figure 1.4 avec les deux types de transduction pour effectuer la mesure couplée.

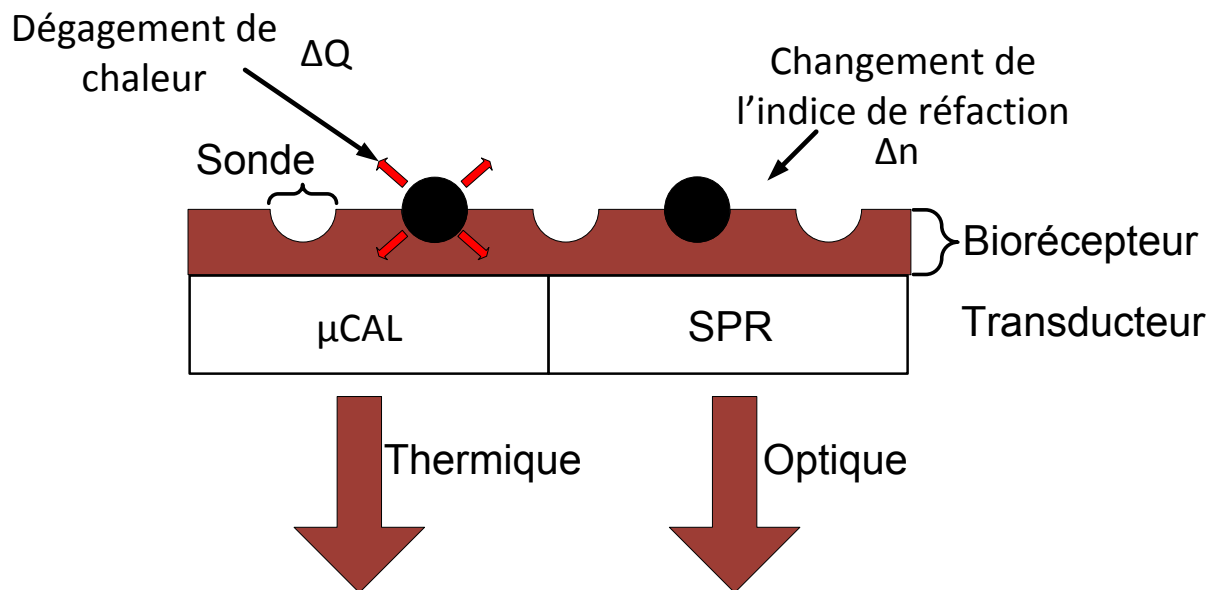


Figure 1.8 Biocapteur avec les deux transducteurs, microcalorimétrie et SPR avec le même biorécepteur. Sur la figure l'interaction intermoléculaire entre les cibles et les sondes font changer l'indice de réfraction près de la surface ce qui permet une mesure SPR et elle provoque un dégagement de chaleur qui permet une mesure calorimétrique

1.2.3 Intérêt de la mesure couplée

Lors du phénomène de l'hybridation d'ADN, une variation de l'énergie de Gibbs (ΔG), de l'enthalpie (ΔH) et de l'entropie (ΔS) vont être engendrés [36]. Ces changements vont surtout être en fonction de la séquence de nucléotides et de la longueur des brins d'ADN.

Par ailleurs, l'apport des cibles près de la surface dû à l'hybridation va changer de manière suffisamment importante l'indice de réfraction près de l'interface liquide/solide pour qu'une mesure de type SPR puisse être utilisée [2,26,27].

En couplant les deux modalités, il va être possible de mesurer en même temps les dégagements de chaleur liés à l'hybridation d'ADN ainsi que le changement d'indice de réfraction en temps réel et ainsi obtenir des informations thermodynamiques et de la cinétique. Cependant, pour obtenir des informations fiables, la réaction de biorecognition ne doit pas être limitée par le transport de masse.

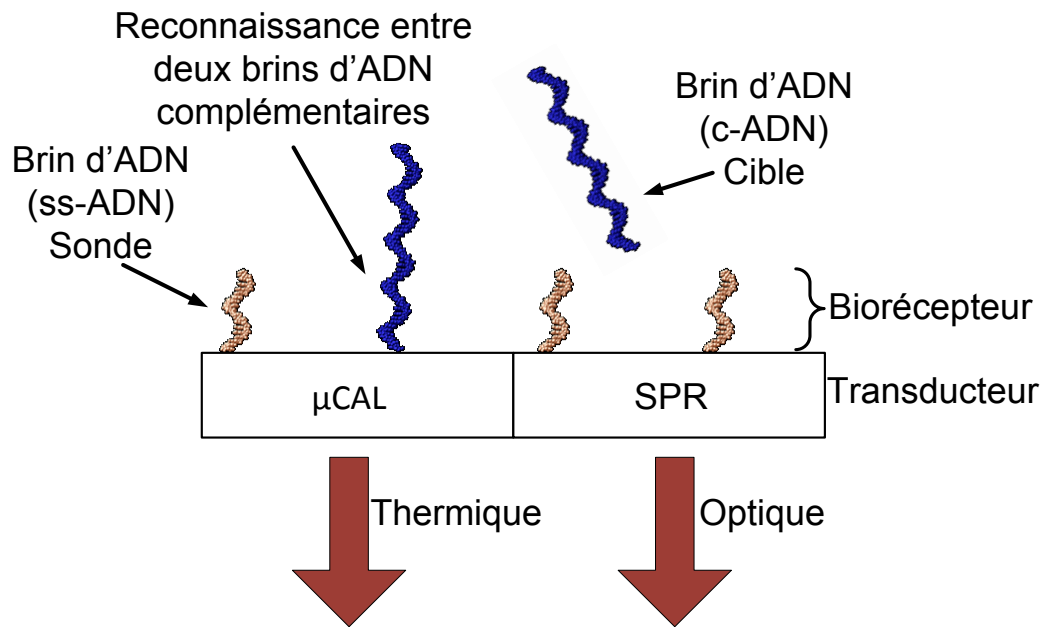


Figure 1.9 Concept final du biocapteur avec le biorécepteur constitué de brins d'ADN et deux transducteurs

1.2.4 Stratégie pour le transport de masse

Afin de s'assurer que les cibles viennent en contact avec les sondes du biorécepteur un système de mélange basé sur des technologies de mélange par onde acoustique de

surface (SAW) [37] va être implémenté pour le système. Ce système permet de limiter les effets des problèmes associés à la limite de diffusion.

1.3 Organisation du mémoire

La thèse de doctorat est organisée de manière à ce qu'il soit possible de suivre le même chemin qui fut emprunté pour la conception du système. Le document est divisé en 5 chapitres:

Le deuxième chapitre est consacré à l'état de l'art qui fut utilisé pour permettre la conception du système. Dans ce chapitre, un aperçu des différents groupes qui travaillent en microcalorimétrie et SPR sont présentés. La théorie minimale à connaître des différents domaines sera également adressée.

Le troisième chapitre est consacré à la conception théorique et aux modélisations utilisées pour la conception des trois parties du capteur, soit le biorécepteur, les deux transducteurs et le système de transport de masse.

Le quatrième chapitre est composé d'un article publié en 2012 dans la revue scientifique « *International Journal of Nanoscience* ». Dans cet article la méthode, le procédé de fabrication ainsi que les premiers tests biologiques sont montrés.

Le cinquième chapitre pour sa part est composé d'un article soumis en 2013 à la revue « *Lab-on-a-chip* ». Dans cet article le système de transport de masse basé sur une technologie d'onde acoustique de surface est présenté. À la fin de l'article, des résultats sur des mesures biologiques sont présentés.

Le sixième chapitre présente les conclusions et les perspectives ainsi qu'une discussion sur les résultats de la thèse.

CHAPITRE 2 ÉTAT DE L'ART

La réalisation d'un biocapteur bimodal basé sur des mesures de résonance de plasmon de surface et de microcalorimétrie pour des mesures d'interactions intermoléculaires à l'interface liquide/solide sollicite l'utilisation couplée de plusieurs techniques, modèles et domaines scientifiques différents. Dans le présent chapitre, la microcalorimétrie, la technique SPR, la fonctionnalisation de surface et le transport de masse seront traités pour permettre de mettre en évidence leur spécificité.

2.1 Biorécepteur

Le biorécepteur est fabriqué de molécules biologiques qui sont immobilisées près de la surface du transducteur dans le but de capter les molécules d'intérêts. Le rôle du biorécepteur est d'interagir avec la molécule cible de façon spécifique, c'est-à-dire uniquement avec la molécule cible. Il existe différents types de molécules biologiques qui peuvent être utilisées comme biorécepteur, l'ADN [38], des protéines [39] et des peptides [40].

Le modèle choisi ici étant l'ADN, les méthodes utilisées pour fonctionnaliser des brins d'ADN sur une surface vont être montrées.

2.1.1 Principe de fonctionnalisation d'un brin monobrin d'ADN

Il y a plusieurs méthodes pour fonctionnaliser des monobrins d'ADN sur une surface. Par exemple, pour fonctionnaliser sur la silice il est possible d'utiliser une fonctionnalisation à base de silane [38]. Pour l'application d'intérêt, le transducteur SPR demande que la fonctionnalisation de l'ADN soit faite sur un métal noble. Pour réaliser ce type de fonctionnalisation il y a deux méthodes régulièrement utilisées :

1. la fonctionnalisation de l'or par thiols [41–43]
2. la fonctionnalisation de l'or par l'utilisation d'une couche de BSA-biotine-avidine [2]

Fonctionnalisation de l'or par thiols

Un thiol est un composé organique avec un groupement thiol –SH attaché à une chaîne de carbone plus ou moins longue. La figure 2.1 montre la structure des thiols qui sont régulièrement utilisés pour la fonctionnalisation de l'ADN sur l'or.

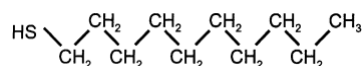


Figure 2.1 Illustration d'une chaîne de *n*-alkanethiol (*n* est le nombre de molécules de carbone de la chaîne) [43]

Le groupement thiol –SH peut créer une liaison covalente avec un atome d'or et ainsi créer des monocouches autoassemblées sur une surface qui serait recouverte d'or par exemple. Il est également possible de greffer un thiol sur un simple brin d'ADN, donc en prenant une molécule d'ADN greffée à un thiol et si on les fait réagir avec une surface d'or afin de créer une couche autoassemblée, il est possible d'obtenir une couche d'ADN simple brin immobilisée à la surface de notre or, soit avoir un biorécepteur. La figure 2.2 montre un schéma du principe de fonctionnalisation de brins d'ADN à l'aide de thiols.

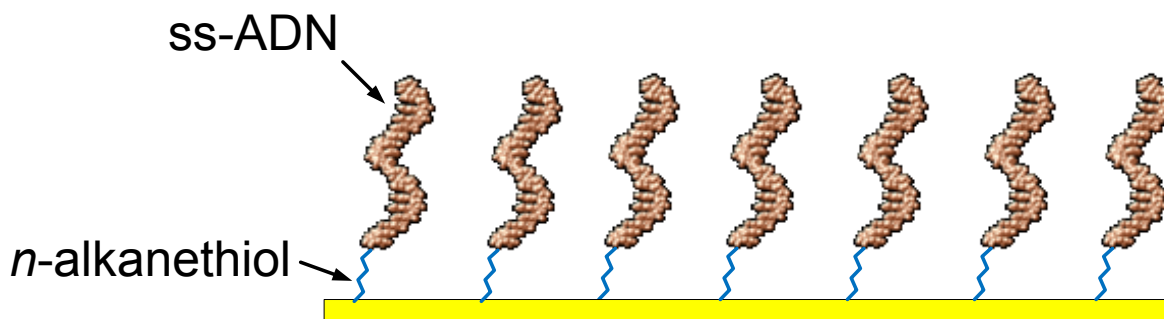


Figure 2.2 Schéma montrant une surface d'or fonctionnalisée par des brins d'ADN (ss-ADN) simple greffé à la surface par des *n*-alkanethiol.

Fonctionnalisation à l'aide d'un complexe BSA-avidine-ADN :

Il est possible d'utiliser le complexe avidine-biotine qui est la liaison non covalente la plus forte connue [44]. Ce type de biorécepteur fut déjà utilisé pour fonctionnaliser des brins d'ADN sur une surface d'or [2]. L'avantage le plus important de cette technique par rapport à l'utilisation de thiols est qu'il est possible d'utiliser ce procédé sur presque toutes les surfaces.

La méthode consiste en l'utilisation d'une couche de protéine d'albumine de sérum bovin biotinilisée (BSA-biotine) suivie d'une couche de neutravidine et d'une immobilisation des sondes d'ADN par une biotine sur la neutravidine [2,26].

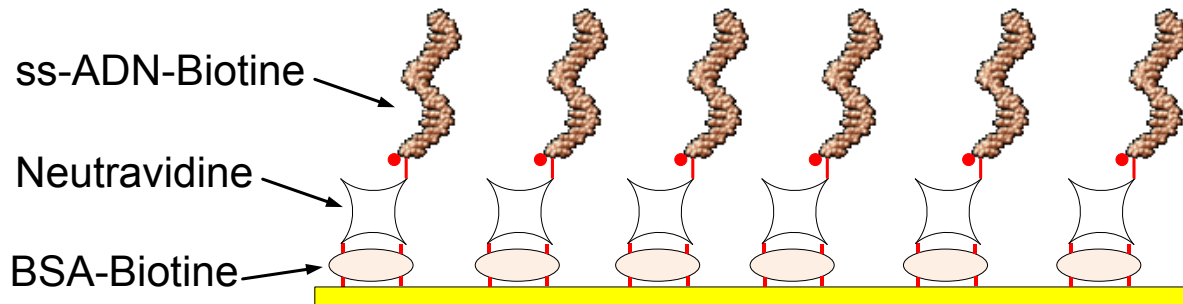


Figure 2.3 Schéma montrant une surface d'or fonctionnalisée par des brins d'ADN biotinilisée (ss-ADN-Biotine) simple immobilisés sur la surface par l'entremise d'un complexe BSA-biotine-neutravidine

2.2 Microcalorimétrie

La microcalorimétrie est une sous-discipline de la thermodynamique qui a pour objet la mesure de la chaleur lors de réactions qui dégagent de faibles puissances de l'ordre du micro Watt. Lorsque le microcalorimètre fonctionne à pression constante, celle-ci permet de mesurer des différences de chaleur à l'intérieur d'un système en mesurant les différences d'enthalpie de réaction.

La microcalorimétrie utilise le transfert thermique entre différents milieux pour décrire les différentes réactions. Les trois types de procédés de transfert sont la conduction, la convection et la radiation [45]. Les transferts de chaleur consistent en un transfert d'énergie entre deux régions ou milieux. La conduction et la convection sont particulièrement importantes pour modéliser la microcalorimétrie. La radiation n'est pas un phénomène dominant dans la microcalorimétrie, c'est pour cela que la radiation est traitée uniquement en annexe b.

2.2.1 Conduction thermique appliquée à la microcalorimétrie

La conduction thermique est un phénomène de transfert d'énergie entre deux milieux dû à un gradient de température entre ceux-ci. Ce phénomène se fait sans déplacement global de matière, il correspond à un transfert d'énergie des molécules ayant un niveau d'énergie plus élevé vers les molécules avec un niveau d'énergie plus faible. L'énergie va être

transférée de l'endroit où la température est la plus élevée vers l'endroit où la température est la moins élevée. Le modèle le plus utilisé pour expliquer la conduction est le modèle de l'équation de chaleur tel que défini par Jean-Batiste Biot en 1804 [45]. L'équation de chaleur se décrit comme suit :

$$k\Delta T + \frac{dq}{dt} = \rho c \frac{dT}{dt} \quad (2.1)$$

où k est la conductivité thermique exprimée en $W/m^{-1} K^{-1}$, ΔT est le Laplacien de la température en Kelvin, dq/dt est la puissance thermique produite par unité de volume exprimée en W/m^3 , ρ est la masse volumique du matériau en kg/m^3 et c est la chaleur spécifique du matériau en $J/kg \cdot K$ [45]. Pour être en mesure d'interpréter les mesures de microcalorimétrie, trois domaines d'utilisation de cette équation sont importants à bien comprendre,

1. Le régime permanent avec production de chaleur nulle
2. Le régime permanent avec production de chaleur
3. Le régime transitoire.

Régime permanent avec production de chaleur nulle

Le régime permanent s'applique au cas où il n'y a aucune production de chaleur entre les domaines observés, alors le flux de chaleur peut être décrit par l'équation (2.2). Cette équation revient réduire l'équation de conduction à une forme unidimensionnelle spatialement, ce qui détermine l'équation du flux de chaleur entre deux milieux en régime permanent à température constante pour une surface simple. L'équation est :

$$\Phi = \frac{kA}{L}(T_1 - T_2) \quad (2.2)$$

où A est l'aire de la section du milieu, L est la longueur de la section et Φ est le flux thermique en Watt⁶. L'équation (2.2) est valide seulement pour un système en régime permanent où il n'y a aucune production de chaleur entre les points de mesure de température T_1 et T_2 , par exemple le transfert de chaleur entre l'intérieur d'une maison et

⁶ Voir démonstration de l'équation du flux en annexe a.1.

l'extérieur par le biais d'une fenêtre en hiver ou entre une enceinte calorimétrique et le milieu qu'il l'entoure dans le cas d'un calorimètre à flux. Pour déduire la quantité de chaleur avec ce modèle, il suffit d'intégrer l'équation (2.2) par rapport au temps tel que montré par l'équation (2.3).

$$\int \Phi(t) dt = \frac{kA}{L} \int (T_1(t) - T_2(t)) dt = q(t) \quad (2.3)$$

Régime permanent avec production de chaleur

Il est également intéressant de regarder la résolution de l'équation de conduction (2.1), pour un système avec un flux thermique ($\Delta T \neq 0$) et avec une production de chaleur ($P \neq 0$) en régime permanent ($dT/dt = 0$). Ce système est représenté par la figure 2.4.

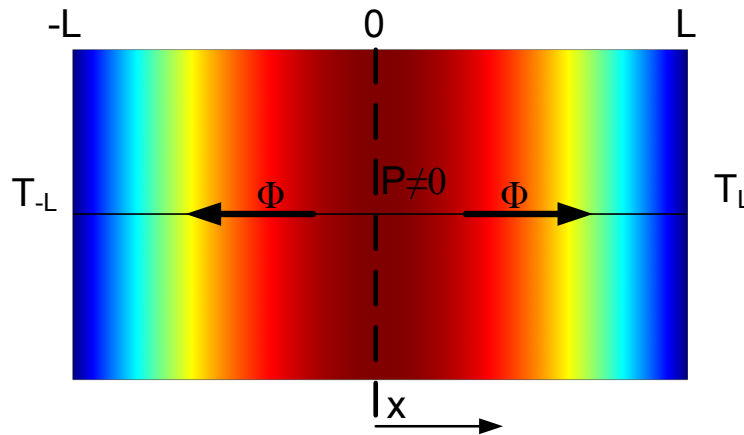


Figure 2.4 Représentation d'un système avec production de chaleur en régime permanent. Dans ce cas, il y a production de chaleur au niveau de la ligne pointillée à $x=0$. Les conditions limites en L et $-L$ sont à température fixe.

Dans ce cas, la résolution de l'équation de conduction pour quantifier la chaleur produite va être de forme quadratique⁷, soit :

$$q(t) = \int P(t) dt \propto \int \frac{-2kT(x)}{x^2} dx \quad (2.4)$$

⁷ Voir démonstration en annexe a.2

Régime transitoire

Pour résoudre l'équation de conduction (2.1) en régime transitoire, il faut résoudre l'équation différentielle d'ordre 2. Pour un système unidimensionnel initialement au repos avec un échelon en entrée, l'équation pourrait avoir la forme suivante⁸ :

$$T(x,t) = T(x,\infty) - H(x)e^{\frac{-C*\alpha t}{L^2}} \quad (2.5)$$

Avec $\alpha = k/\rho c$ qui représente la diffusivité thermique en m^2/s . $T(x,\infty)$ qui est le profil de température en régime permanent tel que montré par l'équation (A.12). $H(x)\exp(-C*\alpha t/L^2)$ est le développement en série de Fourier de l'équation différentielle de Fourier du régime transitoire pour le système unidimensionnel tel que montré à la figure 2.4.

2.2.2 Convection

La convection est un mode de transfert de chaleur dû aux mouvements des particules d'un fluide calorifique. Le mouvement peut être attribuable à un changement de densité suite à un changement de température (convection passive) [45] ou encore à un mouvement forcé dû à une force extérieure (convection forcée). Un exemple de convection forcée est un ventilateur pour le refroidissement d'un microprocesseur et un exemple de convection passive est une casserole où de l'eau est sur le point de bouillir. L'eau dans le fond de la casserole va avoir une température plus élevée que l'eau à la surface. L'eau au fond, étant plus chaude, va avoir une densité plus faible que l'eau en surface ce qui va provoquer un mouvement. Les particules chaudes vont monter et les particules froides vont se retrouver au fond. La figure 2.5 présente le principe de la convection dans une casserole où de l'eau est sur le point de bouillir.

⁸ Voir Annexe a.3

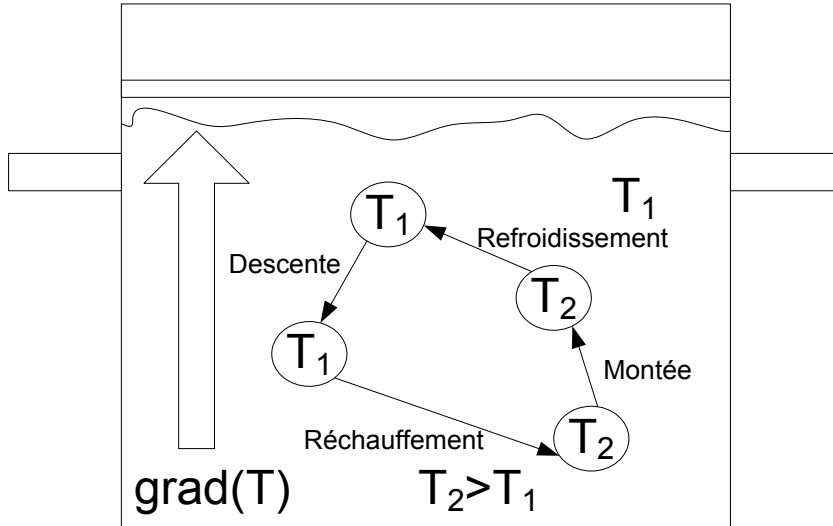


Figure 2.5 Représentation du principe de la convection

Le flux de chaleur en Watt dû à la convection est modélisé par la loi de Newton pour des fluides newtoniens :

$$\Phi = hs(T_2 - T_1) \quad (2.6)$$

où S est la surface en m^2 , T est la température en Kelvin et h est le coefficient de transfert thermique en $W/m^2 \cdot K$. L'évaluation du coefficient de transfert thermique est la clé pour être en mesure de bien modéliser un système. Le tableau 2.1 donne un aperçu des différents coefficients de transfert thermique pour différent système en convection passive ou forcée.

Tableau 2.1 Valeur typique des coefficients de transfert thermique pour la convection

Type de fluide	Passive	Forcé
gaz	2-25	25-250
liquide	50-1000	100-20000

En microcalorimétrie, la convection diminue la sensibilité du calorimètre [46,47]. Cela s'explique par l'efficacité à dissiper rapidement la chaleur dans le milieu avant que cette chaleur puisse être mesurée. Dans un système destiné à des mesures d'interactions biomoléculaires, la partie la plus importante de convection va être due au mouvement du

fluide biologique. Il va être important de bien choisir la géométrie de la cellule fluide ainsi que les caractéristiques de flux de manière à limiter au maximum la convection dans le système.

2.2.3 Introduction à la calorimétrie

Le calorimètre ou microcalorimètre est l'appareil qui permet de mesurer la quantité de chaleur absorbée ou dégagée par un système ou une réaction. Il est très important pour la suite de la thèse de bien comprendre ce qu'est un calorimètre et dans quel environnement celui-ci doit fonctionner. Cela va dicter bon nombre des choix de conception qui furent réalisés.

Il existe trois grandes familles de calorimètres : les adiabatiques, les isopériboliques et les isothermes. La figure 2.6 montre de manière schématique le concept d'un calorimètre et le tableau 2.2 résume les différences entre les trois modes calorimétriques. Les trois modes calorimétriques permettent de mesurer différentes caractéristiques thermodynamiques. La figure 2.6 montre deux secteurs bien distincts du calorimètre, la chambre calorimétrique (CC) et la gaine thermostatée (GT). La chambre calorimétrique (CC) est le lieu où la réaction d'intérêts a lieu et où la mesure est effectuée. La gaine thermostatée (GT) est la partie du calorimètre qui entoure la chambre et qui est habituellement contrôlé et isolé pour permettre d'effectuer la mesure calorimétrique dans les meilleures conditions possibles.

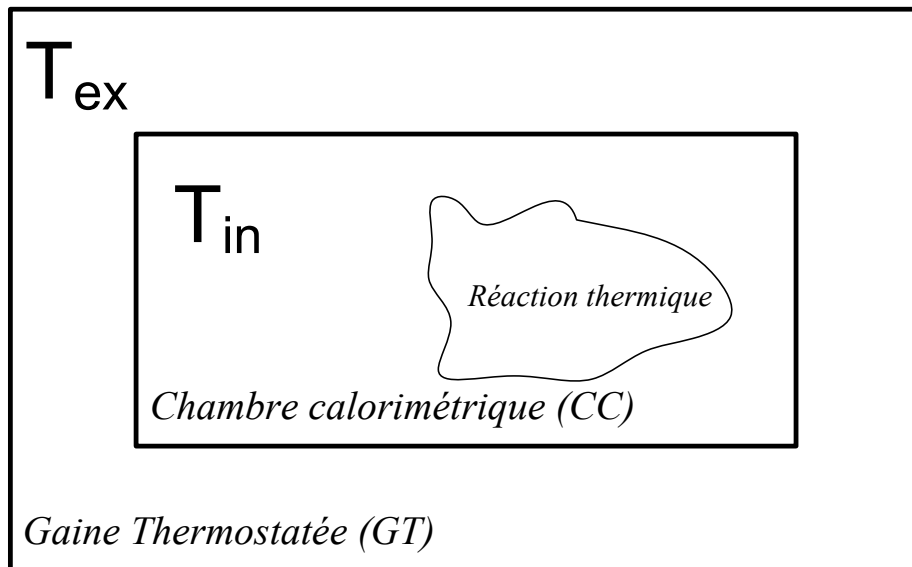


Figure 2.6 Représentation schématique d'un calorimètre avec la chambre calorimétrique (CC) soit le lieu de la réaction thermique et la gaine thermostatée soit la partie qui isole le calorimètre de l'environnement

Tableau 2.2 Différents modes calorimétriques

Mode	Caractéristique
Adiabatique	$T_{ex} = T_{in}$ Sans flux de chaleur entre GT et CC Mesure du changement de température
Isopéribolique	T_{ex} est constant T_{in} est variable Mesure le changement de la température T_{in} (CC)
Isotherme	T_{in} est constant T_{ex} est variable, mais contrôlée Mesure de flux de température entre CC et GT

Calorimètre ADIABATIQUE

Un calorimètre est dit adiabatique lorsqu'il fonctionne sans échange entre la gaine thermostatée et l'enceinte calorimétrique. Habituellement, les conditions adiabatiques sont possibles par l'utilisation d'un bouclier thermique qui empêche ou tout au moins limite très fortement les transferts de chaleur entre le milieu et l'extérieur. Le bouclier est aussi considéré comme indéformable, donc il n'y a aucun travail possible. La quantité de chaleur évoluant durant une réaction à l'intérieur du calorimètre est égale au produit du changement de température et de la capacité thermique [48], soit :

$$q(t) = (T(t) - T_0) C_{thermique} \quad (2.7)$$

où T_0 est la température initiale du calorimètre. $C_{thermique}$ est la capacité thermique de l'enceinte calorimétrique et de la gaine. Ce type de calorimètre fonctionne dans des conditions où la température est considérée comme uniforme pour tout le calorimètre, mais non constante dans le temps.

Calorimètre ISOPÉRIBOLE

Le calorimètre isopéribole, régulièrement nommé dans la littérature le calorimètre semi-adiabatique ou semi-isotherme [49], mesure un changement de température durant la réaction calorimétrique, malgré la présence d'un flux thermique entre la chambre calorimétrique (CC) et la gaine thermostatée (GT). Dans ce type de calorimètre, la température de la gaine (T_{ex}) est considérée constante et c'est uniquement la température de l'enceinte calorimétrique (T_{in}) qui va varier lors de la réaction. Un facteur de correction connue est appliqué sur la mesure de la température pour déterminer l'énergie de la réaction.

Calorimètre ISOTHERME

Dans un calorimètre en mode isotherme, la température de la chambre calorimétrique (T_{in}) durant la mesure calorimétrique reste constante et la température de la gaine (T_{ex}) est variable, mais contrôlée pour garder le calorimètre dans les conditions expérimentales désirées. En mesurant le flux de chaleur entre la chambre et l'enceinte, il est possible d'en déduire la puissance de la réaction [49]. La mesure de ce flux de puissance peut être reliée à l'équation (2.4) où la conductivité thermique est celle entre la chambre et la gaine. Wadso [48] décrit cette mesure directement en fonction de la réponse d'un transducteur par l'équation :

$$P = \varepsilon U \quad (2.8)$$

où P est la puissance thermique de la réaction en Watt, ε est la constante de calibration du système et U est la sensibilité du transducteur. Il est à noter que l'équation (2.8) est valide lorsque le système est en régime permanent, en régime transitoire, l'équation du

calorimètre va être semblable à l'équation (2.5). Il est possible de déduire l'énergie de la réaction en intégrant la puissance mesurée.

$$q(t) = \int P(t)dt = \varepsilon \int U(t)dt \quad (2.9)$$

À l'équilibre les températures de la gaine (T_{ex}) et l'enceinte (T_{in}) sont stables ε peut être associé à :

$$\varepsilon = \frac{kA}{L} \frac{1}{\beta}. \quad (2.10)$$

Avec β la sensibilité en température de la réponse du transducteur, soit avec $U = \beta\Delta T$.

Un constat très important ici est que pour une puissance de réaction donnée, il faut que la conductivité thermique soit la plus faible possible pour que la réponse mesurée au transducteur soit la plus grande possible. La sensibilité du calorimètre en régime permanent est directement reliée à l'inverse de la conductivité thermique entre la chambre et la gaine du dispositif.

En utilisant la réponse du calorimètre en régime transitoire et permanent, regardons comment celui-ci va réagir durant une réaction thermique.

Les microcalorimètres sont pour la plupart des calorimètres à conduction qui fonctionnent en régime isotherme. La figure 2.7 montre la réponse type d'un calorimètre en mode isotherme, pour une réaction débutant à la 500^e seconde et se terminant à la 1500^e seconde.

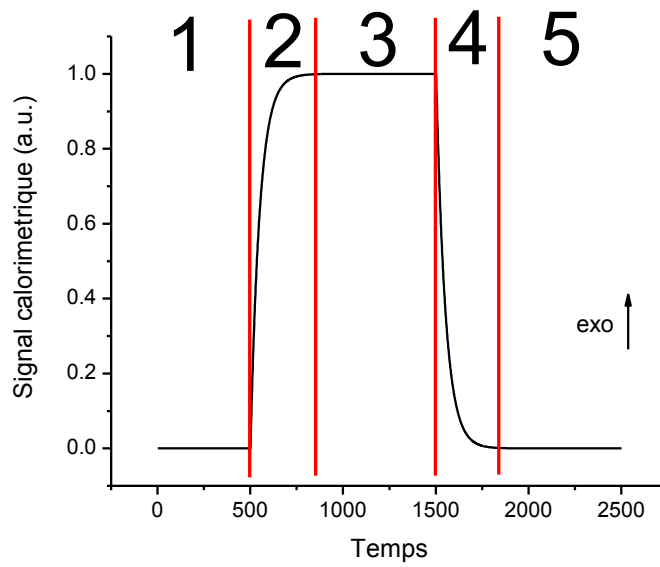


Figure 2.7 Signal théorique d'un calorimètre isotherme suite à une réaction exothermique. Il y a cinq sections au signal calorimétrique; la ligne de base (1), la montée (2), le plateau (3), la descendante (4), la ligne de base (5).

Les deux lignes de base (1 et 5) sont associées au moment où il n'y a pas de réaction thermique, soit au signal du transducteur lorsqu'il n'y a aucun flux thermique entre la chambre et la gaine. Ces deux sections sont associées à la résolution de l'équation de conduction lorsqu'il n'y a pas de production de chaleur, soit l'équation (2.2).

La montée (2) et la descente (4) sont associées aux zones où le calorimètre est en régime transitoire, soit les zones associées à la résolution de l'équation de conduction en régime transitoire, soit l'équation (2.5). Lors d'une mesure en calorimètre isotherme, ces deux zones doivent être les plus petites possible, car il est compliqué de calibrer le calorimètre pour pouvoir interpréter la mesure dans ces deux zones. La constante de temps des zones de transition va être associée à l'inverse de la diffusivité thermique et à la longueur du domaine d'intérêt, soit : $(\alpha/L^2)^{-1} = \rho c L^2 / k$. Pour avoir des zones de transition les plus courtes, la diffusivité thermique doit être la plus haute possible avec le moins de matière présente.

Le plateau (3) est la partie où le signal est interprétable et utile. Ce plateau correspond à la puissance dégagée par la réaction en régime permanent. Il est possible de trouver

l'énergie d'une réaction en intégrant l'équation de conduction en régime permanent avec une puissance non nulle. Ce cas correspond à la résolution de l'équation de conduction en régime permanent, soit l'équation (2.4).

La figure 2.7 montre un signal calorimétrique idéal (théorique), tandis que la figure 2.8 montre une mesure réelle à l'aide d'un microcalorimètre à flux. Sur cette figure, il est possible de distinguer les 5 sections précédemment discutées, ainsi que l'artéfact d'injection des réactifs.

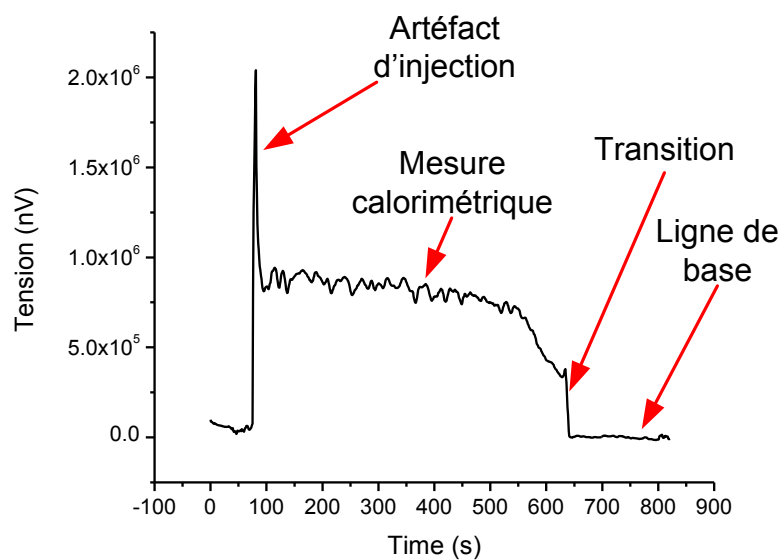


Figure 2.8 Mesure calorimétrique réelle réalisée pour une évaporation de 5 μL .

Pour mesurer les différents signaux des différents calorimètres, soit des augmentations de température, il est important d'avoir le bon transducteur tout dépendamment de la variable qui doit être mesurée. La sous-section suivante va présenter les différents types de transducteur qui peuvent être utilisés en microcalorimétrie ainsi que leurs champs d'application.

2.2.4 Transducteur à l'intérieur des calorimètres

Trois types de transducteurs régulièrement utilisés dans la microcalorimétrie vont être présentés dans cette section, soit les thermocouples, les résistances thermiques (RTD) et

les éléments à effet Peltier. Il existe d'autres types de transducteur qui sont présentés dans l'annexe c.2.

Thermocouple

Un thermocouple est un outil qui permet de mesurer des différences de température entre deux jonctions constituées de deux matériaux différents. Le thermocouple fonctionne en utilisant l'effet Seebeck⁹. Cet effet permet de traduire une différence de température entre les deux jonctions en tension électrique. Ce type de transducteur est simple et peut fonctionner dans une grande gamme de température. La figure 2.9 montre le concept de mesure différentielle d'un thermocouple. Sur cette figure, la mesure de température s'effectue entre la jonction J_1 et la jonction J_2 . La différence de température entre les deux jonctions est reliée à la tension électrique par l'équation suivante :

$$(S_B - S_A) * (T_{J_1} - T_{J_2}) = \Delta V \quad (2.11)$$

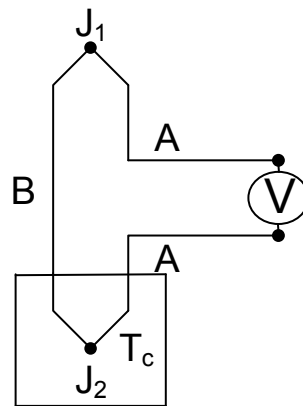


Figure 2.9 Représentation d'un thermocouple

où S_A est le coefficient de Seebeck du métal A et ΔV est la différence de potentiel électrique mesurée entre les deux jonctions. Par exemple, s'il y a une jonction constituée de deux matériaux avec des coefficients de Seebeck respectifs de 2 V/K et de -2 V/K avec une différence de tensions entre les jonctions de 4 volts, il sera possible d'en déduire que la différence de température entre les deux jonctions est de 1 K.

⁹ Pour plus de détails sur l'effet Seebeck, voir annexe c.1.1

$$\Delta T = \frac{\Delta V}{S_A - S_B} = \frac{4V}{2V/K - (-2V/K)} = 1K \quad (2.12)$$

Puisqu'il s'agit d'une mesure différentielle, c'est le type de transducteur qui est idéal pour les calorimètres de type isopéribolique et isotherme puisque dans ces deux types de calorimètre, c'est un flux de chaleur qui est mesuré entre deux chambres calorimétriques en mesurant la différence de température entre les deux chambres.

Un point négatif de ce type de transducteur est sa faible sensibilité. Il est possible d'augmenter celle-ci en utilisant plusieurs thermocouples branchés en série pour former une thermopile. Cela permet, sans trop augmenter le bruit, d'augmenter la sensibilité du système d'un facteur équivalent au nombre de thermocouples utilisés. La figure 2.10 montre le concept de la thermopile. Par exemple un thermocouple constitué de deux matériaux, si n paires sont utilisées, alors la tension aux bornes de la thermopile va être définie par :

$$n * (S_A - S_B) * \Delta T = \Delta V \quad (2.13)$$

où n est le nombre de thermocouples utilisés.

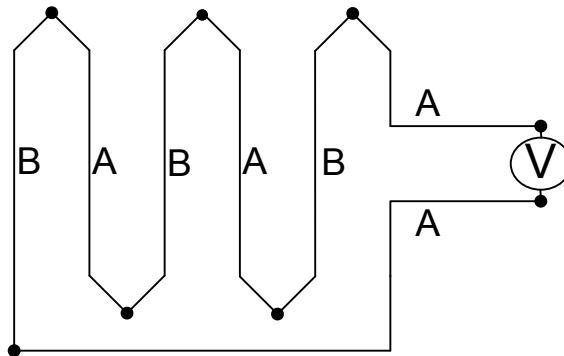


Figure 2.10 Schéma d'une thermopile constituée de trois paires ou trois thermocouples

Pour un calorimètre isotherme dont la puissance peut s'exprimer par $P = \varepsilon U$ tel que vu à l'équation (2.8), avec P la puissance, ε est la constante de calibration du système et U la sensibilité du transducteur. En combinant les équations (2.8), (2.10) et (2.13) la mesure du flux de chaleur (la puissance) à l'aide d'un calorimètre isotherme utilisant une thermopile comme transducteur est :

$$P(t) = \frac{kA}{L} * \frac{1}{n^*(S_A - S_B)} \Delta V(t) \quad (2.14)$$

Résistance détectrice de température (RTD)

La résistance thermique est habituellement faite d'un métal noble, habituellement le platine et exploite la caractéristique du changement quasi linéaire de la résistivité en fonction de la température. La mesure de température s'effectue en faisant une mesure d'impédance de la RTD. Ce type de détecteurs permet une mesure de la température absolue. Deux modèles sont utilisés pour relier la résistance à la température, soit un modèle linéaire :

$$R_T = R_0 (1 + \alpha T) \quad (2.15)$$

et un modèle polynomial :

$$R_T = R_0 (1 + \alpha T + \beta T^2 + \gamma (T - 100) T^3) \quad (2.16)$$

où R_0 est l'impédance de la RTD à 0 °C, α , β et γ sont les coefficients propres à chaque type de RTD en °C⁻¹. L'équation (2.15) est normalement utilisée au-dessus de 0 °C et l'équation (2.16) pour des températures en dessous de 0 °C. Pour des utilisations à basse température, moins de 300 °C, les RTD permettent habituellement des mesures de température plus précises. Par contre, la précision d'une RTD est directement reliée à la qualité du circuit de mesure. De plus, il est difficile d'utiliser des RTD pour de très faibles deltas de température, car il existe un phénomène d'autochauffe de la RTD dû à l'effet Joule puisque, pour mesurer la température, il faut lui injecter un courant. Les RTD standards ont habituellement des résistances qui vont de 25 Ω à 1000 Ω à 0 °C.

L'utilisation de la RTD comme transducteur est intéressante pour les calorimètres qui fonctionnent en mode adiabatique pour réaliser la mesure de température. Ce type de transducteur peut facilement être intégré [50,51].

Transduction en utilisant l'effet Peltier

Il est possible d'utiliser un élément Peltier tel un transducteur pour des calorimètres [52]. L'effet Peltier se produit lorsqu'un courant électrique passe en travers deux métaux

formant une jonction. Tout dépendamment de la direction du courant, les électrons avec un niveau d'énergie élevé vont aller vers l'autre jonction pour être remplacés par des électrons de faible énergie. Cela va créer un transfert de chaleur entre les deux jonctions. L'effet Peltier est caractérisé par le coefficient de Peltier (Π) qui s'exprime en joule par ampère. Ce coefficient permet de définir le transfert de chaleur comme suit :

$$Q = \Pi_{ab} I = (\Pi_a - \Pi_b) I \quad (2.17)$$

où Π_x est le coefficient de Peltier pour la jonction x, I est le courant en ampère et Q est la chaleur en joule.

En mesurant le courant nécessaire pour garder la chambre calorimétrique à une température fixe, il est possible de connaître la quantité de chaleur (Q) injectée ou dissipée dans la chambre calorimétrique par l'effet Peltier, ce qui revient à connaître le flux de chaleur dégagé ou absorbé par la réaction thermique. Puisqu'un transducteur à effet Peltier mesure directement le flux de chaleur, il est très intéressant pour des calorimètres isothermes, par contre il est difficile d'intégrer des éléments Peltier.

Le tableau 2.3 montre un résumé des différentes familles de calorimètre, du type de mesure effectué par les différentes familles et l'intérêt des différents transducteurs pour chacune des différentes familles.

Tableau 2.3 Les trois différentes familles de calorimètre avec le type de mesure pour chacune des familles ainsi que l'applicabilité des différents transducteurs utilisés dans les microcalorimètres

Familles de calorimètre	Type de mesure	Transducteurs
Adiabatique	Mesure absolue de la température	Résistance thermique (RTD) (↑↑) Thermopile (↓) Effet Peltier (↓↓)
Isopéribolique	Mesure de différence de température	Résistance thermique (RTD) (↓) Thermopile (↑) Effet Peltier (↓↓)
Isotherme	Mesure de flux de chaleur	Résistance thermique (RTD) (↓↓) Thermopile (↑) Effet Peltier (↑)

2.2.5 Microcalorimètre microfabriqué

Il existe plusieurs groupes qui travaillent sur des microcalorimètres microfabriqués [20,50,51,53–63]. Les travaux de recherches sur ce type de calorimètre datent des années 80 [64], par contre il faut attendre les années 90 pour voir les premières mentions de dispositifs performants pour des mesures en phase gazeuse par le groupe de Herwaarden [53]. Les travaux de ce groupe ont mené aux technologies de la compagnie Xesor¹⁰, soit l'utilisation d'une membrane pour diminuer au maximum la conductivité thermique pour obtenir la meilleure sensibilité, tout en gardant une très bonne diffusivité thermique afin d'avoir une constante la plus courte possible. La figure 2.11 montre le concept de Xesor et plusieurs groupes utilisent directement leur technologie pour des applications diverses [55,65].

¹⁰ <http://www.xensor.nl/index.htm>

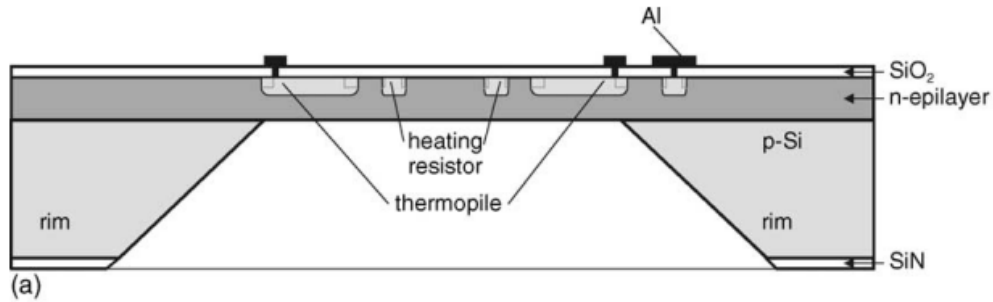


Figure 2.11 Microcalorimètre de Xesor pour des mesures en milieux aqueux [66]¹¹

Le principe d'isolation de Xesor [67] est utilisé par presque tous les groupes [20,50,56]. Ce qui différencie les groupes, c'est la technologie de transduction et les techniques de fabrication. L'utilisation d'une membrane ne permet pas une isolation totale, ce qui en fait des calorimètres fonctionnant en régime isotherme, tel que démontré par le modèle montré à l'équation (2.8) à la section 2.2.3. Avec ce type de calorimètre, la chambre calorimétrique (CC) et la gaine thermostatée (GT) ne sont pas franchement séparées par une frontière physique. La figure 2.12 montre que la chambre (CC) est située sur la membrane de ce type du calorimètre, l'enceinte est habituellement directement reliée au lieu de la réaction thermique. Tout le reste du calorimètre et de l'espace sont la gaine. L'isolation entre la gaine et la chambre est reliée aux caractéristiques de conduction thermique de l'environnement, des matériaux et de la géométrie.

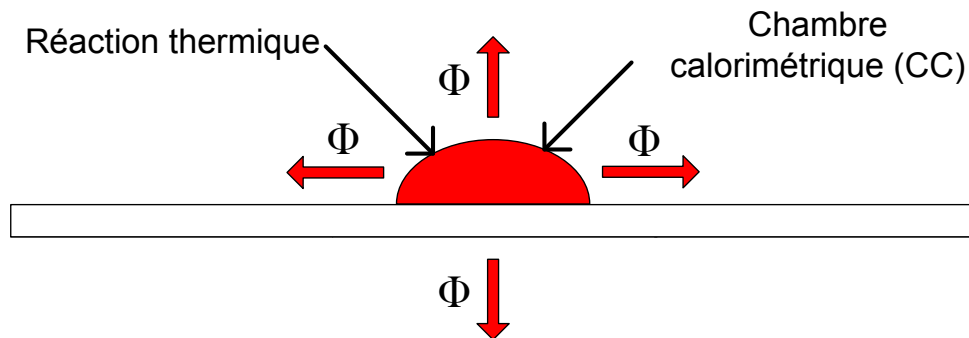


Figure 2.12 Explication du principe du calorimètre à membrane

¹¹ Reproduit avec la permission de ELSEVIER SCIENCE via Copyright Clearance Centre, 63548565

2.2.6 Microcalorimétrie microfabriquée pour l'analyse moléculaire

La microcalorimétrie est régulièrement utilisée pour l'analyse d'interaction intermoléculaire [20,34,57,68–72]. La grande majorité de ces groupes travaille avec des réactions de volume, possiblement parce qu'il est complexe de fonctionnaliser une membrane de quelques centaines de nanomètres. Dans les groupes mentionnés ci-haut seulement Recht et al. [70] travaillent avec une fonctionnalisation de surface, mais, avec une membrane de plusieurs dizaines de micromètres, ce qui augmente la résistance mécanique du dispositif, mais qui diminue les performances calorimétriques.

Deux groupes [34,72] travaillent pour des détections d'interaction intermoléculaire à l'interface liquide solide, mais par contre ils utilisent des microcalorimètres qui ne sont pas microfabriqués.

Le plus gros problème pour être en mesure de réaliser un microcalorimètre microfabriqué pour la détection d'interaction biomoléculaire à l'interface liquide/solide est probablement dû à la difficulté de réussir à fonctionnaliser la surface du calorimètre constitué d'une membrane, membrane composée habituellement de nitrure mince et fragile.

2.3 Résonance des plasmons de surfaces (SPR)

Dans la présente section, le principe de la détection de surface utilisant la SPR sera présenté. Il est important de bien comprendre le phénomène de la résonance des plasmons¹² pour comprendre les différentes interactions et critères pour sa mise en œuvre et cela particulièrement dans un système couplé.

Les plasmons de surface sont un phénomène physique qui se produit à l'interface d'un diélectrique et d'un métal. Il s'agit d'oscillations d'électron dont la propagation peut être décrite par la théorie électromagnétique. Cette oscillation collective d'électrons donne lieu à un champ électrique évanescent dont les caractéristiques de propagation sont

¹² Un plasmon est une oscillation de plasma à l'interface. Ce qui en fait une quasiparticule résultant de la quantification de fréquence plasma.

directement reliées aux permittivités (ε) du diélectrique et du métal. L'interface agit tel un guide d'onde pour l'onde électromagnétique.

La figure 2.13 montre une représentation de l'onde évanescente à l'interface métal/diélectrique.



Figure 2.13 Représentation de l'onde évanescence SPR à l'interface métal/diélectrique

2.3.1 Propagation d'une onde à une interface métal/diélectrique

La propagation de l'onde évanescence à l'interface métal/diélectrique est expliquée par la résolution des équations de Maxwell à l'interface. Ces équations montrent qu'une onde plane se propageant avec une polarisation transverse magnétique à l'interface à une constante de propagation qui est définie par [73] :

$$\beta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} = k \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \quad (2.18)$$

où c est la vitesse de la lumière dans le vide, ω est la fréquence angulaire, ε_d et ε_m sont respectivement les permittivités du diélectrique et du métal et k représente le nombre d'onde.

Un métal est habituellement absorbant pour une onde électromagnétique. Cela se traduit par une permittivité complexe ($\varepsilon_m = \varepsilon'_m + i\varepsilon''_m$). Dans ce cas l'équation (2.18) a une partie réelle et une partie imaginaire $\beta = \beta' + i\beta''$. La partie réelle β' représente le mode de propagation à l'interface et la partie imaginaire β'' représente l'atténuation. L'atténuation peut être reliée à la longueur de propagation de l'onde. Considérant une atténuation d'un

facteur $1/e$ de l'énergie de l'onde, alors il est possible de décrire la longueur de propagation L par [73] :

$$L = \frac{1}{2\beta''} \quad (2.19)$$

2.3.2 Excitation des plasmons de surface

Il est important d'étudier les méthodes utilisées pour exciter les plasmons de surface. Pour exciter les plasmons avec une onde extérieure, il est nécessaire que la constante de propagation de l'onde d'excitation soit égale à la constante de propagation des plasmons.

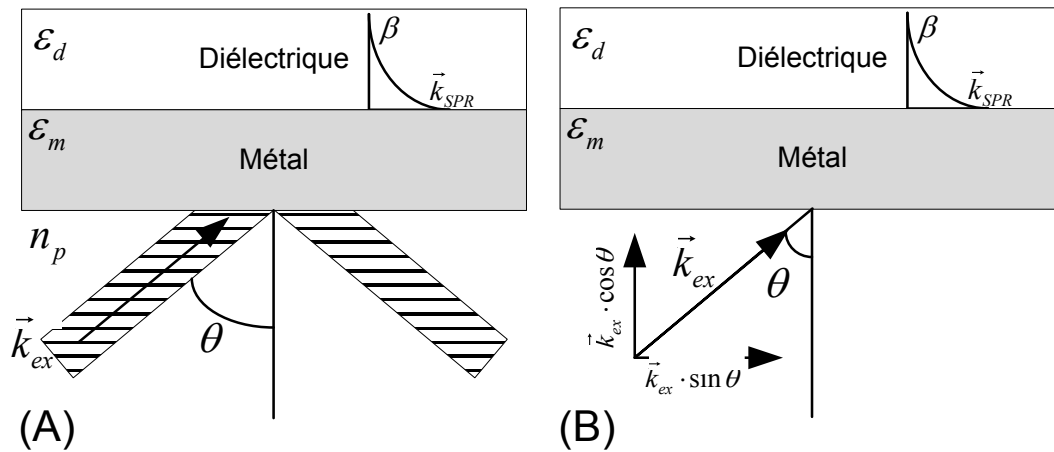


Figure 2.14 Représentation de l'excitation des plasmons par une onde incidente

En regard de la figure 2.14, la constante de propagation de l'onde incidente et la constante de propagation SPR doivent être égales :

$$\vec{k}_{ex} \cdot \sin \theta = \vec{k}_{SPR} = \beta \quad (2.20)$$

Sur le plan de l'indice effectif, cette condition de couplage peut s'écrire de la manière suivante :

$$n_{SPR}^{ef} = \text{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \right\} = n_p \sin \theta \quad (2.21)$$

Où n_{SPR}^{ef} est l'indice effectif des plasmons et n_p est l'indice réel du milieu de propagation de l'onde incidente. Pour obtenir un couplage, il est important que l'indice du milieu de

propagation de l'onde incidente soit plus élevée que l'indice effectif du plasmon. La figure 2.15 montre l'indice effectif du plasmon (n_{SPR}^{eff}) pour un couple or-eau. L'indice de ce cas de figure est entre 1.35 et 1.6, ce qui signifie qu'il n'est pas possible d'exciter des plasmons avec une onde qui se propage dans l'air (trait noir sur la figure 2.15). Avec un milieu de propagation à indice plus élevé, tel que du BK7 (verre), il est possible d'exciter les plasmons. Sur la figure 2.15, la courbe en bleu montre l'indice effectif pour une onde incidente qui se propage dans du BK7 avec un angle d'incidence (θ) de 75° . L'indice effectif de l'onde se propageant dans le BK7 coupe deux fois la courbe de l'indice effectif des plasmons pour le couple or-eau (représenté par des cercles noir sur le graphique), à ces deux points l'onde incidente va exciter les plasmons, car les indices effectifs sont égaux.

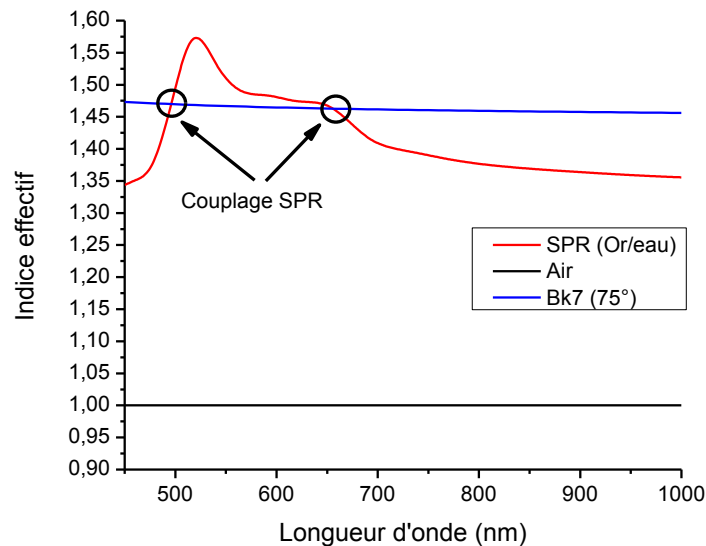


Figure 2.15 Graphique représentant l'indice effectif SPR en fonction de la longueur d'onde pour un couple or-eau (en rouge) comparée à l'indice effectif qu'une onde incidente pour un cas où le milieu d'incidence est de l'air $n_p = 1$ (en noir) et pour un cas où le milieu incident est du BK7 (verre) avec un angle incident θ de 75° en bleu.

2.3.3 Couplage

Il existe plusieurs méthodes pour coupler une onde incidence avec des plasmons, tel que le couplage par réseau de diffraction, par guide d'onde et par prisme [73]. Le système réalisé durant cette thèse a utilisé le couplage par prisme et le couplage par guide d'onde

fut exploré. C'est pour cette raison que ces deux approches vont être expliquées dans la présente section.

Couplage par prisme

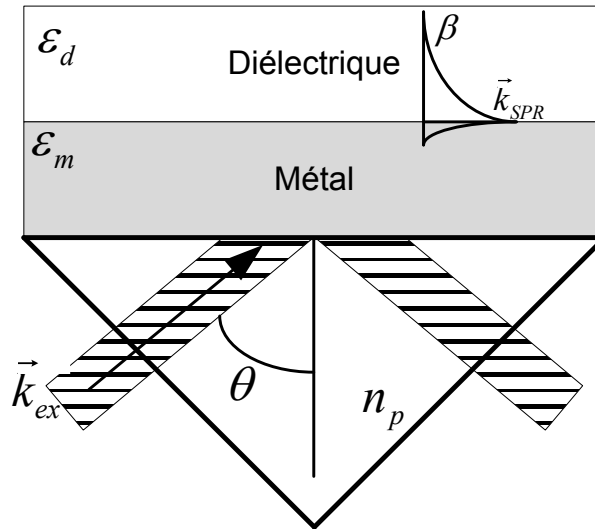


Figure 2.16 Exemple de couplage par prisme

La figure 2.16 montre le couplage par prisme. Ce couplage est intéressant, car il est possible de choisir le matériau du prisme en fonction de l'indice effectif des plasmons et ainsi contrôler l'angle θ du couplage pour une certaine longueur d'onde. Cela permet des mesures en réflexion totale atténuée (ATR).

Lorsqu'une onde électromagnétique incidente frappe une interface constituée de deux milieux d'indices de réfraction différents, une fraction ou la totalité de l'onde incidente va être réfléchi tout dépendamment des indices des deux milieux et de l'angle d'incidence. Pour un système en configuration Kretschmann, prisme-métal-diélectrique, tel que montré sur la figure 2.16, cela se traduira par une onde réfléchi dont l'amplitude (A_R) va être :

$$A_R = r_{pmd} A_I = |r_{pmd}| e^{i\phi} A_I \quad (2.22)$$

où A_I est l'amplitude de l'angle incidente, r_{pmd} est le coefficient de réflexion et ϕ est le déphasage de l'onde réfléchi. Ici r_{pmd} est défini par :

$$r_{pmd} = \frac{r_{pm} + r_{md} \exp(2ik_{mx}q)}{1 + r_{pm}r_{md} \exp(2ik_{mx}q)} \quad (2.23)$$

où q est l'épaisseur du métal et k_{mx} est le nombre d'onde de l'onde incidente dans le métal dans la direction de propagation des plasmons [74] et :

$$r_{ij} = \frac{k_i \cdot \cos \theta - k_j \cdot \cos \theta}{k_i \cdot \cos \theta + k_j \cdot \cos \theta} \text{ pour l'onde polarisée TE} \quad (2.24)$$

$$r_{ij} = \frac{\varepsilon_j k_i \cdot \cos \theta - \varepsilon_i k_j \cdot \cos \theta}{\varepsilon_j k_i \cdot \cos \theta + \varepsilon_i k_j \cdot \cos \theta} \text{ pour l'onde polarisée TM} \quad (2.25)$$

Les équations (2.24) et (2.25) sont appelées coefficients de Fresnel. Puisqu'il est possible de coupler les plasmons avec l'onde TM, il est possible de définir un coefficient de réflectivité en fonction de la propagation des plasmons. Dans ce cas, la réflectivité peut s'exprimer par le modèle Lorentzian de Rather [73] :

$$R(\theta, \lambda) = \left[1 - \frac{4 \operatorname{Im}\{\beta\} \operatorname{Im}\{\Delta\beta\}}{\left[k_{spr} \cdot \sin \theta - \operatorname{Re}\{\beta\} \right]^2 + \left(\operatorname{Im}\{\beta\} + \operatorname{Im}\{\Delta\beta\} \right)^2} \right]^{1/2} \quad (2.26)$$

où $\Delta\beta$ représente la modification de la propagation des plasmons dus à l'épaisseur considérée finie du métal.

L'équation (2.26) est en fonction de l'angle et de la longueur d'onde, il est possible de définir un couple (angle et longueur d'onde), où la résonance des plasmons va se produire. À longueur d'onde fixe, il s'agit de l'angle où il va y avoir le maximum de transfert d'énergie de l'onde incidente vers les plasmons pour une longueur d'onde spécifique. À cet angle, la réflexion va être minimale. Ce minimum correspond à l'angle où l'indice effectif de l'onde incidente et des plasmons sont égaux, la figure 2.17 (a) montré la réflectivité en fonction de l'angle. Dans cette figure il est possible de voir le « *dip* » SPR à 75°.

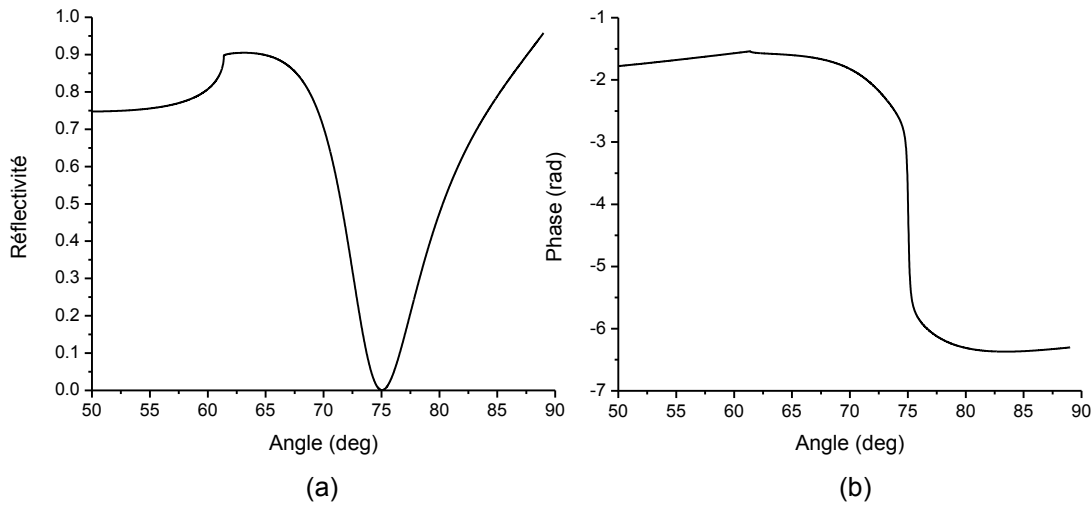


Figure 2.17 Réflectivité (a) et changement de la phase (b) en fonction de l'angle pour le système montré à la figure 2.16.

La figure 2.17 montre un changement de l'amplitude de réflexion lors de la résonance des plasmons de surface. Il y a également un saut de phase qui se produit lors du couplage de l'onde avec les plasmons, ce saut de phase peut aussi être mesuré pour quantifier le couplage [75]. Le saut de phase est montré à la figure 2.17 (b).

Puisque pour avoir un couplage avec les plasmons il faut avoir le bon couple angle et longueur d'onde, il est possible de moduler les plasmons en changeant l'angle (figure 2.17) ou la longueur d'onde (figure 2.18). Pour ce faire, une onde polychromatique à angle constant est utilisée pour coupler les plasmons. Une analyse spectrale permet de déterminer la longueur d'onde de couplage. La figure 2.18 montre le « *dip* » SPR lorsque la modulation est la longueur d'onde plutôt que l'angle.

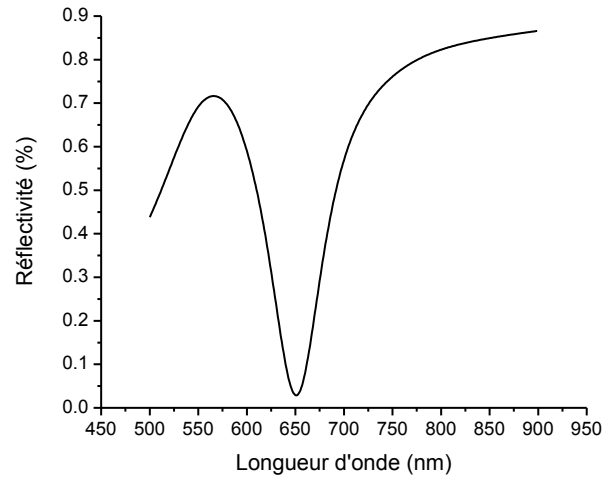


Figure 2.18 Réfectivité en fonction de la longueur pour une mesure SPR lorsque l'angle est constant

Couplage par guide d'onde

Les plasmons peuvent être couplés en utilisant un mode guidé par un guide d'onde. La figure 2.19 montre un exemple de structure d'un guide d'onde couplant des plasmons à une interface métal- n_{milieu} . Dans le système, un mode incident TM est guidé par une structure d'indice de réfraction n_1 avec une gaine composée du milieu avec l'indice de réfraction n_3 et d'une seconde gaine composée du milieu avec l'indice effectif n_{milieu} . Pour que le couplage SPR se produise, il faut que la constante de propagation du mode TM à l'intérieur du guide d'onde (β_{TM}) soit égale à la partie réelle de la constante de propagation des plasmons $\text{Re}\{\beta_{SPR}\}$:

$$\beta_{TM} = \text{Re}\{\beta_{SPR}\} = \text{Re}\left\{\frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right\} \quad (2.27)$$

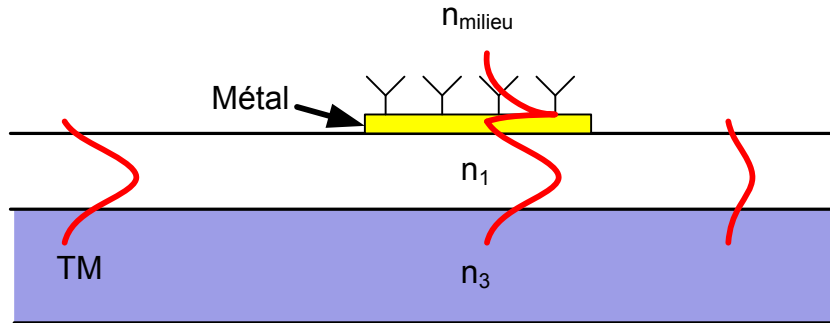


Figure 2.19 Représentation d'un guide d'onde qui excite des plasmons de surface à partir d'un mode guidé.

De tels systèmes furent développés par plusieurs groupes [76–80]. Le plus gros problème avec ce type de structure est qu'il est difficile de réussir à avoir une constante de propagation du mode guidé (β_{TM}) aussi faible que la constante de propagation SPR (β_{SPR}) en utilisant les matériaux standards pour fabriquer des guides d'ondes. Ce qui rend la mise en œuvre d'un tel système complexe, par contre ce type de système est idéal pour une intégration.

2.3.4 Utilisation de capteur SPR appliquée à la détection biologique

La dernière section montre comment il est possible de coupler une onde électromagnétique aux plasmons à une interface métal diélectrique. L'équation de dispersion du couplage montre que l'indice effectif de couplage est très sensible à la permittivité du diélectrique et du métal. Puisque l'amplitude de l'onde évanescente est de quelques centaines de nanomètres [73], c'est seulement les caractéristiques du diélectrique à l'intérieur du champ électrique, près de l'interface, qui vont définir le couplage SPR. Si le diélectrique est non magnétique, il est possible de relier l'indice de réfraction à la permittivité relative, par [81] :

$$n^2 \approx \varepsilon \quad (2.28)$$

et l'équation de dispersion des plasmons devient alors :

$$\beta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{n_d^2 \varepsilon_m}{\varepsilon_m + n_d^2}} = k \sqrt{\frac{n_d^2 \varepsilon_m}{\varepsilon_m + n_d^2}} \quad (2.29)$$

Si la surface du métal est fonctionnalisée avec les sondes de notre biorécepteur et que le fluide biologique avec les cibles est le diélectrique, lorsque la reconnaissance des cibles va se produire, cela va provoquer un changement d'indice de réfraction. Ce changement d'indice pourra être mesuré en suivant la longueur d'onde ou l'angle de couplage SPR.

La figure 2.20 montre le principe de l'utilisation de la SPR en biocapteur de surface. Dans la partie (a) de la figure, le système n'a pas encore fait de reconnaissance intermoléculaire, le biorécepteur est présent, mais aucune cible n'a encore réagi. L'indice de réfraction à l'interface (n_d) caractérise la propagation du plasmon. Dans la partie (b) de la figure, les cibles ont interagi avec les sondes du biorécepteur. L'apport des cibles près de la surface va modifier l'indice de réfraction du diélectrique de (n_d) à ($n_d + \Delta n$). Ce changement d'indice de réfraction va modifier la constante de propagation de l'onde SPR de β à $\beta + \Delta\beta$. Le changement de la constante de propagation va apporter un changement dans les mesures SPR. La figure 2.21 montre des spectres SPR pour deux indices de réfraction différents. Il est possible de relier le changement de la longueur d'onde où le couplage est maximal et de relier ce changement à la détection des interactions biologiques désirée.

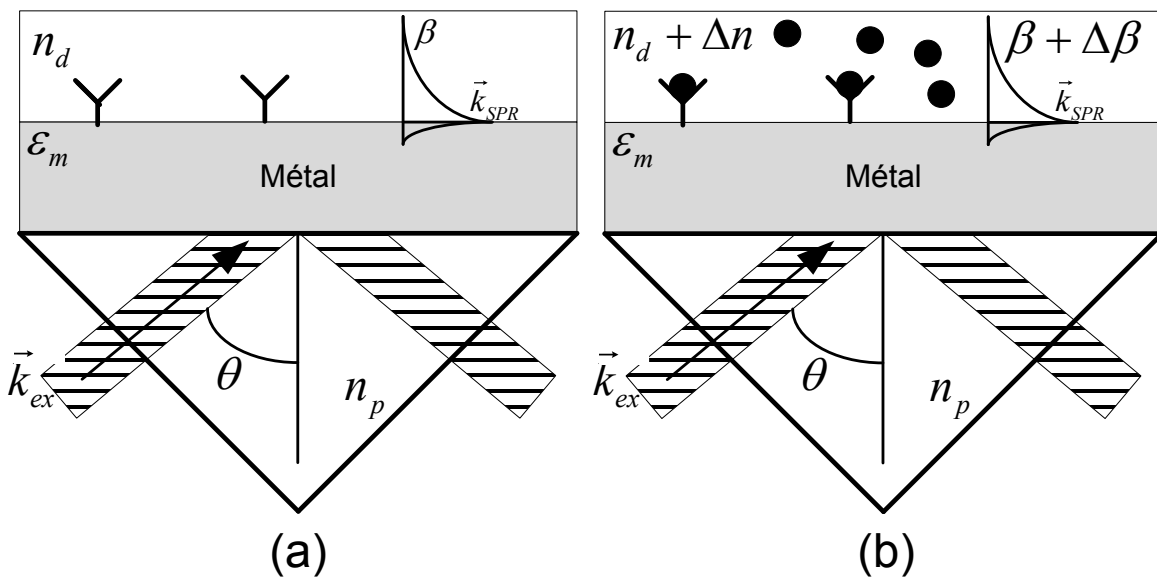


Figure 2.20 Représentation du principe de l'utilisation de la SPR (a) Système SPR avec le biorécepteur à la surface du métal avant la reconnaissance (b) Système SPR avec le biorécepteur à la surface du métal avec reconnaissance intermoléculaire réalisé par le biorécepteur

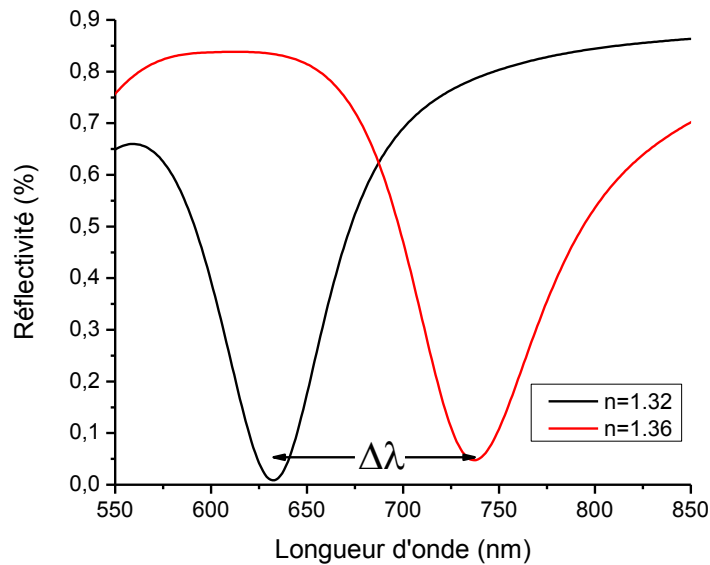


Figure 2.21 Réflectivité de l'onde pour deux indices de réfraction différents du diélectrique juste au-dessus du métal

Différents biocapteurs SPR

C'est Nylander et Liedberg qui furent les premiers à utiliser la résonance des plasmons pour la réalisation d'un capteur de gaz [82]. Depuis cette époque, il y a eu de nombreux développements de capteurs SPR appliqués à la biologie. Ces biocapteurs peuvent être utilisés pour analyser des comportements cellulaires [83], de la détection de gènes sur puce à ADN [84–86], des cinétiques d'adsorption [87,88], etc..

2.4 Transfert de masse

Jusqu'à maintenant, les techniques de transduction appliquées à la biodétection ont été explicitées. Même avec un couple transducteur/biorécepteur performant, si la fluidique limite l'apport de cibles vers les sondes du biorécepteur, celle-ci sera la partie qui limitera le capteur [21,25].

C'est pour cette raison qu'il est important de comprendre les principes du transfert de masse. Cette section présente les principes de transfert de matière ainsi que les problèmes reliés à la détection de surface.

2.4.1 Diffusion de la matière

La diffusion de la matière décrit le transfert de masse de différentes espèces chimiques dues à la présence d'un gradient de concentration d'une ou de plusieurs espèces dans un fluide. Ce phénomène est décrit par les lois de Fick [45]. La première loi de Fick met en relation la concentration d'une espèce chimique d'un milieu (A) d'un milieu (B), celle-ci peut s'écrire sous la forme :

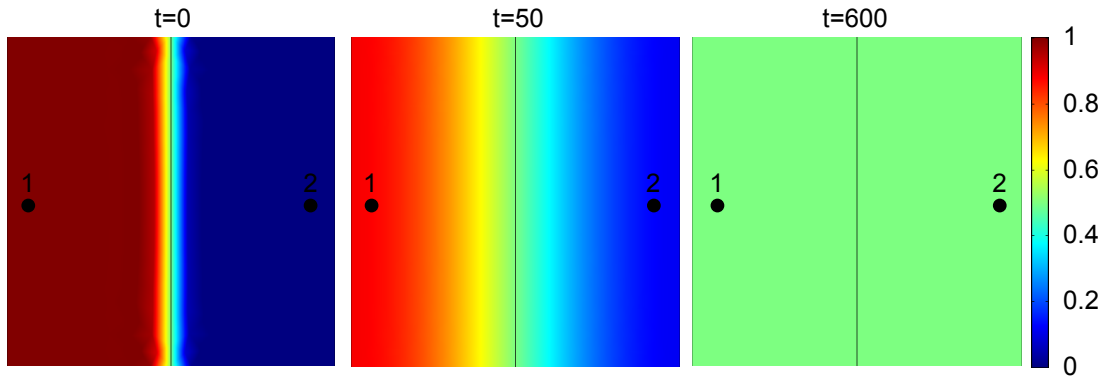
$$J_A = -D_{AB} \vec{\nabla} C_A \quad (2.30)$$

où J_A est le flux de l'espèce chimique A en mol/s*m², D_{AB} est le coefficient de diffusion de l'espèce chimique A dans le milieu B en m²/s¹ et C_A est l'espèce A en mol/m³.

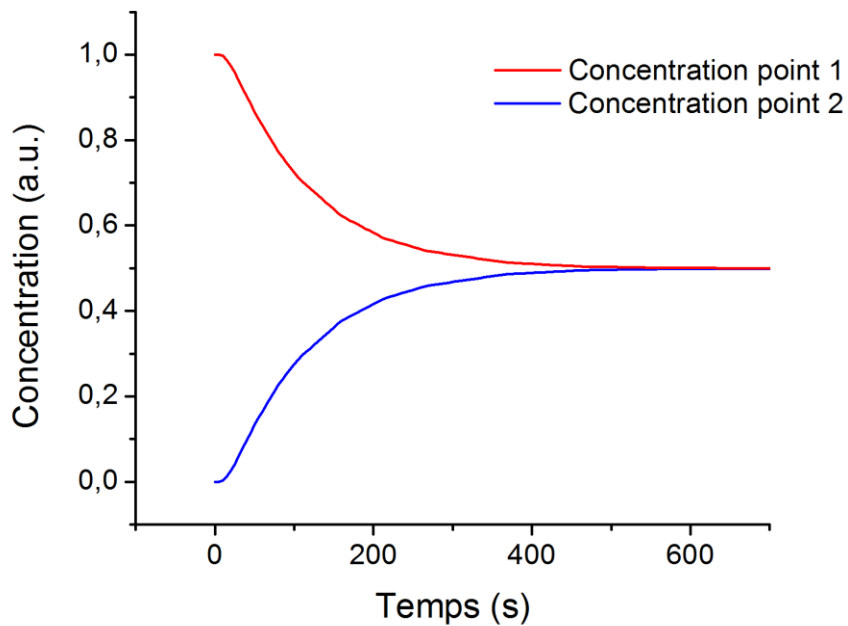
La deuxième loi de Fick se rapporte à la conservation d'espèces chimiques dans un volume donné. C'est-à-dire que la variation par unité de temps de la quantité d'une espèce chimique doit être égale au flux de particules dans ce même volume. En intégrant les lois de Fick, il est possible de déduire une équation de diffusion sous la même forme que l'équation de Fourier, soit :

$$\frac{dC_A}{dt} - D_{AB} \Delta C_A = 0 \quad (2.31)$$

La figure 2.22 montre un exemple de diffusion d'une espèce chimique. Dans cet exemple, il est possible de voir un système composé de deux différents domaines, le domaine 1 et le domaine 2. Les conditions initiales sont la présence d'une concentration d'une espèce chimique dans le domaine 1 et une concentration nulle dans le domaine 2 au temps 0. Il n'y a aucun apport de particules au système et le système est considéré fermé. Une fois le système mis en route, la concentration du domaine 1 va diminuer et celle du domaine 2 va augmenter jusqu'à un point d'équilibre où les deux systèmes vont avoir la même concentration.



(a) Présentation à 3 temps différents de la concentration de l'espèce chimique dans les deux domaines. À $t=0$ il y a présence d'espèces chimiques seulement dans le domaine 1 ou la concentration est de 1. À $t=600$ la concentration des deux domaines est égale à 0.5.



(b) Graphique montrant la concentration au point 1 et un point 2 du système en fonction du temps

Figure 2.22 Exemple du principe de diffusion

2.4.2 Convection de matière

Tout comme pour le transfert de chaleur par convection où le mouvement des particules engendre un transfert de chaleur, un mouvement de particule apporte un transfert de masse. Le modèle utilisé pour décrire le transfert de masse par convection est semblable à celui utilisé pour le transfert de chaleur, soit :

$$N_{A,1} = h_m (C_{A,1} - C_{A,\infty}) \quad (2.32)$$

où $N_{A,1}$ est le flux de l'espèce chimique A à travers la surface 1 en (moi/s*m²). h_m est le coefficient du transfert de masse par convection, $C_{A,1}$ est la concentration de l'espèce A au plan 1 et $C_{A,\infty}$ est la concentration de l'espèce A à l'infinie.

2.4.3 Limite de diffusion

Le transport de masse tel que décrit aux sections 2.4.1 et 2.4.2 est valide lorsque les milieux sont continus, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de conditions limites. Lorsqu'il y a une condition limite le modèle de diffusion doit intégrer une non-linéarité à l'interface tel que décrit par Ward et *al.* [89,90].

La résolution de l'équation de diffusion pour une condition limite constituée d'un plan fut décrite par Ward et *al.* [89] en 1946. La résolution de cette équation est basée sur une méthode semblable à celle utilisée pour la résolution de l'équation de conduction de chaleur avec une condition limite de température à une interface. La résultante est une équation différentielle non linéaire, ce cas de figure fut résolu numériquement par Rampazzo en 1969 [91] pour une isotherme de Frumkin.

Le modèle de Ward montre qu'il y a une forte dépendance entre la création d'une zone à faible concentration près de la surface, du temps et de la distance du substrat. La figure 2.23 montre cette dépendance en distance et dans le temps de l'équation de diffusion. Ce gradient est relié à la limite de diffusion et celui-ci peut nuire à la détection de surface en diminuant l'apport de cible au biorécepteur.

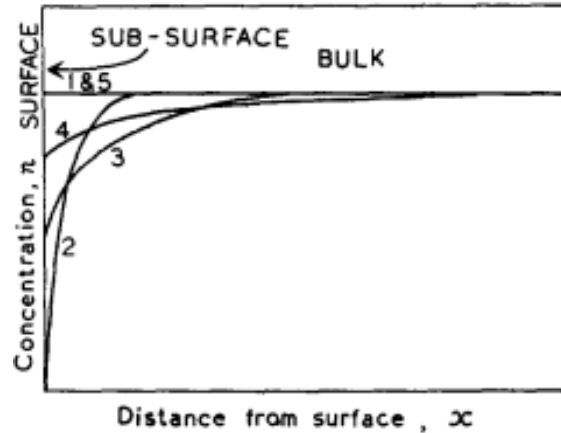


Figure 2.23 Représentation de l'effet de bord sur l'équation de diffusion à différents moments dans le temps (1) initial (2), (3) et (4) intermédiaire et (5) final [89]

2.4.4 Méthode de mélange

Il est possible de diminuer significativement l'impact de la limite diffusion en mélangeant la solution. La solution peut être mélangée par un système de mélange passif ou actif [24]. Les systèmes de mélange passif sont associés au système qui n'a pas besoin d'énergie externe pour effectuer le mélange et les systèmes de mélange actif sont associés aux systèmes qui ont besoin d'apport d'énergie externe pour effectuer le mélange.

Un type de système de mélange actif est l'utilisation des ondes acoustiques de surface (SAW) [92]. Ce type de système fut également utilisé pour le mélange avec des systèmes SPR [93].

Les ondes SAW peuvent être générées à la surface d'un matériel piézoélectrique par l'entremise d'électrode où l'on applique un champ électrique alternatif [94]. L'onde SAW transmet une énergie mécanique au fluide ce qui va créer une pression dans le fluide à un angle θ_R .

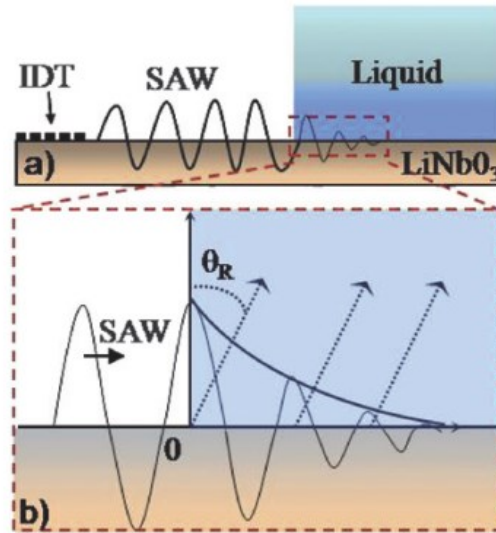


Figure 2.24 Diagramme montrant la génération d'ondes acoustiques de surface et l'interaction de celle-ci avec un fluide [93]¹³.

2.5 Conclusion

Tout au long de ce chapitre, il fut montré les différentes parties qui devront être utilisées pour la réalisation de la thèse. La théorie nécessaire pour la compréhension des relations entre les différentes parties, ainsi que les caractéristiques, que chacune des parties doivent avoir. La figure 2.25 résume les points importants et les tableaux 2.4, 2.5 et 2.6 donnent les points importants du cahier de charges du système.

Pour la microcalorimétrie :

Tableau 2.4 Cahier de charge du microcalorimètre

Cahier de charge	Raison
Faible conductivité thermique $\downarrow k$	Bonne sensibilité à la puissance en régime permanent
Faible chaleur spécifique $\downarrow c$	Zone avec un régime transitoire la plus courte possible
Haute diffusivité thermique $\uparrow \alpha$	Zone avec un régime transitoire la plus courte possible
Bonne sensibilité du transducteur	Bonne sensibilité à une différence de température

Pour avoir un régime transitoire court, la diffusivité thermique (α) doit être la plus élevée possible, ce qui implique une conductivité thermique (k) la plus élevée possible. Cela est contradictoire avec la sensibilité en régime permanent où la conductivité thermique doit

¹³ Reproduit avec la permission de la ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY via Copyright Clearance Center, 3287140793865

être la plus faible possible. Il est important de s'assurer de faire les bons choix de conception à ce sujet.

Tableau 2.5 Cahier de charge du système SPR

Cahier de charge	Raison	Conséquence
Surface en métal noble tel que de l'or	Phénomène SPR se produit seulement sur une surface de métal noble	Obligation de fonctionnaliser le biorécepteur sur un métal
Compatible avec un système de couplage	Le phénomène SPR doit être excité par une onde incidente à l'aide d'un système de couplage	Le système doit être fait dans matériaux optiquement compatibles
Système suffisamment sensible pour une mesure d'hybridation d'ADN		

Pour le transport de masse :

Tableau 2.6 Cahier de charge du système de transport de masse

Cahier de charge	Raison	Conséquence
Avoir un système de mélange	Sans système de mélange, il y a un risque important d'être en situation de limite de diffusion et ainsi changer la cinétique de biorecognition ou de diminuer le signal au transducteur	Intégrer un système de mélange actif basé sur des technologies d'ondes acoustiques de surface
Ne pas diminuer le signal ou injecter du bruit dans la mesure des transductions	Pour ne pas diminuer le taux de signal sur bruit	Il serait possible de ne plus être en mesure de réaliser une mesure

Finalement le tableau 2.7 liste des risques possibles lors de la réalisation du système.

Tableau 2.7 Risques associés à la réalisation du système dont il devrait être tenu compte dans la réalisation du projet

Risque	Conséquence
Compatibilité du procédé de fabrication entre les deux modalités	Difficulté au niveau de la fabrication et du rendement du procédé
Interférence entre les mesures (« cross-talk »)	Diminution du taux de signal sur bruit des mesures
Possibilité de fonctionnalisation des deux transducteurs de manière identique	Changement du rendement des interactions intermoléculaires à l'interface et impossibilité d'en tirer une conclusion.
Utilisation de matériaux non adaptés pour les deux techniques	Difficulté avec le dispositif final d'effectuer les deux mesures de manière simultanée
Interférence avec le système de mélange	Injection de chaleur de la part du système de mélange, ce qui risque d'apporter du bruit à la mesure

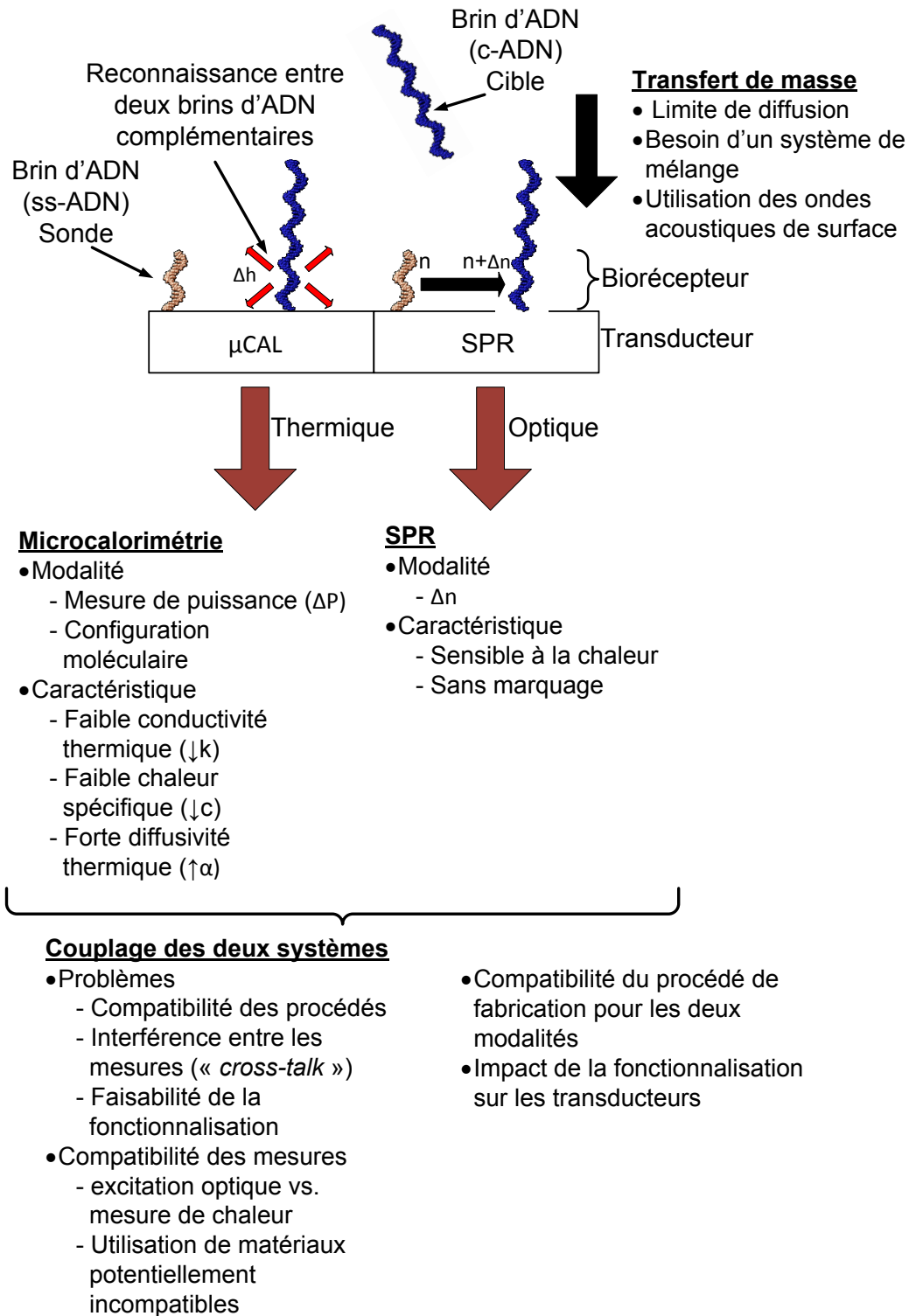


Figure 2.25 Récapitulatif de système complet avec les caractéristiques

CHAPITRE 3 MODÉLISATION DU CAPTEUR

Les choix technologiques qui furent faits seront explicités dans ce chapitre. Les différentes parties du système qui vont être abordées seront les suivantes :

- Le modèle biologique de l'hybridation de l'ADN,
- Le principe de fonctionnalisation pour la formation du biorécepteur,
- Les choix technologiques pour la conception du microcalorimètre,
- Les choix technologiques pour la conception du système SPR et
- Les choix technologiques pour la conception du système actif de transport de masse

Il est important d'analyser dans un premier temps les différentes parties afin de bien quantifier l'impact des choix sur les différentes parties du système. À la fin du chapitre, une vue d'ensemble du système complet sera présentée.

3.1 Modèle de l'hybridation de l'ADN et ses caractéristiques

L'analyse des caractéristiques thermodynamiques et optiques de l'hybridation d'ADN comme modèle biologique pour la fonctionnalisation de surface du dispositif va permettre de déterminer les performances que devront avoir les transducteurs des deux différentes modalités du système couplé. En utilisant le modèle thermodynamique du plus proche voisin développé par SantaLucia [36], ainsi qu'une modélisation à l'aide des équations de Fresnel, il sera possible de déduire les changements physiques, soit le dégagement de chaleur et la puissance pour la calorimétrie ainsi que le changement d'indice de réfraction pour la résonance des plasmons de surface (SPR) pour une hybridation entre les brins sondes du biorécepteur et les brins cibles du fluide biologique.

Pour les simulations deux séquences différentes vont être utilisées. Le tableau 3.1 montre ces deux séquences d'ADN.

Tableau 3.1 Séquences d'ADN utilisées lors de la modélisation

Nom	Séquence		Nombre de nucléotides
AL 185	5'-GCTAATCCAACGCGGGCCAATCCTT-3'	Sonde	25
	5'-AAGGATTGGC CCGCGTTGGA TTAGC-3'	Cible	
AL HPA1a	5'-GTGAGCCCAGAGGCAGGG-3'	Sonde	18
	5'-CCCTGCCTCTGGGCTCAC-3'	Cible	

3.1.1 Modélisation de l'hybridation pour la SPR

La mesure de l'hybridation par SPR peut se modéliser pour déterminer la réponse attendue pour les différents états du système, soit ADN non hybridé et ADN hybridé. La figure 3.1 montre le système SPR avant et après l'hybridation.

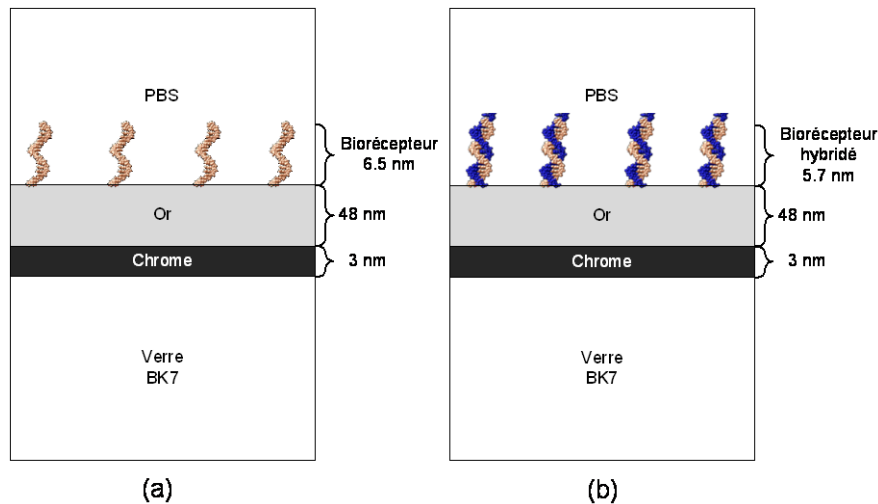


Figure 3.1 Schéma utilisé pour la simulation de l'hybridation SPR et l'analyse calorimétrique

Pour effectuer la simulation, un programme¹⁴ utilisant la méthode Abeles pour résoudre les équations de Fresnel pour un système à plusieurs interfaces fut utilisé. Les paramètres pour les couches d'ADN sont donnés par Elhadj et *al.* [95] pour un brin d'ADN de 27 mers et ils sont résumés au tableau 3.2. Les caractéristiques des métaux ont été prises dans le « *Handbook of optical constants of solids* » [96].

¹⁴ Ce programme fut développé par Vincent Chabot et Pierre-Jean Zermatten

Tableau 3.2 Paramètres physiques des différentes parties du modèle utilisé pour la simulation SPR (voir figure 3.1)

Paramètre	Valeur	Référence
Densité des sondes d'ADN	9×10^{11} molécule/cm ² (1.49 pmole/cm ²)	[95]
Épaisseur du film de sonde d'ADN	6.5nm	[95]
Indice de réfraction du film de sonde	$1.455 + 2 \times 10^{-4}i$	[95]
Épaisseur du film d'ADN hybridé	5.7 nm	[95]
Indice de réfraction du film d'ADN hybridé	$1.53 + 22 \times 10^{-4}i$	[95]
Or	Voir les valeurs en annexe h	[97]
Chrome	Voir les valeurs en annexe h	[96]
PBS	1.334	

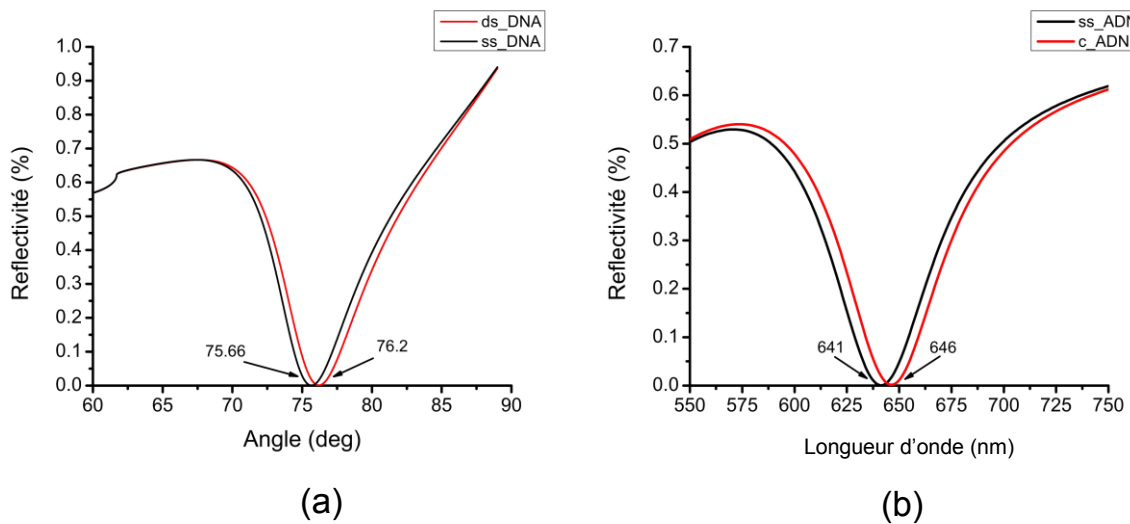


Figure 3.2 Résultat de la simulation de la résonance SPR pour l'ADN lorsqu'il y a seulement les sondes (courbe noire, figure 3.1 a)) et une fois que l'hybridation entre les sondes et les cibles ont eu lieu (courbe rouge, figure 3.1 b)). La courbe en a) représente le changement de résonance SPR lorsque la modulation en angle est utilisée et la courbe en b) représente le changement lorsque la modulation par longueur d'onde est utilisée

Lors d'une hybridation d'ADN sur substrat d'or, le changement de couplage SPR va se répercuter par un changement de l'ordre de 0.5° (excitation à 635 nm) pour une modulation en angle et d'environ 5 nm pour une modulation en longueur d'onde avec un angle d'attaque de 75° tel que montré à la figure 3.2. Ce changement correspond à une sensibilité de 10^{-4} RIU¹⁵. Les appareils de mesure SPR peuvent arriver aisément à des

¹⁵ « *Refractive Index Units* »

niveaux de sensibilité de 10^{-6} RIU [98]. La détection par résonance de plasmons de l'hybridation des cibles d'ADN sur les sondes du biorécepteur ne devrait pas être problématique.

3.1.2 Énergie et puissance thermique dégagées lors de l'hybridation d'ADN

Pour déterminer la sensibilité minimale que devrait avoir le microcalorimètre du système il faut déterminer dans un premier temps l'énergie dégagée par l'hybridation des brins sondes et des brins cibles et il faut déterminer la cinétique de l'hybridation. Avec ses deux paramètres, il sera possible d'en déduire la puissance dégagée par l'hybridation de l'ADN et ainsi la sensibilité minimale.

Énergie dégagée lors de l'hybridation

Pour déterminer l'énergie dégagée lors de l'hybridation, le modèle du plus proche voisin développé par SantaLucia [36] fut utilisé. Le modèle de SantaLucia fut amélioré par le groupe de Zucker [99] afin de prendre en compte la formation de boucles internes lors de l'hybridation et les « *mismatches* » d'hybridation entre deux brins semi-complémentaires. La simulation proprement dite a été effectuée à l'aide d'un logiciel mis à disposition par le groupe de Zucker et al. [100], ce logiciel permet de calculer les caractéristiques thermodynamiques pour une hybridation de brins d'ADN dans une solution saline et non pas pour une hybridation à l'interface liquide/solide. Les résultats vont être utilisés comme point de départ pour l'hybridation de surface. Il est connu qu'il y a un risque d'avoir une certaine différence entre les valeurs lors de l'hybridation en solution versus l'hybridation de surface, mais les ordres de grandeur devraient être semblables. Le tableau 3.3 donne l'enthalpie modélisée avec le modèle du plus proche voisin pour les deux séquences d'ADN choisies.

Tableau 3.3 Modélisation des paramètres thermodynamiques de l'hybridation de l'ADN des deux gènes utilisés comme modèles pour la conception du biocapteur

Gène	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS kJ/(mol*k)
AL 185	-114.6	-785.8	-2076.6
AL HPA1a	-85.4	-589.9	-1560.6

Cinétique de l'hybridation de l'ADN à l'interface liquide/solide

Le modèle de Axelrod et Wang [101–103] fut choisi pour calculer le taux d'hybridation d'ADN afin d'en déduire la puissance dégagée. Ce modèle a l'avantage d'être du premier ordre, ce qui simplifie l'interprétation pour le modèle thermodynamique. Le modèle prend en compte la diffusion en deux et trois dimensions, l'adsorption et la désorption non spécifique. Pour l'utilisation du modèle, cinq hypothèses doivent être faites, soit :

1. Les brins sondes sont liés à la surface par une liaison covalente et ils sont distribués de manière uniforme sur la surface;
2. les brins cibles sont hybridés de manière irréversible et avec un seul brin sonde;
3. le nombre de cibles disponibles reste constant tout au long de la réaction et est indépendant du taux d'hybridation;
4. l'absorption non spécifique est considérée semblable à une monocouche, les interactions latérales sont négligées;
5. la surface de réaction est considérée infinie, tous les effets de bord sont négligés.

La figure 3.3 montre un schéma des différents phénomènes pris en compte par le modèle de la cinétique de l'hybridation.

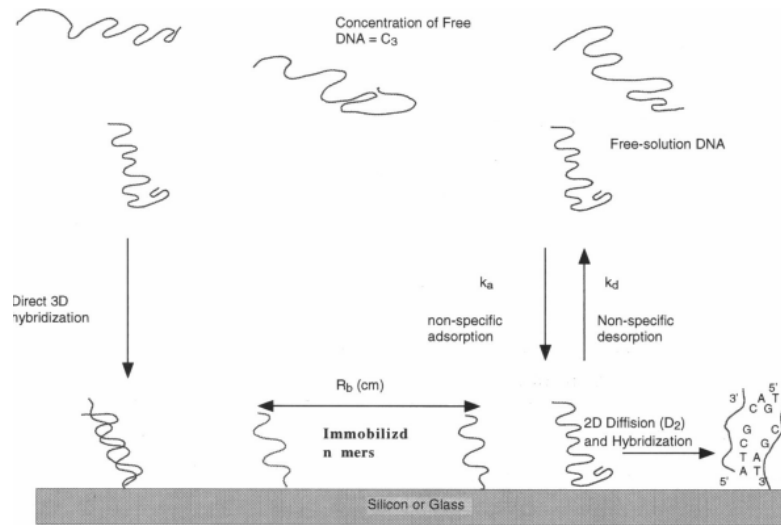


Figure 3.3 Représentation du modèle de l'hybridation de cible d'ADN à des sondes d'ADN immobilisées sur une surface [102]¹⁶

Ce modèle calcule le taux d'hybridation J_{total} comme suit :

$$J_{total} = \frac{\pi Y^{irr} D_3 C_0}{4H} \text{ mol / cm}^2 \cdot \text{s} = 7.07 \times 10^{-12} \text{ mol / cm}^2 \cdot \text{s} \quad (3.1)$$

où Y^{irr} est l'efficacité globale, D_3 est le coefficient de diffusion 3D, C_0 est la concentration des cible loin de la surface (soit la concentration de détection) et H est la distance entre les sondes et les cibles.

Tableau 3.4 Paramètres utilisés pour déterminer le taux d'hybridation

Paramètre	Valeur	Référence
H	10^{-3} cm	[102]
D_3	90×10^{-8} cm ² /s	[104]
C_0	0.1×10^{-6} mol/cm ³	Fixé par l'auteur
Y^{irr}	1	[101]

Le taux d'hybridation prévu va être de l'ordre de 7.07×10^{-12} mol/cm² s.

La puissance surfacique de la réaction de l'hybridation se calcule en multipliant le taux d'hybridation avec l'enthalpie :

¹⁶ Reproduit avec la permission de l'American Physical Society via Copyright Clearance Center, 3270841075633

$$P_{hybridation} = J_{tot} * \Delta H \text{ W/m}^2 \tag{3.2}$$

Soit pour les deux bouts d'ADN d'intérêts :

Puissance surfacique de l'hybridation de l'AL HPA1a :

$$P_{hybridation \ HPA1} = J_{tot} * \Delta H \text{ W/m}^2 = 7.07 \times 10^{12} \text{ mol/cm}^2 * \text{s} * 589.9 \text{ kJ/mol} = 4.17 \times 10^{-6} \text{ W/cm}^2$$

Puissance surfacique de l'hybridation de l'AL 185 :

$$P_{hybridation \ 185} = J_{tot} * \Delta H \text{ W/m}^2 = 7.07 \times 10^{12} \text{ mol/cm}^2 * \text{s} * 785.8 \text{ kJ/mol} = 5.55 \times 10^{-6} \text{ W/cm}^2$$

Pour obtenir la puissance totale, il suffit de multiplier cette puissance surfacique par la surface de détection. En regardant la surface de réaction potentielle du dispositif, il est possible d'arriver à la puissance absolue. La figure 3.4 montre la puissance dégagée par l'hybridation de l'ADN, cette puissance doit être mesurée par le calorimètre. Le seuil inférieur de détection du microcalorimètre est fixé à 800 nW, ce qui correspond à une zone de détection d'une aire d'environ 0.15 cm², soit le type de surface régulièrement utilisé en microcalorimétrie.

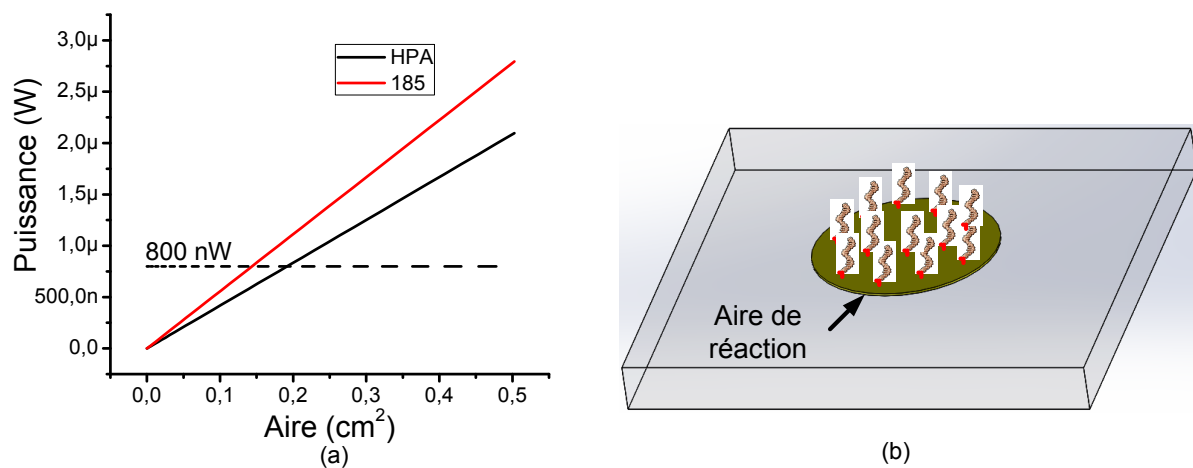


Figure 3.4 a) Puissance de l'hybridation pour les deux brins test d'ADN en fonction du rayon d'une aire de réaction ronde, b) Schématisation de l'aire de réaction

En conclusion de cette section, le dispositif devrait avoir la capacité de mesurer des changements d'indice de réfraction de l'ordre de 10⁻⁴ RIU et de mesurer avec un taux de

signal sur bruit satisfaisant une puissance dégagée. Le tableau 3.5 récapitule les sensibilités minimales des deux modalités du capteur.

Tableau 3.5 Limite de détection de chacune des modalités pour le système

Modalité	Performance
Microcalorimétrie	800 nW
SPR	10^{-4} RIU

3.2 Impacts liés à la fonctionnalisation biomoléculaire de surface

La section 3.1 concernait les aspects thermodynamiques et cinétiques de l'hybridation. Dans cette section, il est question de la méthode utilisée pour immobiliser les sondes d'ADN à la surface des transducteurs.

La méthode consiste en l'utilisation d'une couche de protéine d'albumine de sérum bovin biotynilée (BSA-biotine) suivie d'une couche de neutravidine et d'une immobilisation des sondes d'ADN-biotynilé sur la neutravidine [2,26]. Cette méthode a pour avantage d'être simple de mise en œuvre et d'avoir été régulièrement utilisée [2,26,105]. La figure 3.5 montre un schéma de concept du biorécepteur et de ses différentes parties sur le capteur.

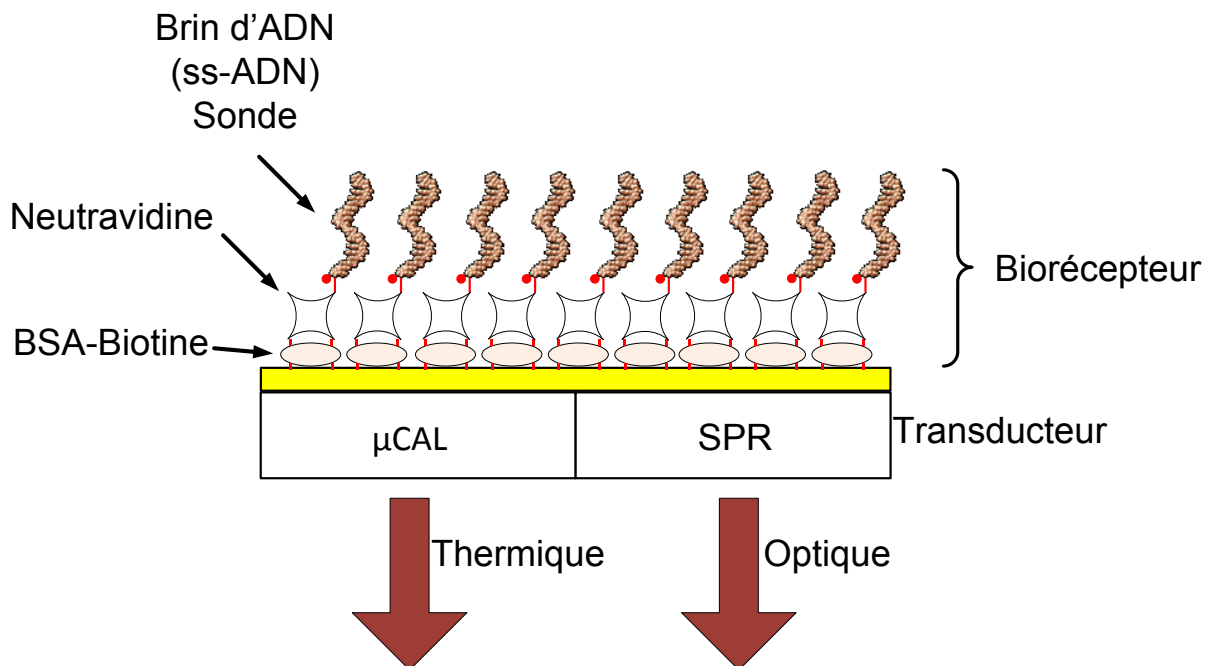


Figure 3.5 Représentation du biorécepteur avec la BSA, la neutravidine et l'ADN

Les étapes de fonctionnalisation sont les suivantes :

- a) Adsorption de BSA-biotynilée sur la surface de réaction formée de 48nm d'or
- b) Formation du complexe avidine-biotine par immobilisation de neutravidine sur la BSA-biotynilée
- c) Immobilisation de l'ADN biotynilé sur la neutravidine par la formation d'un complexe avidine-biotine. Le brin d'ADN sonde à un fluorophore (Cy-5) près de la biotine. Cela permet de vérifier à posteriori de la qualité de l'immobilisation des brins sondes.

La figure 3.6 montre une schématisation des trois étapes de fonctionnalisation.

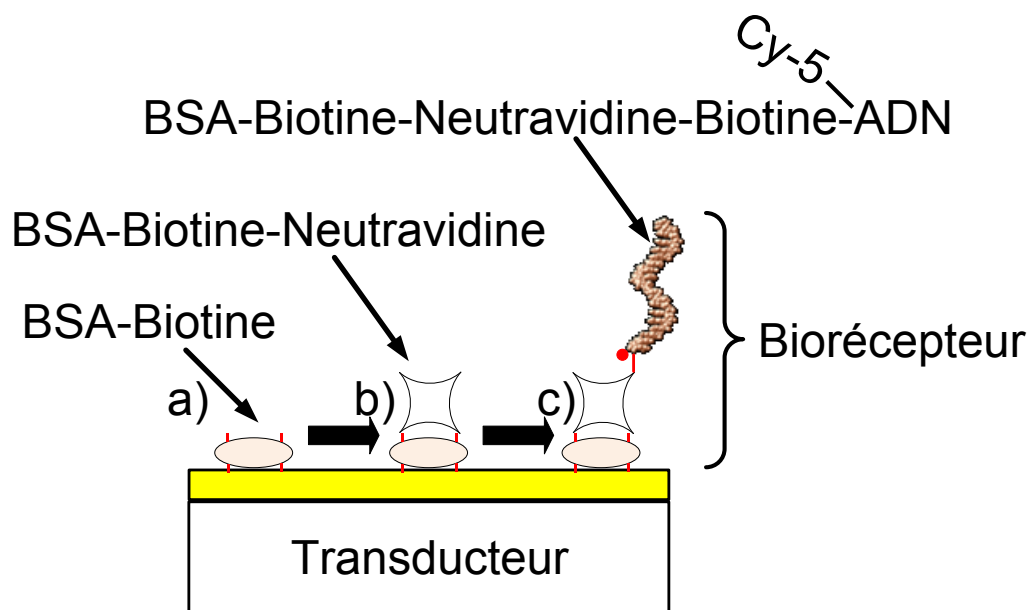


Figure 3.6 Étape de la fonction du biorécepteur, a) Adsorption de BSA biotynylisée à la surface de l'or b) Formation du complexe BSA-biotine-Neutravidine c) Immobilisation de la sonde d'ADN par la formation du complexe neutravidine-biotine-ADN. La sonde d'ADN porte également un fluorophore de type Cy-5 pour être en mesure de vérifier la qualité de l'ADN par fluorescence après la fonctionnalisation

Le modèle de la cinétique d'hybridation sur support solide tel que formalisé par Axelrod et Chan [101,102] fut utilisé pour déterminer les niveaux de signal attendus lors de l'hybridation d'ADN à l'interface, utilise une fonctionnalisation à l'aide de thiols, soit une immobilisation par une liaison covalente. La fonctionnalisation à l'aide de thiol n'a pas été choisie due à sa complexité de mise en œuvre particulièrement au niveau des étapes de préparation de la surface telles que le nettoyage qui pourrait endommager le calorimètre et son manque de flexibilité. La fonctionnalisation telle que montrée dans cette section a

l'avantage d'être facilement transposable sur d'autres substrats et cette méthode n'a pas besoin d'une surface chimiquement propre contrairement à la fonctionnalisation à base de thiols, ce qui permet d'éviter un nettoyage agressif et ainsi préserver l'intégrité des dispositifs.

Il est important de déterminer si l'utilisation de cette méthode de fonctionnalisation risque d'affecter le niveau de signal SPR et calorimétrique. Pour cela, il est important de s'assurer que :

- la force de la liaison des sondes est suffisante pour négliger la désorption,
- la densité de sondes est suffisante pour obtenir un bon niveau de signal et
- la présence de protéines à la surface ne va pas modifier le niveau de signal des transducteurs SPR et calorimétrique.

3.2.1 Force de la liaison thiol-or versus avidin-biotine

Dubois et al. [106] ont caractérisé la liaison covalente thiol or par une énergie d'enthalpie de $\Delta H = -44$ kcal/mol (-184 kJ/mol). Les liaisons mises en jeu dans la formation du complexe avidine-biotine sont non covalentes, mais il s'agit de la plus forte interaction non covalente connue avec une constante de dissociation de l'ordre de $K_D = 10^{-15}$ [M] [107,108] et d'une énergie d'absorption est de l'ordre de $\Delta H = -18.3$ kcal/mol (-76.6 kJ/mol) [109], ce qui est du même ordre de grandeur que la liaison covalente de la réaction thiol-or. Puisque l'enthalpie d'adsorption est fortement négative et du même ordre de grandeur que la liaison thiol-or, cela montre que cette liaison est suffisamment stable pour être irréversible [101].

L'énergie de l'adsorption de la BSA est de l'ordre d'une liaison covalente [110], soit une enthalpie d'adsorption de plusieurs dizaines de kJ/mol¹⁷. L'énergie de cette liaison est grandement reliée à la concentration de la BSA, au pH et à la température. C'est pour cette raison que c'est seulement l'ordre de grandeur qui est donné ici, mais l'adsorption de la BSA sur une surface est considérée très stable.

¹⁷ En exemple l'enthalpie d'adsorption de la BSA à 25°C à un pH de 7.6 est de -152kJ/mol [110]

3.2.2 Densité de la couche de BSA neutraavidine pour la fonctionnalisation

Dans la section 3.1.1, le taux de couverture des sondes est un paramètre important de la modélisation. Le taux de couverture doit être suffisamment élevé pour qu'il soit possible de considérer que le nombre de sondes disponibles est toujours largement plus élevé que le nombre de complexes. Chang et al. [102] dans l'application du modèle d'Axelrod décrivent une densité minimale de sondes de l'ordre de 10^8 brins/cm².

La fonctionnalisation à l'aide de l'adsorption de BSA doit permettre un taux de couverture du même ordre de grandeur qu'avec une fonctionnalisation à l'aide de thiols. Pour s'assurer de ce point, il est possible de calculer le taux de couverture maximal qu'il est possible d'avoir avec la BSA sur une surface d'or par rapport à la géométrie d'une protéine de BSA lorsque celle-ci est adsorbée sur une lame d'or. Wright et al. [111] montrent que la protéine de BSA a une forme ovoïde de 140 Å x 40 Å x 40 Å. À partir de ces dimensions, il est possible de calculer le taux de couverture maximal que l'on peut obtenir. Il y a deux positions possibles pour la BSA sur les surfaces, couchée où la BSA occupe une zone de 140 Å x 40 Å et debout où la BSA occupe une zone de 40 Å x 40 Å. La figure 3.7 montre le type de couverture maximale qu'il serait possible d'obtenir pour les deux configurations de BSA.

Le taux maximal de couverture pour les deux configurations est de l'ordre de 10^{13} BSA/cm². Ce taux de couverture est cinq ordres de grandeurs supérieurs au taux de couverture minimale de sondes d'ADN pour que le modèle d'Axelrod soit valide. Même s'il ne sera pas possible d'attendre un tel taux de couverture, il est confortable d'obtenir un taux de 10^8 BSA/cm². Dans la littérature il est question d'un taux de couverture de 2×10^{12} BSA-biotinilisée/cm² sur substrat d'or [112].

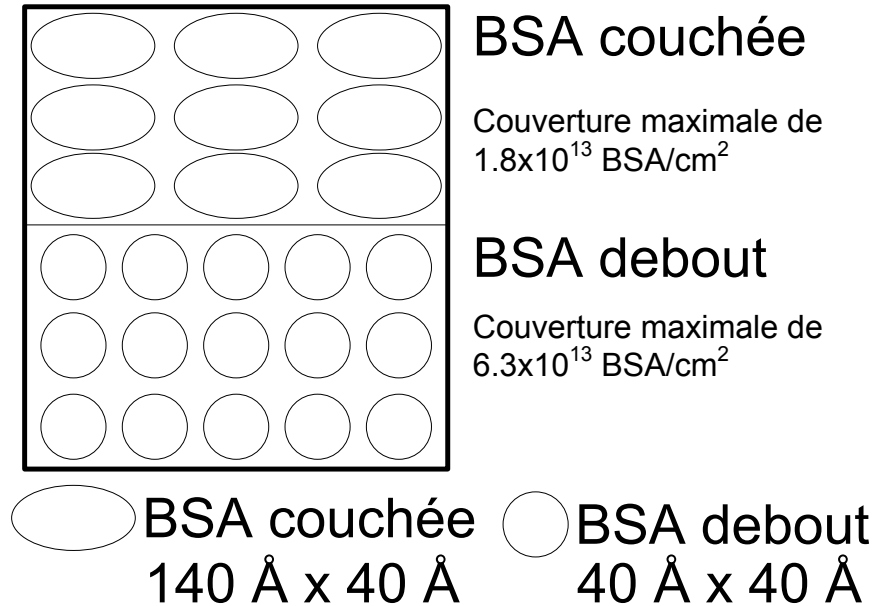


Figure 3.7 Schéma de couverture de la BSA sur une lame d'or

3.2.3 Impact de la fonctionnalisation sur les modalités de mesure

L'utilisation d'une bicouche BSA-biotin-neutravidine pourrait avoir un impact au niveau de la qualité du signal qu'il sera possible de mesurer en microcalorimétrie et en SPR dues à l'apport des couches de protéines qui n'ont pas été prises en compte dans les simulations. Le fait d'utiliser une fonctionnalisation à base de BSA ne devrait pas changer le taux d'hybridation ni la densité des sondes, par contre l'hybridation va se dérouler à une distance plus importante de la surface par rapport à une fonctionnalisation au thiol. La figure 3.8 montre l'épaisseur de la fonctionnalisation à l'aide des protéines de BSA et de neutravidine versus la fonctionnalisation aux thiols. La prochaine sous-section va analyser l'impact de l'éloignement de 18 nm de l'hybridation par rapport par à l'utilisation de la fonctionnalisation à base de BSA-neutravidine.



Figure 3.8 a) Schéma du biorécepteur tel que choisi avec la hauteur des différentes parties b) Schéma de la fonctionnalisation de l'ADN à l'aide de thiol. La comparaison entre les deux techniques nous montre bien que la fonctionnalisation à l'aide de BSA-Neutravidine soulève à 20 nm le brin d'ADN de la surface d'or versus 1 à 2 nm à l'aide de la fonctionnalisation à l'aide de thiol

La mesure SPR va être affectée par l'utilisation d'une fonctionnalisation à base de BSA et de neutravidine par un changement important de l'indice effectif du couplage SPR ce qui va se traduire pour une excitation en lumière blanche par une augmentation de la longueur d'onde de couplage. Par contre, le changement de l'indice effectif de la résonance des plasmons due à l'hybridation pour les deux types de fonctionnalisation va rester relativement identique. Cela peut être observé à la figure 3.9. Cela s'explique, car le champ évanescent dans cette configuration a une pénétration de plus de 200 nm (voir la figure 3.10), l'augmentation d'épaisseur due à la fonctionnalisation à l'aide de BSA est seulement de 20 nm. Par ailleurs le tableau 3.6 montre la différence de changement de couplage SPR entre les deux méthodes de fonctionnalisation.

Tableau 3.6 Différence de la mesure SPR des deux types de fonctionnalisation pour un système SPR excité en lumière blanche à un angle de 75 °

Configuration		Longueur d'onde de résonance	Changement de longueur d'onde
Fonctionnalisation thiol	ADN sonde	641.48 nm	4.94 nm
	ADN hybridé	646.42 nm	
Fonctionnalisation BSA-Neutravidine	ADN sonde	688.54 nm	5.2 nm
	ADN hybridé	693.75 nm	

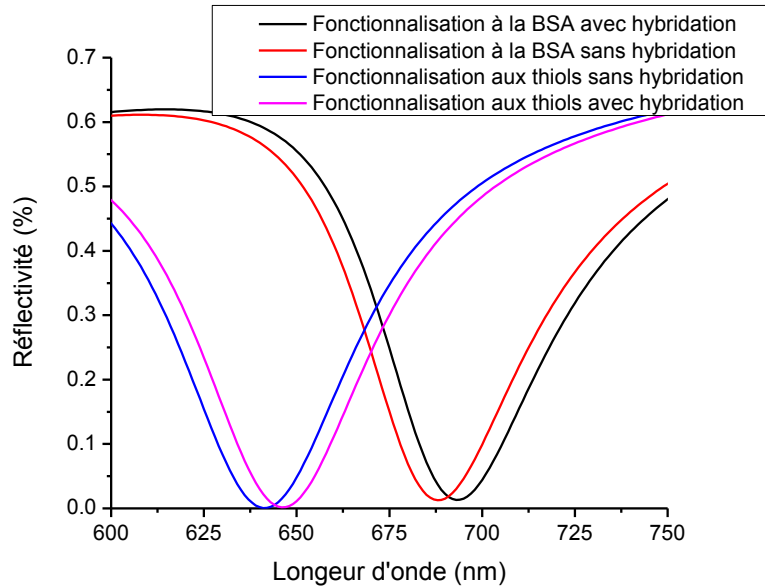


Figure 3.9 Simulation de la réponse SPR avant et après hybridation pour une excitation en lumière blanche avec un angle incidente de 75° pour la fonctionnalisation à base de thiol et la fonctionnalisation à base de BSA et neutravidine. La longueur d'onde de résonance pour les deux types de fonctionnalisation est différente, par contre la différence entre le biorécepteur seul et le biorécepteur hybridé est comparable

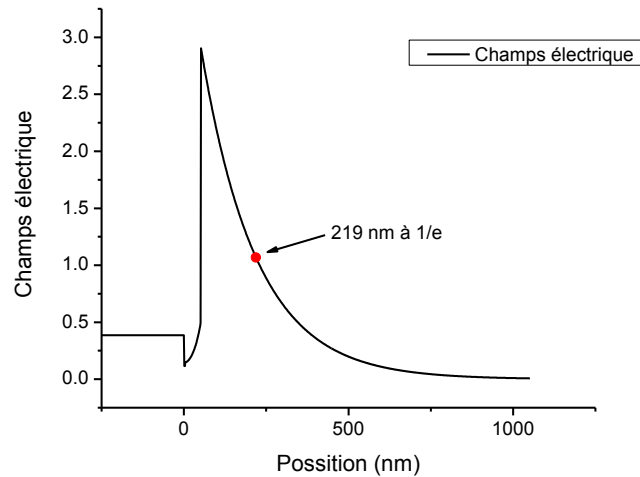


Figure 3.10 Amplitude du champ évanescents à la résonance SPR pour le système SPR d'intérêts

Pour ce qui est de l'impact sur la calorimétrie, elle ne devrait pas être très importante. La source de chaleur due à l'hybridation va être seulement éloignée de 18 nm, ce qui est négligeable par rapport à la distance de l'élément de mesure du microcalorimètre.

3.3 Conception du microcalorimètre

Avec la valeur de puissance dégagée pour la réaction d'hybridation (≈ 800 nW), il est possible d'effectuer la conception de la partie microcalorimétrique. Tel que vu à la section 2.2, il y a différents types de calorimètre. Le calorimètre qui sera utilisé ici sera un calorimètre microfabriqué isotherme (à conduction) plan. Ce type de calorimètre est habituellement fait à l'aide d'une membrane d'oxyde ou de nitrure [66]. Bien que ce concept offre l'avantage d'avoir une très bonne isolation avec une forte diffusion thermique, ce qui augmente le signal et diminue la constante de temps, il a le problème d'être très complexe à intégrer avec d'autres méthodes de transduction et d'être très fragile. Normalement les MEMs sont faits à l'aide de membranes et ils sont encapsulés pour en assurer la protection. Par contre, lorsqu'il s'agit d'un microcalorimètre, la réaction doit se dérouler sur la membrane ce qui implique une injection de fluide directement sur la membrane. Pour le concept du capteur mixte, il est très important que le capteur soit solide et qu'il puisse être intégré avec des modes de transduction optique tel que le SPR et qu'il soit possible de le fonctionnaliser.

Les différentes parties du calorimètre qui seront traitées dans cette section vont être : le transducteur, le substrat, la méthode de calibration, ainsi que l'utilisation d'un calorimètre avec un biorécepteur immobilisé à la surface.

Le choix d'un calorimètre isotherme fut fait car il est impossible ou presque lorsque l'on fait de la microcalorimétrie microfabriquée d'isoler le système afin d'être en mode adiabatique tel que montré à la section 2.2.5.

3.3.1 Choix du transducteur pour la microcalorimétrie

Tel que vu dans la section 2.2.4, il existe plusieurs types de transducteurs pour les microcalorimètres. Le transducteur de prédilection pour les calorimètres isothermes est le thermocouple. L'autre possibilité serait d'utiliser des RTD, certains microcalorimètres microfabriqués utilisent des RDTs [50,51]. Ceux-ci sont destinés à la caractérisation des

matériaux. Ce type de transducteur a comme avantage de permettre une mesure absolue de la température, mais avec comme désavantage d'être actif, c'est-à-dire qu'il faut les alimenter avec un courant, ce qui pourrait avoir comme conséquence de chauffer l'échantillon. Karmouch et al [51] utilisent cet autochauffage pour permettre le balayage en température de l'échantillon. La RTD est utilisée dans ce cas pour mesurer la température absolue et comme élément chauffant pour chauffer l'échantillon. Dans ce cas, la RTD en platine a une impédance de l'ordre de 70Ω et est excitée par un courant de 25 mA pour une puissance dégagée de 43.8 mW. Il est possible d'effectuer la mesure d'impédance avec un courant plus faible de l'ordre de $100 \mu\text{A}$ pour une puissance dégagée de l'ordre de 700 nW. Il est intéressant de rappeler que le modèle d'hybridation de l'ADN choisi dégage une puissance de l'ordre de 800 nW. Puisque la réaction d'hybridation dégage une puissance de l'ordre de la puissance dégagée minimale de la RTD, cette solution ne semble pas être très pertinente. L'utilisation de thermocouple ou plutôt de thermopile¹⁸ (voir la section 2.2.4) semble être beaucoup plus appropriée puisque celles-ci sont passives.

Il existe deux configurations possibles pour les thermopiles dans un microcalorimètre microfabriqué, soit, la configuration absolue et la configuration différentielle. La configuration absolue va donner l'augmentation absolue de température provoquée par la réaction et la mesure différentielle va donner l'augmentation par rapport à une zone de référence.

Mesure différentielle versus absolue

En configuration absolue les thermopiles permettent la mesure de la différence de température entre la chambre calorimétrique et la gaine thermostatée, voir la figure 3.11. Ce type de transduction est régulièrement utilisé pour des applications de calorimètres microfabriqués isothermes [60,65,66,68,113]. Cette méthode ne permet pas d'effectuer des mesures par balayage de température et elle ne permet pas de distinguer les changements dus à l'environnement de mesure par exemple d'injections de différents échantillons biologiques dans la chambre calorimétrique.

¹⁸ Plusieurs thermocouples branchés en série

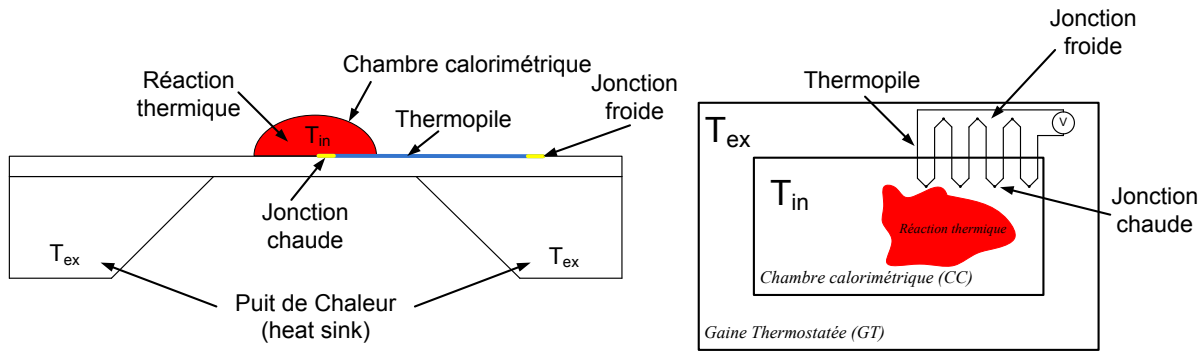


Figure 3.11 Utilisation d'une thermopile pour effectuer une mesure calorimétrique sans zone de référence. La mesure est prise entre la zone de réaction et le puits de chaleur (gaine thermostatée). a) Vu de côté d'un microcalorimètre à membrane avec la thermopile qui se retrouve entre le liquide où la réaction a lieu et le puits de chaleur qui agit telle la gaine thermostatée b) Schéma de principe d'un calorimètre isotherme avec la thermopile qui effectue la mesure entre la gaine thermostatée et la chambre calorimétrique.

La gaine thermostatée sert de point de référence pour la mesure, mais ce point est fixe. Cela ne permet pas d'avoir une mesure réellement différentielle, dans ce cas la différence n'est pas entre une réaction de référence et la réaction d'intérêts. Pour résoudre ce problème de mesure non différentiel, il est possible d'intégrer une deuxième chambre calorimétrique de référence et de mesurer la différence de flux entre les deux enceintes. La figure 3.12 montre comment il est possible de modifier le calorimètre isotherme standard pour en faire un calorimètre isotherme différentiel. Ce type de système fut utilisé par Wang et al. [59].

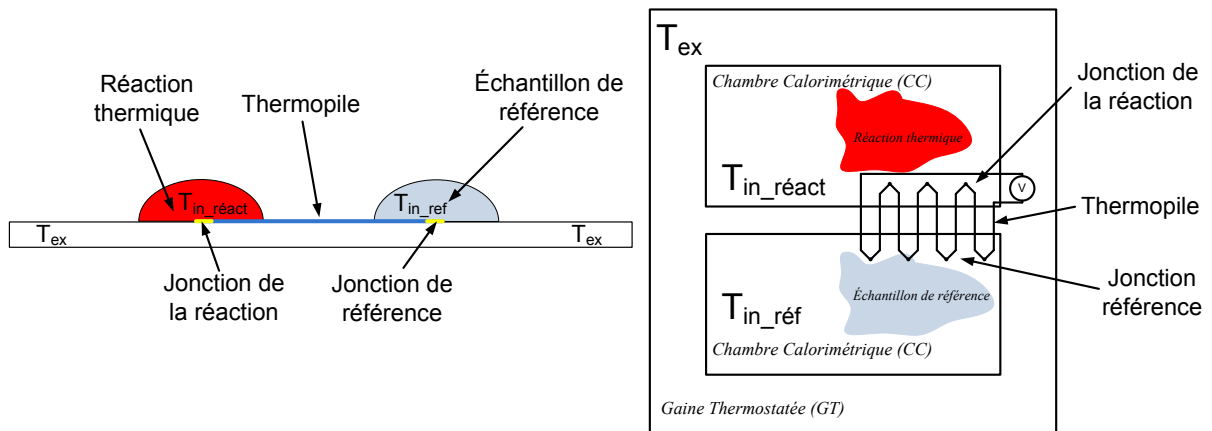


Figure 3.12 Utilisation d'une thermopile pour effectuer une mesure calorimétrique avec une zone de référence. La mesure est prise entre la zone de réaction et l'échantillon de référence. a) Vu de côté d'un microcalorimètre isotherme plan avec la thermopile qui se retrouve entre le liquide où la réaction a lieu et une zone de référence contenant un deuxième liquide équivalent au premier, mais où il n'y a pas de réaction

calorimétrique. b) Schéma de principe d'un calorimètre isotherme avec la thermopile qui fait la mesure entre une chambre calorimétrique de référence et une chambre calorimétrique de réaction.

Un calorimètre isotherme différentiel planaire permet d'effectuer une mesure de la différence du flux de chaleur, comparativement au calorimètre isotherme non différentiel. Cela va modifier le modèle de mesure du calorimètre isotherme standard. Normalement, une mesure à l'aide de ce type de calorimètre s'effectue en utilisant le modèle de la conduction de chaleur tel que montré à la section 2.2.1. La mesure de la puissance dégagée par la réaction pourra se mesurer par l'équation (3.3) [49].

$$P(t) = (T_{in}(t) - T_{ex}) * C = \Phi(t) = \varepsilon U(t) \quad (3.3)$$

Pour un calorimètre isotherme différentiel, le modèle de mesure de la puissance va être représenté par l'équation (3.4).

$$P(t) = (T_{in_réact}(t) - T_{ex}) - (T_{in_ref}(t) - T_{ex}) * C = (T_{in_réact}(t) - T_{in_ref}(t)) * C = \Phi(t) = \varepsilon U(t) \quad (3.4)$$

Le transducteur utilisé pour ce dispositif va être une thermopile placée entre les deux enceintes calorimétriques. Pour la conception de la thermopile, plusieurs paramètres sont importants, soit :

- Le type de matériaux utilisés pour la formation des jonctions des thermocouples
- Le nombre de thermocouples à utiliser
- La méthode de formation des thermocouples
- La géométrie des thermocouples

Choix des matériaux pour les thermocouples de la thermopile

Le choix des matériaux pour la formation des thermocouples va influencer l'amplitude du signal pour une certaine puissance dégagée par la réaction à l'intérieur du calorimètre ainsi que le niveau de bruit. La différence des coefficients de Seebeck des deux matériaux va permettre d'avoir le plus haut niveau de signal possible. Une bonne conductivité va permettre de diminuer le niveau de bruit. L'équation (3.5) montre la réponse d'une thermopile lorsque celle-ci effectue une mesure dans un calorimètre isotherme différentiel.

$$P_{réact}(t) - P_{ref}(t) = \varepsilon U(t) = \frac{kA}{L} * \frac{1}{n * (S_A - S_B)} \Delta V(t) \quad (3.5)$$

En observant l'équation (3.5), il est possible d'en déduire la sensibilité du calorimètre, soit :

$$\frac{L}{kA} * n * (S_A - S_B) \quad (3.6)$$

Pour qu'un calorimètre soit sensible, la différence des coefficients de Seebeck doit être la plus importante possible. Le tableau 3.7 montre les différents coefficients de Seebeck des matériaux disponibles dans les salles blanches de l'Université de Sherbrooke. Certains diélectriques tels que le polysilicium peuvent avoir des coefficients de Seebeck beaucoup plus importants, mais les méthodes de dépôt sont difficilement compatibles avec un système SPR.

Tableau 3.7 Table des coefficients de Seebeck pour différents matériaux [114] à 300 K

Métaux	Coefficient de Seebeck $\mu\text{V/K}$
Au	1.94
Ni	-19.5
Cr	21.8
Al	-1.66

Pour effectuer le bon choix de matériaux, il est important également de savoir si les coefficients de Seebeck changent de manière linéaire avec température. Principalement dans la zone d'intérêts des tests, pour savoir si la thermopile va avoir une réponse linéaire ou non et ainsi adapter la calibration. L'hybridation a lieu pour des températures allant de la température pièce à environ 70°C [14]. La figure 3.13 montre les coefficients de Seebeck en fonction de la température pour l'or, le chrome et le nickel.

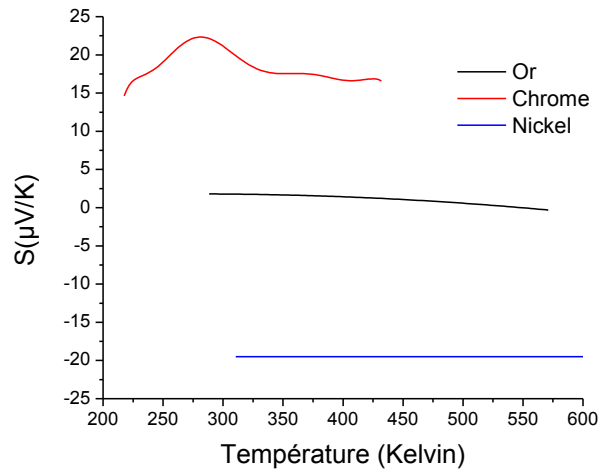


Figure 3.13 Coefficients de Seebeck, or [115], nickel [116], chrome [117] en fonction de la température

L'or et le nickel ont des coefficients linéaires dans la plage d'intérêt, contrairement au chrome. En choisissant le chrome, il faut être conscient que la réponse de la thermopile va changer avec la température, ce qui complexifie son utilisation. Par contre, l'amplitude élevée du coefficient de Seebeck du chrome en fait un choix qui reste intéressant, mais une calibration sur toute la plage d'utilisation va être essentielle.

Le choix du couple Cr-Ni semble être le plus intéressant en regard des coefficients de Seebeck, par contre il ne faut pas oublier le bruit thermique. Le chrome a une résistivité très élevée ce qui se traduit par un bruit thermique élevé. Dans une thermopile, le bruit est principalement dû à l'agitation thermique (Bruit Johnson) et est calculé par l'équation (3.7).

$$V_{rms} = \sqrt{4k_B T R \Delta f} \quad (3.7)$$

Où V_{rms} est l'amplitude rms en volt du bruit, k_B est la constante de Boltzmann, T est la température, R est la résistance du circuit et Δf est la bande passante. Le tableau 3.8 montre les différentes résistivités des métaux disponibles pour former la thermopile.

Tableau 3.8 Résistivité des principaux métaux disponibles à l'Université de Sherbrooke

Métaux	Résistivité (nΩ*m)
Au	22.14
Ni	69.3
Cr	125
Al	28.2

Les réactions biologiques sont habituellement lentes, ce qui permet de réduire le bruit en limitant la bande passante. Pour effectuer le choix final des métaux pour la thermopile, une étude de cas du taux de signal sur bruit va être réalisée avec les paramètres suivants :

1. Une bande passante de 2 Hz
2. Un signal de température correspondant à une hybridation d'ADN, soit $1 \times 10^{-3} \text{ K}^{19}$
3. Calcul pour 25 et 50 paires de thermocouples
4. Pour une thermopile de :
 - a. 1 cm de long
 - b. 10 μm de large
 - c. 200 nm de haut

Le résultat de cette étude de cas est montré à la figure 3.14. Sur cette figure bien que la résistivité du chrome soit plus élevée, le taux de signal sur bruit d'une paire Cr-Ni est plus intéressant qu'une paire Au-Ni, pour une bande passante de 2 Hz.

¹⁹ Élévation de température déterminée par une simulation par le logiciel d'élément fini COMSOL. Voir le résultat de cette simulation à la figure 3.19.

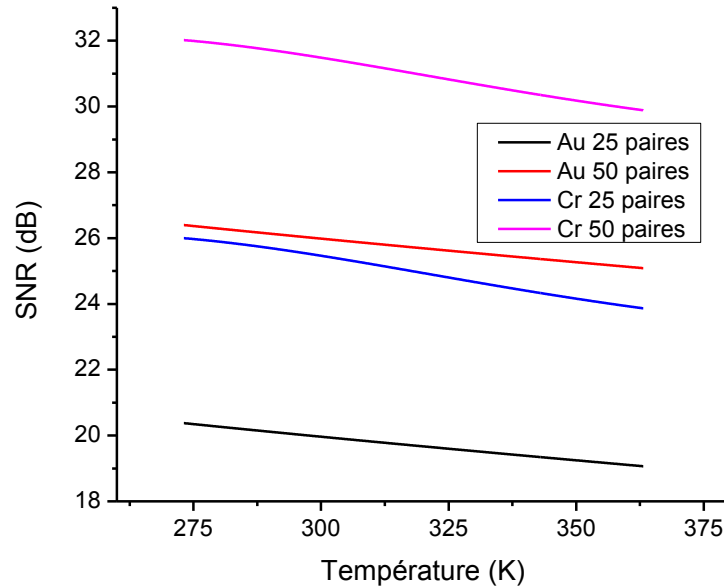


Figure 3.14 Taux de signal sur bruit de l'étude de cas pour une thermopile faite avec un couple Cr-Ni et une thermopile faite avec le couple Au-Ni. Deux modèles de ces thermopiles furent vérifiés, pour 25 paires et 50 paires de thermocouples. Le signal utilisé pour l'étude de cas est une différence de température de 1×10^{-3} K, ce qui correspond à l'augmentation de température due à une hybridation du gène HPA 1a tel que choisi à la section 3.1.

Un autre paramètre intéressant est l'expression de la différence de température équivalente au bruit (NETD)²⁰. C'est-à-dire à quelle différence de température correspond l'amplitude du bruit par rapport à la sensibilité du transducteur. Ce paramètre donne la différence minimale de température qu'il est possible de mesurer avec la thermopile. Ce paramètre se calcule par l'équation (3.8).

$$NETD = \frac{\sqrt{4k_b TR \Delta f}}{\Delta V / \Delta T} \quad (3.8)$$

Où $\Delta V / \Delta T$ est la sensibilité en Volt par degré Kelvin de la thermopile (2.07 mV/Kelvin pour une thermopile chrome-nickel de 50 jonctions). Pour l'étude de cas, cette valeur va être $26.5 \mu\text{K}$ pour une thermopile de 25 jonctions et de $18 \mu\text{K}$ pour une thermopile de 50

²⁰ « Noise equivalent temperature difference »

jonctions ce qui correspond à un bruit de $27 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$. Le choix final s'est porté sur une thermopile de 50 jonctions de chrome-nickel.

Longueur des traces de la thermopile :

Pour maximiser le signal à la thermopile, il est important d'avoir le maximum de différence de température entre les deux jonctions de la thermopile. Puisque la configuration différentielle fut choisie, il est important de s'assurer que les deux jonctions soient suffisamment éloignées l'une de l'autre afin de maximiser le signal. Pour les besoins de fabrication et d'intégration, les jonctions devraient être le plus près possible ce qui est contradictoire avec l'intérêt des éloigner pour avoir le maximum de signal. La figure 3.15 montre le profil de température typique pour une thermopile dans un calorimètre isotherme différentiel. Ce profil correspond au profil de température défini par Bourque-Viens et *al.* [46].

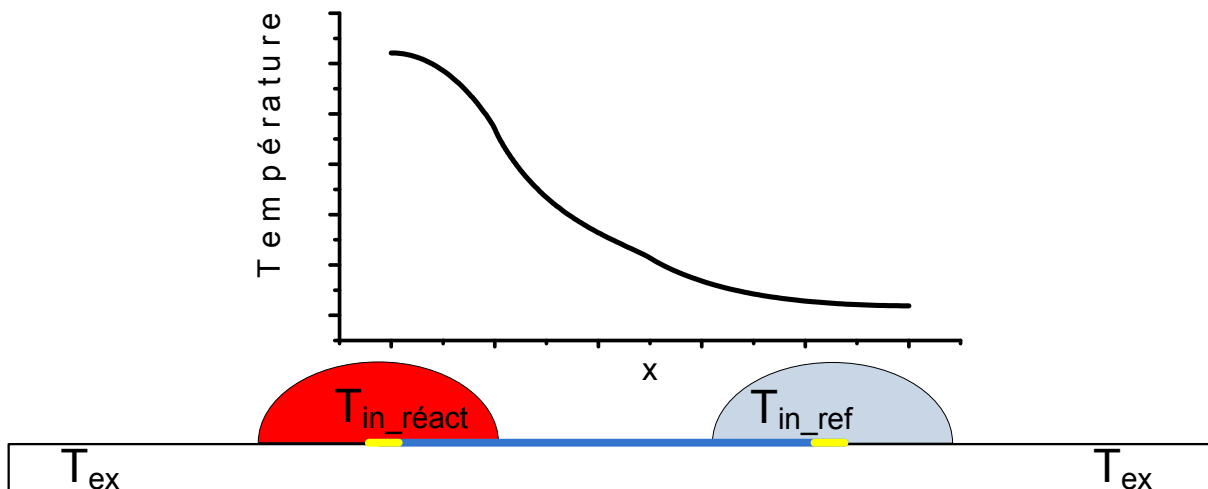


Figure 3.15 Profil typique de la température entre les deux jonctions d'une thermopile dans un calorimètre isotherme différentiel plan en régime permanent pour une réaction thermique sur la jonction $T_{in_réact}$.

Afin de déterminer la longueur que la thermopile doit avoir, une simulation par élément fini²¹ fut utilisée afin de trouver le meilleur compromis entre la longueur des thermocouples de la thermopile et le maximum de signal entre les deux jonctions. Le profil

²¹ Réalisée à l'aide du logiciel COMSOL, voir les détails de la simulation en annexe f.

de température suit un modèle exponentiel à l'extérieur de la zone de réaction et peut être défini par [46] :

$$T(x) = a e^{-\sqrt{\frac{2h_z}{\alpha k_x}} x} \quad (3.9)$$

Où a est un coefficient de pondération correspond à la température en $x = 0$, h_z est le coefficient de convection en z , k_x est le coefficient de conduction du matériau et ε est l'épaisseur du substrat de la thermopile.

La figure 3.16 montre les profils de température au-dessus d'un microcalorimètre tel que celui montré à la figure 3.15 pour différentes puissances dégagées dans la chambre calorimétrique. À moins de 1 cm entre les deux jonctions, la puissance dégagée dans la chambre de réaction peut avoir une répercussion sur la chambre de référence. Au-delà de 1 cm, l'influence de la réaction est relativement minime, c'est certain qu'il serait intéressant de pouvoir avoir une thermopile de plus de 1 cm. Par contre pour des raisons de faisabilité la longueur est fixée à 1 cm.

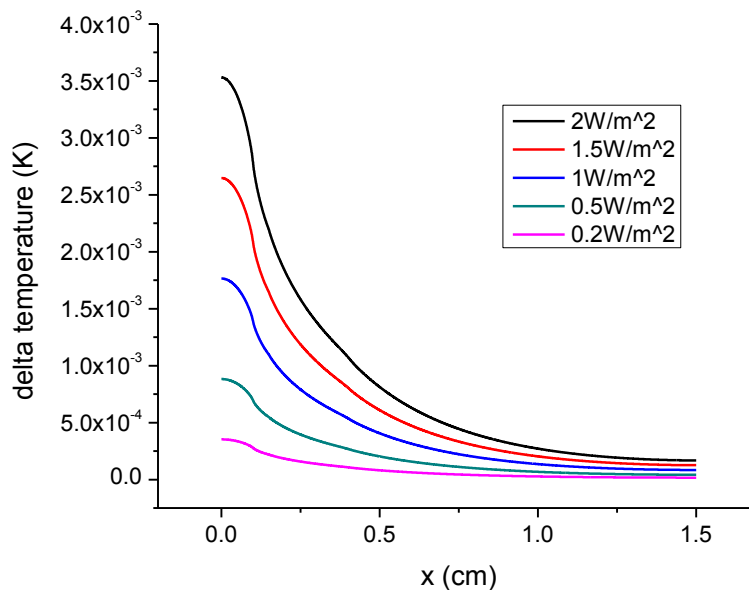


Figure 3.16 Simulation des profils de température pour un calorimètre sur un substrat de verre de 200 µm pour différentes puissances thermiques dégagées dans la zone de référence.

3.3.2 Choix du substrat pour la fabrication du microcalorimètre

Le choix du substrat pour la fabrication du microcalorimètre est important, car la sensibilité du calorimètre va dépendre en grande partie du substrat. Le matériau choisi devrait avoir les caractéristiques suivantes :

- Faible conductivité thermique ($\downarrow k$)
- Haute diffusivité thermique ($\uparrow \alpha$)
- Doit être compatible avec les méthodes de fabrication des thermopiles
- Doit être compatible avec un système optique tel que la SPR

Plusieurs choix sont possibles pour le substrat, la plupart des groupes utilisent le silicium [20,60,118,119]. Le silicium permet d'être utilisé pour la fabrication des membranes, membranes idéales pour la calorimétrie, mais trop fragiles pour être utilisées pour des tests à l'aide de chimie de surface et c'est un matériau compatible avec tous les procédés de microfabrication.

La conduction thermique du silicium est très élevée, de l'ordre de $149 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ [114] comparativement à $1.114 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ [120] pour le verre. Un calorimètre isotherme différentiel a une sensibilité qui est inversement proportionnelle à la conductivité thermique (voir l'équation (3.6)). Le silicium est difficilement compatible avec la méthode SPR, car le silicium est opaque aux longueurs d'onde d'intérêts pour la SPR soit de 600 à 1000 nm. Il serait possible d'utiliser le silicium pour coupler au SPR en utilisant une longueur au-dessus de 1000 nm [121], par contre la mise en œuvre est complexe puisqu'il faut microfabriquer un prisme directement sur le même dispositif que le calorimètre.

Pour pallier à la forte conductivité du silicium, il est possible de le porosifier dans les zones calorimétriques. En porosifiant le silicium, sa conductivité thermique va descendre et peut même atteindre une conductivité de l'ordre de celle du verre, soit $1.2 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ selon Nassiopoulou et *al.* [122]. La conduction thermique du silicium poreux dépend de la méthode de fabrication, mais on voit qu'il est possible d'avoir une faible conduction avec celui-ci. Un autre point intéressant avec le silicium poreux est sa très faible densité. Ce qui a pour effet de diminuer la capacité thermique d'un certain volume de silicium poreux et ainsi d'augmenter la diffusivité thermique ($\alpha = k/\rho c$) comparativement à celle du verre.

Une diffusivité thermique élevée va avoir comme effet de diminuer la constante de temps du calorimètre et ainsi permettre la mesure de phénomènes plus rapides. Par contre, le silicium poreux reste très difficile à intégrer avec un système SPR pour des mesures biologiques.

Le verre possède une faible conductivité thermique, est peu dispendieux, est compatible avec les procédés de fabrication et est compatible optiquement. Sa diffusivité thermique n'est pas idéale, mais le verre reste un choix très intéressant.

En résumé, trois matériaux furent évalués pour servir de substrat, soit le silicium, le silicium poreux et le verre. Le verre est le choix final, car il a une faible conductivité thermique, il est facilement intégrable dans des systèmes SPR biologiques, car ceux-ci utilisent déjà le verre comme substrat, il est facile, peu coûteux de s'en procurer et il est compatible avec les méthodes de déposition de film métallique à couche mince utilisées pour la fabrication des thermopiles. Le tableau 3.9 résume les caractéristiques des trois matériaux considérés pour la fabrication des microcalorimètres.

Tableau 3.9 Récapitulatif des différentes caractéristiques des matériaux qui furent considérés pour la fabrication du microcalorimètre

Caractéristique	Verre (Bk7)	Silicium	Silicium poreux
Compatibilité SPR	Très bonne	Faible	Faible
Compatibilité pour la fabrication de la thermopile	Bonne	Très bonne	Très bonne
Conductivité thermique ($W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$)	1.114	149	1.4
Diffusivité thermique $\alpha = k/\rho c$ (m^2/s)	$5.3e^{-7}$	$0.8e^{-2}$	$3.5e^{-6}$

La figure 3.17 montre une mise à jour du système sur le substrat de verre de 200 μm avec la configuration isotherme différentielle. L'épaisseur de 200 μm :

- apporte une sensibilité suffisante pour effectuer la mesure d'hybridation,
- est suffisamment solide et
- est une épaisseur standard donc facile à obtenir.

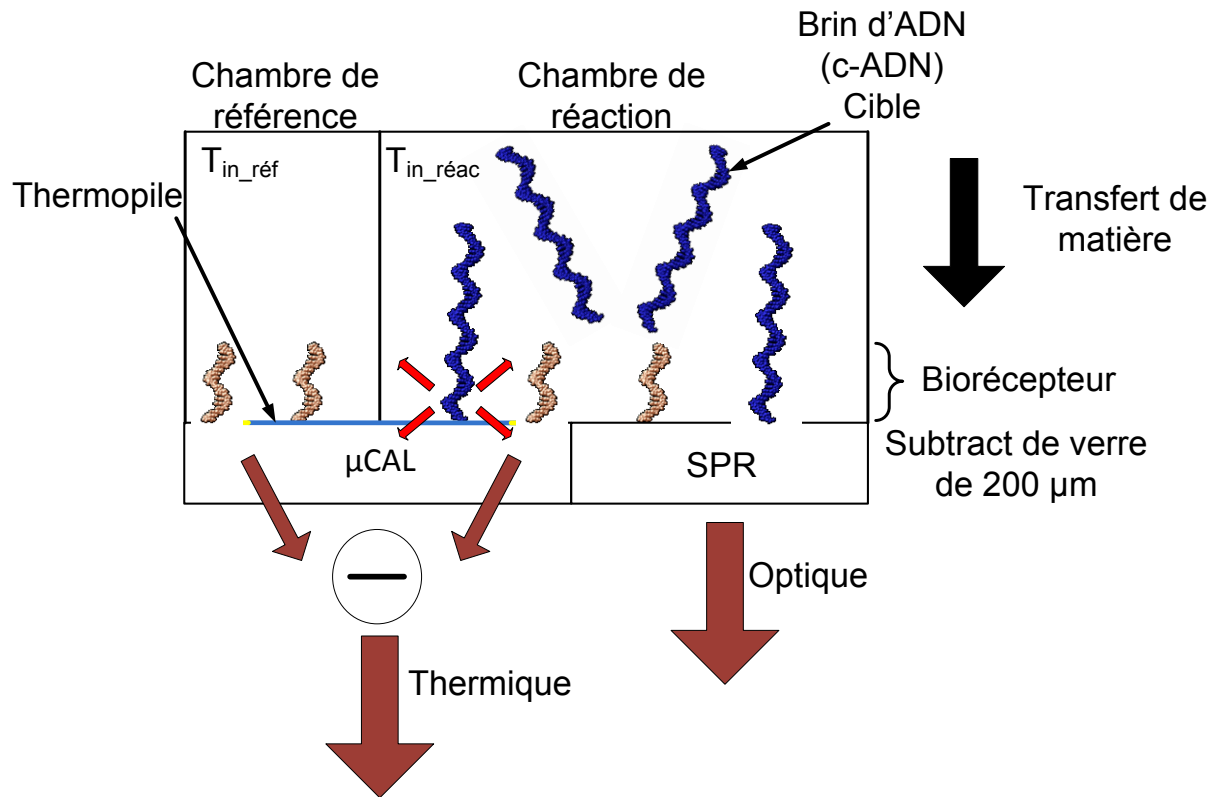


Figure 3.17 Schéma du capteur avec le microcalorimètre isotherme différentiel plan, avec la chambre de référence et la chambre de réaction. La thermopile est sur un substrat de verre de 200 µm

Afin de déterminer l'augmentation attendue de température qui devrait se produire lors de l'hybridation pour le microcalorimètre, une simulation par élément fini à l'aide du logiciel COMSOL® fut réalisée en utilisant un modèle 2D avec un axe de symétrie. La figure 3.18 montre le résultat de la simulation et la figure 3.19 montre le profil de température sur le substrat de verre. Le lieu de la réaction d'hybridation est une chambre fluïdique de 200 µm de haut remplie d'eau recouverte d'une cellule fluïdique faite de PMMA. Les détails de la simulation sont donnés à l'annexe f.

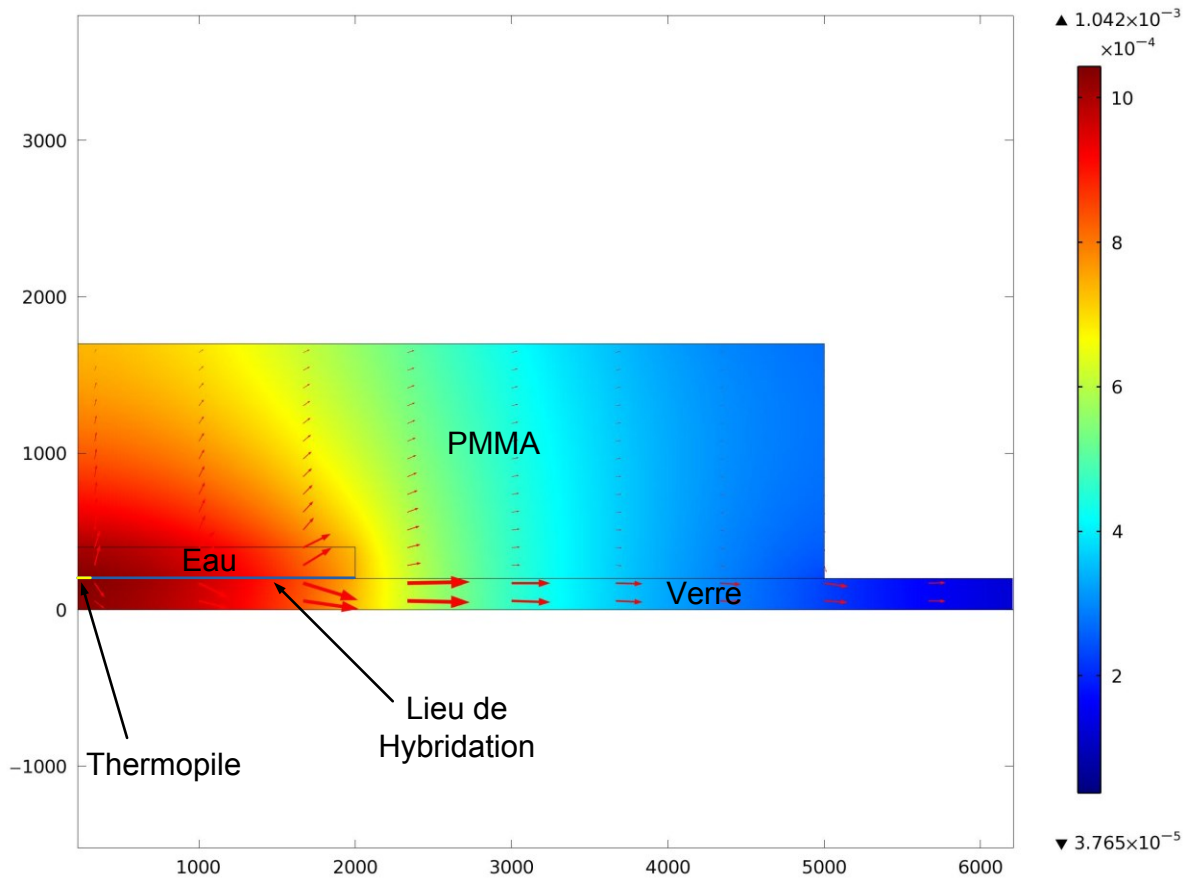


Figure 3.18 Simulation par élément de l'augmentation de température du microcalorimètre pour une hybridation d'ADN à l'interface entre le substrat du microcalorimètre et une cellule fluide constituée d'eau.

L'augmentation de température provoquée pour une hybridation d'ADN à l'interface liquide/solide sur le microcalorimètre va être de l'ordre de 1×10^{-3} degré Kelvin. Pour les besoins de la simulation, l'eau utilisée pour simuler le fluide biologique est considérée immobile. C'est-à-dire qu'il n'y a aucun débit dans la chambre fluide.

Avec l'augmentation de température attendue et la réponse de la thermopile, il est possible de calculer la sensibilité du microcalorimètre en volt par watt en multipliant la réponse de la thermopile par l'augmentation de température pour une puissance donnée.

$$\frac{\Delta V}{\Delta T} \times \frac{\Delta T_{hybridation}}{W_{hybridation}} = 2.07 mV / K \times \frac{0.001 K}{800 nW} = 2.6 V / W \quad (3.10)$$

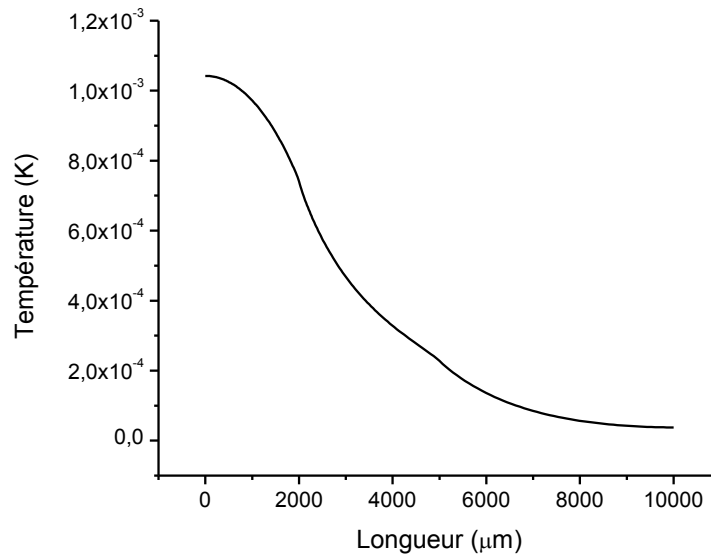


Figure 3.19 Profil de température en régime permanent de l'élévation de température à l'interface du microcalorimètre (au dessus du substrat de verre) pour une hybridation d'ADN.

3.3.3 Intégration d'un système de calibration dans le microcalorimètre

Un microcalorimètre isotherme différentiel, comme celui fabriqué pour ce projet de thèse doit être calibré pour pouvoir effectuer des mesures quantitatives de puissance dégagée lors d'une réaction en fonction du temps $P(t)$. Il n'est pas simple de calibrer ce type de dispositif, car la sensibilité va grandement changer en fonction de la géométrie et de la position de la source de chaleur où se produit la réaction. Cela est dû à la configuration plane du dispositif, ce qui au final apporte une erreur systématique de l'ordre de 10 à 50% [123]. Cette erreur pourrait venir du changement de forme de la source de chaleur, de la position de la source ou encore au changement d'environnement. Il est important d'être en mesure de calibrer les dispositifs, un système de calibration doit être directement intégré dans le microcalorimètre.

La puissance dissipée dans un microcalorimètre en configuration plane est liée au profil de température entre la chambre de réaction et la chambre de référence. Ce profil de température correspond à l'équation suivante (3.9) ($T(x) = a e^{-\sqrt{\frac{2h_z}{\epsilon k_x}} x}$) dont l'allure est montrée à la figure 3.15. Le profil de température est relié à la géométrie du système et

aux caractéristiques des matériaux utilisés. Pour calibrer les microcalorimètres, il est important de bien identifier les différents coefficients qui interagissent dans l'équation du profil. Dans cette équation, k_x , ε sont la conductivité de et l'épaisseur du substrat, dans le cas d'intérêts, l'épaisseur est connue (200 μm) et la conductivité correspond à celle du verre qui est également très bien connue. Le défi est d'identifier le coefficient de convection en z, (h_z). Pour y arriver, une méthode de calibration basée sur des mesures de puissance couplées à des simulations de facteurs de forme *in situ* fut mise en œuvre[46]. La mise en œuvre de cette méthode nécessite la fabrication d'éléments chauffants de chaque côté de la thermopile pour permettre la calibration à l'aide d'injection de puissance par effet joule. Les éléments chauffants pour permettre la calibration *in situ* doivent être placés aux extrémités de la thermopile, la figure 3.20 montre le microcalorimètre final, avec :

- Le substrat de verre
- La thermopile chrome-nickel
- Les contacts électriques
- La zone de référence
- La zone de réaction
- Les éléments chauffants

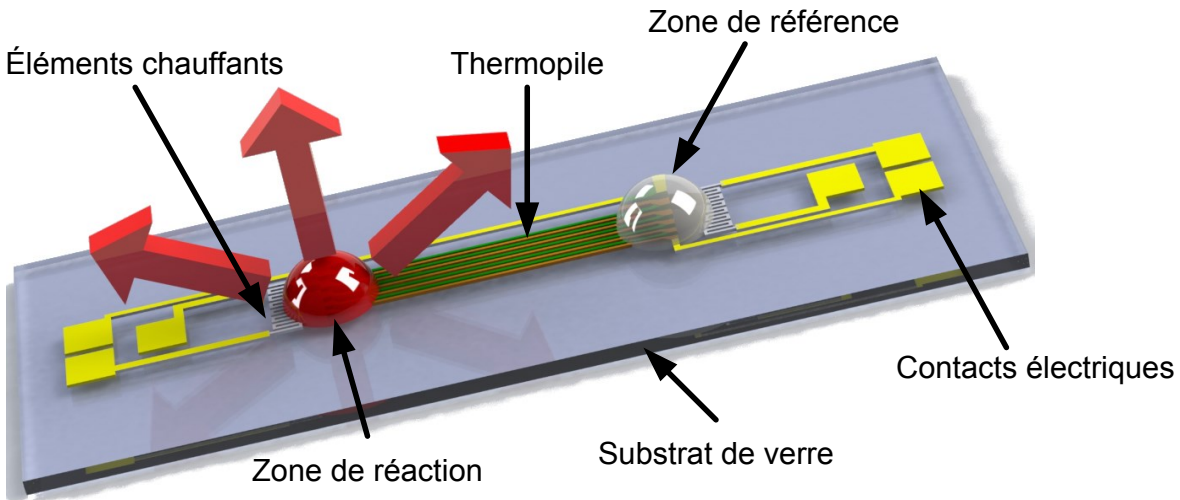


Figure 3.20 Schéma final du microcalorimètre pour la mesure de l'hybridation de l'ADN à l'interface liquide/solide. Il est possible de voir les différentes parties dans la configuration de calorimètre plan.

Le calorimètre ainsi conçu devrait permettre l'intégration avec un transducteur SPR pour la mesure de l'hybridation de l'ADN à l'interface liquide/solide par l'entremise d'un biorécepteur immobilisé à la surface de celui-ci.

3.3.4 Intérêts d'utiliser une fonctionnalisation de surface pour un calorimètre planaire

Le calorimètre est conçu dans une configuration planaire, c'est-à-dire que les éléments de mesure sont sur un plan constitué du substrat. C'est le cas de tous les microcalorimètres microfabriqués. Par contre, il existe des calorimètres qui utilisent des éléments de mesure en 3D qui sont placés tout autour de l'échantillon. Avec un élément de mesure en 3D, la réponse à un dégagement de puissance dans un volume va être excellente, car tout le flux thermique va être capté par l'élément de mesure. Dans un microcalorimètre microfabriqué, l'élément de mesure est à l'interface, pour une réaction de volume, il y a une bonne partie de la chaleur de la réaction qui est dissipée dans le volume et ne participe pas au signal.

Si une réaction a lieu à l'interface entre le fluide biologique et le microcalorimètre, la très grande majorité de la puissance de la réaction va provoquer une augmentation locale de température directement sur l'élément de mesure, ce qui devrait augmenter le signal par

rapport à une réaction de volume pour une puissance totale équivalente. Pour le microcalorimètre conçu ici, c'est une différence de signal d'un facteur mille. Ce phénomène est présenté à la figure 3.21.

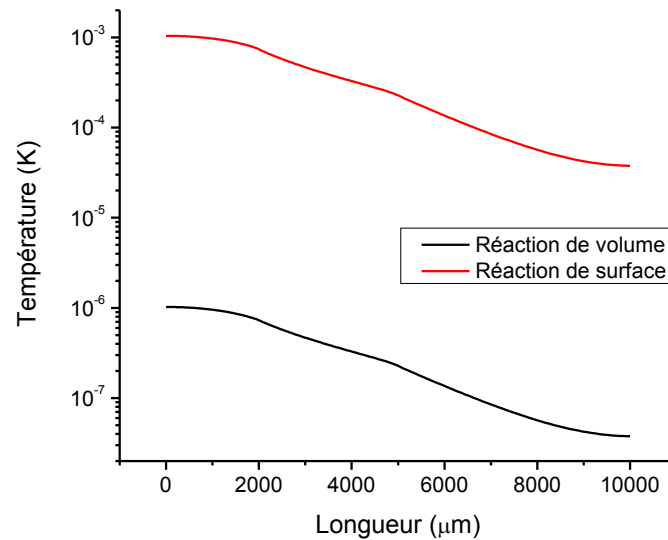


Figure 3.21 Représentation de l'augmentation de température à l'interface pour une réaction à l'interface du substrat et pour la même réaction, mais cette fois dans le volume de la chambre. Pour la réaction dans le volume, l'augmentation de température à l'interface est mille fois plus faible. Cette simulation est réalisée avec le même schéma que celle présentée à la figure 3.18

Le microcalorimètre conçu ici va permettre de mesurer l'hybridation de l'ADN à l'interface liquide/solide, il va être suffisamment solide pour être fonctionnalisé et il va pouvoir être couplé avec un système SPR. Le tableau 3.10 rappelle les points importants du microcalorimètre.

Tableau 3.10 Résumé des choix importants pour la conception du microcalorimètre

Paramètre	Valeur
Transducteur	Thermopile de 50 paire jonctions de chrome-nickel
Sensibilité de la thermopile	$\Delta V / \Delta T = 50 \times (21.8 \mu V / K + 19.5 \mu V / k) = 2.07 mV / K$
NETD	18 μK
Bruit de la thermopile	27 nV / \sqrt{Hz}
Choix du substrat	Verre de 200 μm d'épaisseur
Augmentation de température pour une hybridation	$1 \times 10^{-3} K$
Sensibilité attendue du calorimètre	$\frac{\Delta V}{\Delta T} \times \frac{\Delta T_{hybridation}}{W_{hybridation}} = 2.07 mV / K \times \frac{0.001 K}{800 nW} = 2.6 V / W$

Le système SPR doit aussi avoir certaines caractéristiques qui sont montrées dans la section suivante.

3.4 Résonance de plasmon de surface (SPR)

Le système SPR intégré avec le système de microcalorimétrie doit permettre la mesure des changements d'indice lors de l'hybridation de l'ADN. À la section 3.1.1, il a été montré qu'une sensibilité de l'ordre de 10^{-4} RIU était suffisante pour la mesure de l'hybridation d'ADN. Le défi pour le système SPR n'est pas d'avoir un système spécialement sensible, mais d'avoir un système qui ne va pas réduire la sensibilité du microcalorimètre et où il sera possible d'effectuer une mesure en milieu isotherme.

Le dernier point oblige de placer l'échantillon SPR dans la même chambre calorimétrique que le microcalorimètre. La chambre calorimétrique qui doit être entourée de la gaine thermostatée, ce qui aura une incidence sur le type de modulation qui devra être choisie.

3.4.1 Choix du type de modulation du système SPR

Le premier point à déterminer pour le système SPR est le type de modulation qui devra être utilisée, soit une modulation angulaire, soit une modulation par longueur d'onde.

L'utilisation de la modulation angulaire demande de bouger certaines parties du système avec des moteurs [124] ou encore d'avoir un système optique complexe afin d'exciter l'échantillon à tous les angles en même temps pour après, mesurer tous les angles à l'aide d'un CCD [124]. Il peut être complexe de réussir à monter un tel système dans la gaine thermostatée.

Un système spectroscopique de SPR est fixe, il n'y a pas de pièces mobiles pour effectuer la modulation, par contre il demande également l'utilisation de système optique complexe, particulièrement pour l'analyse du spectre de la lumière. Par contre, contrairement au système par modulation angulaire, les composants complexes peuvent être loin de l'échantillon par l'utilisation de fibre optique. Il est possible de faire une tête de mesure SPR spectroscopique compacte pour permettre son utilisation directement dans la gaine calorimétrique. La figure 3.22 montre le schéma de ce système et la figure 3.23 montre l'aspect complet du système tel qu'il est montré.

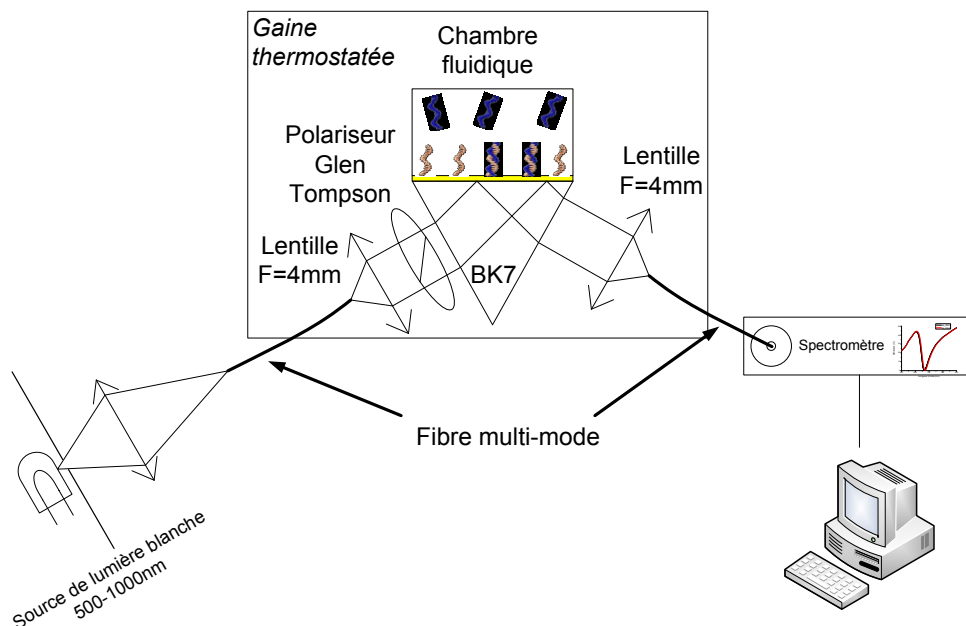


Figure 3.22 Schéma du système SPR spectroscopique proposé pour coupler la microcalorimétrie. Il y a seulement le prisme, deux lentilles pour collimer le faisceau et couplées dans les fibres et le polariseur qui doivent être dans la gaine thermostatée. La source de lumière blanche ainsi que le spectromètre de mesure peuvent être à l'extérieur de la gaine.

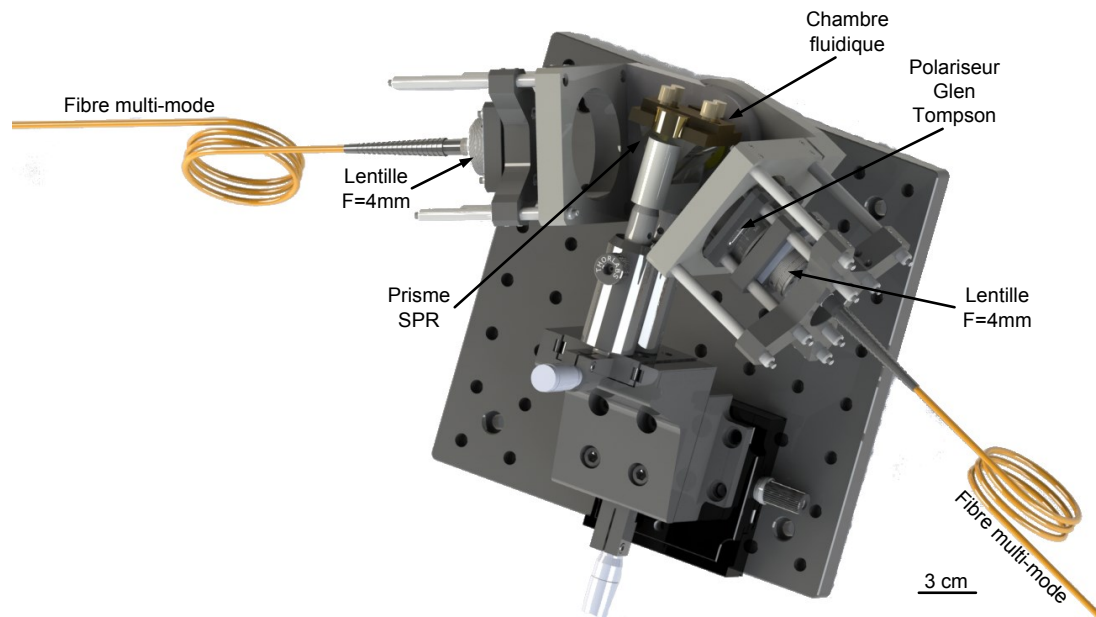


Figure 3.23 Schéma 3D du système SPR tel que monté sur le banc de test. Seulement les parties qui sont à l'intérieur de la gaine thermostatée sont montrées ici.

Le système SPR fut calibré en utilisant différentes huiles d'indices calibrés. Pour déterminer la position du dip SPR, un algorithme utilisant une ligne de base dynamique avec un fit polynomial du 4^e ordre fut utilisé. Cette méthode induit un bruit numérique inférieur à 10^{-6} RIU et est explicité par Thirstrup et *al.* [125]. En analysant la calibration, la sensibilité est établie à 2500 nm/RIU ce qui est cohérent avec la littérature pour les longueurs d'onde utilisées [73]. Les résultats de la calibration sont montrés à la figure 3.24.

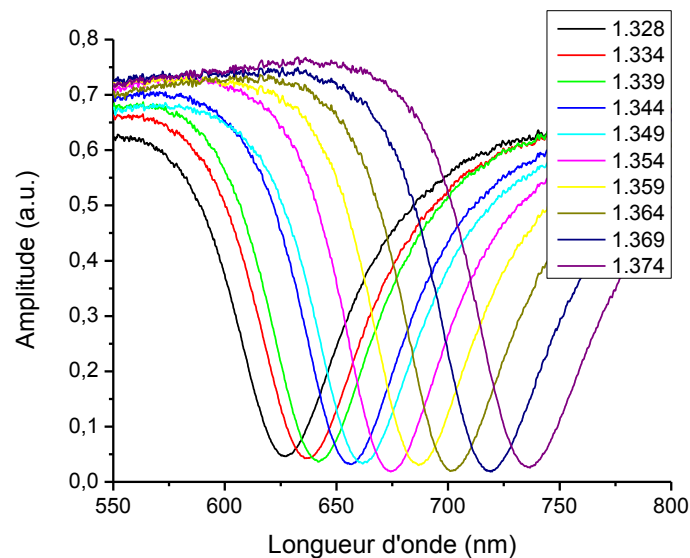


Figure 3.24 Spectre SPR du système SPR spectroscopique pour différentes huiles d'indice

Le bruit sur la mesure de la position du dip est de 0.05 nm. Ce qui donne au système SPR une sensibilité de 2×10^{-5} RIU. Cette sensibilité est suffisante pour la mesure de l'hybridation et standard pour des systèmes non thermostatés²².

Il est intéressant de déterminer l'effet de la masse thermique que représente le prisme sur la mesure calorimétrique.

3.4.2 Conséquence de la présence du système SPR sur le système microcalorimétrique

L'utilisation d'un prisme avec le système microcalorimétrique change de manière importante la configuration du système dû à l'apport de la grosse masse thermique directement en contact avec le système calorimétrique. La figure 3.25 montre une simulation par éléments finis qui expose les conséquences de l'utilisation d'un prisme pour coupler le système SPR et calorimétrique.

²² Le changement d'indice de réfraction de l'eau en fonction de la température est de 1×10^{-4} RIU.

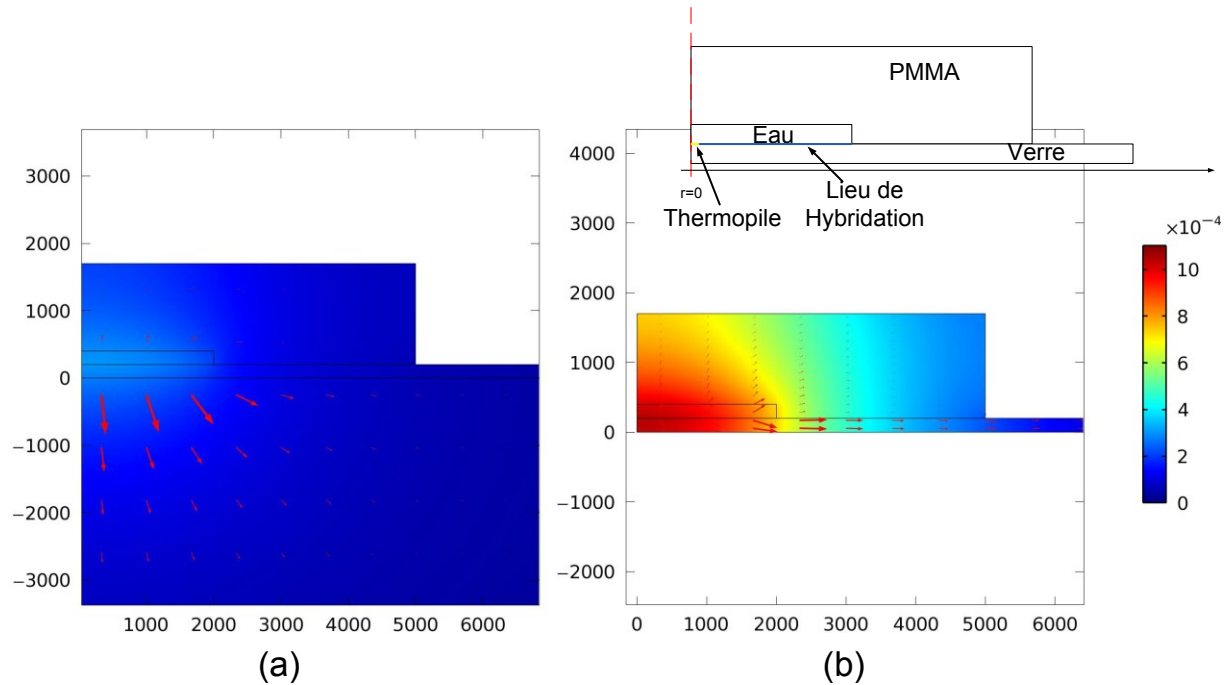


Figure 3.25 Simulation à éléments finis de l'augmentation de température due à une hybridation d'ADN pour un calorimètre avec le prisme SPR (a) et sans le prisme SPR. (b). Sur la simulation avec prisme, il est possible de voir que la masse thermique du prisme agit tel un dissipateur de chaleur et la très grande majorité du flux thermique (flèche rouge) part directement dans le prisme ce qui a pour effet de limiter l'augmentation de température locale comparativement à la simulation sans prisme.

La figure 3.26 montre l'augmentation de température au niveau de la thermopile due à l'hybridation pour les deux configurations. La présence du prisme a pour conséquence d'apporter une masse thermique importante au système et ainsi créer un puits thermique qui dissipe la chaleur. L'augmentation de température avec le prisme SPR est inférieure d'un facteur 10 par rapport à la configuration sans prisme. Cette diminution de température va apporter une diminution du taux de signal sur bruit à 20 dB environ versus le 30 dB prévu.

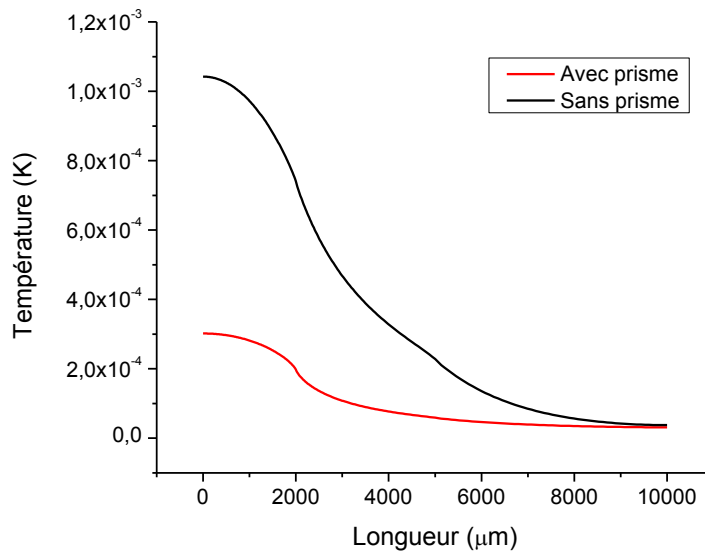


Figure 3.26 Augmentation de température à la surface du microcalorimètre pour une hybridation d'ADN, pour la configuration sans prisme de couplage SPR et avec prisme de couplage SPR.

Il serait très intéressant de trouver une autre configuration pour le système SPR, tel que l'utilisation de guide d'onde pour coupler versus l'utilisation d'un prisme. L'utilisation de guide d'onde pour coupler aux plasmons est très bien connue [76]. Les guides d'ondes SPR ont comme avantage d'être faciles à intégrer et ils n'ont pas de masse thermique ce qui ne diminue pas la sensibilité de la calorimétrie. Par contre, ils sont complexes de mise en œuvre, car l'indice effectif des plasmons pour un couple or/eau est de l'ordre de 1.44 à une longueur d'onde de 700 nm. Le verre a un indice de réfraction de près de 1.51 à 700 nm. L'indice effectif d'un guide d'onde doit être plus élevé que celui du substrat. Dû à ce type de problème, le développement d'un système SPR intégré par guide d'onde dépasse le cadre de cette thèse.

En conclusion de la section sur la conception du système SPR, il fut choisi pour une raison pratique d'utiliser un système SPR avec couplage par prisme et modulation par longueur d'onde malgré la diminution de la sensibilité calorimétrique. La figure 3.27 résume le choix de conception qui fut réalisée.

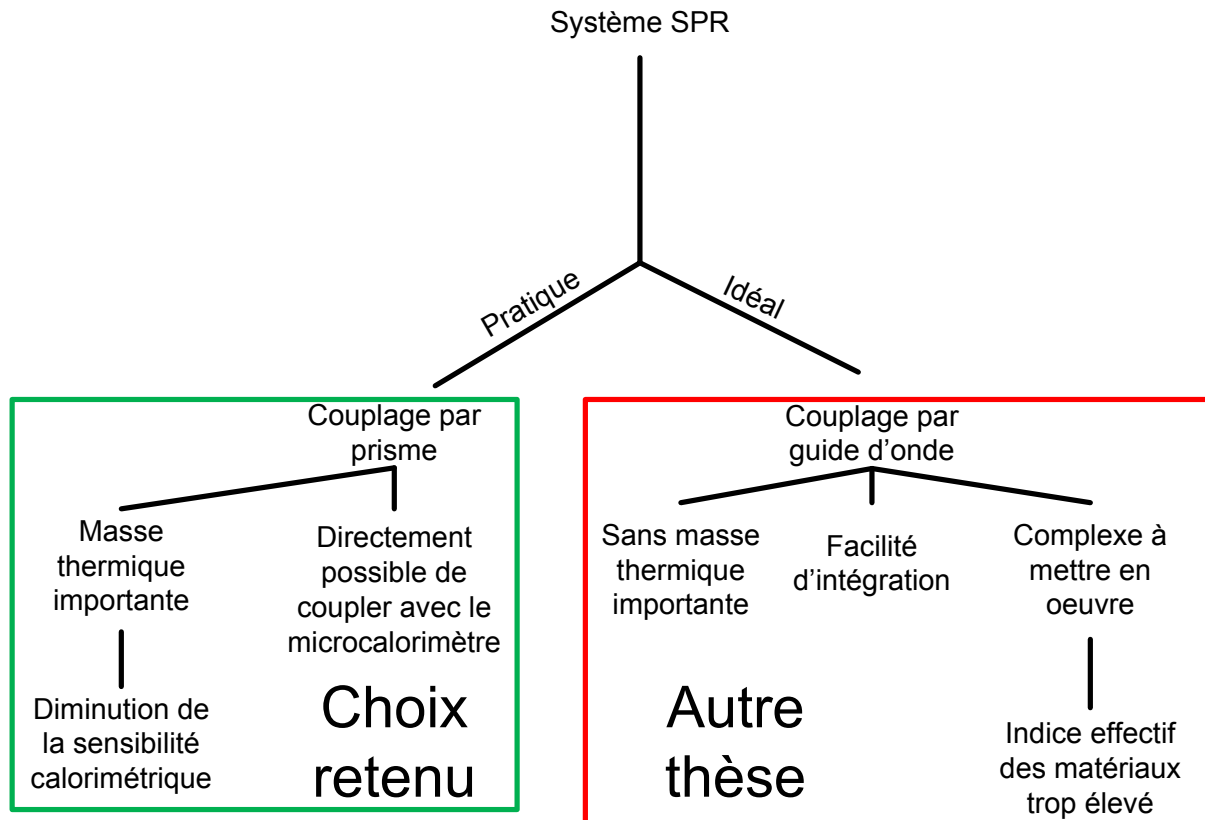


Figure 3.27 Schéma représentatif des deux possibilités pour le système SPR

3.5 Utilisation d'un système actif pour effectuer le transport de masse

Même avec le meilleur capteur de surface, si les cibles ne rentrent pas en contact avec les sondes pour avoir une possibilité d'interactions le capteur ne pourrait rien détecter. Sheehan et *al.* [126] ont calculé le temps nécessaire pour accumuler 100 molécules sur une surface de détection pour une concentration de 1 fM en utilisant seulement la diffusion passive. Au final cela peut prendre plus de 1 semaine avant que 100 cibles interagissent avec les sondes.

Un deuxième phénomène qui peut nuire à la détection par biorécepteur est la limite de diffusion. Lorsqu'un capteur de surface est en limite de diffusion, il se forme une zone près de la surface où la concentration des cibles diminue par rapport à la concentration dans le

volume ce qui provoque la formation d'une zone de déplétion tel que montré à la figure 3.28.

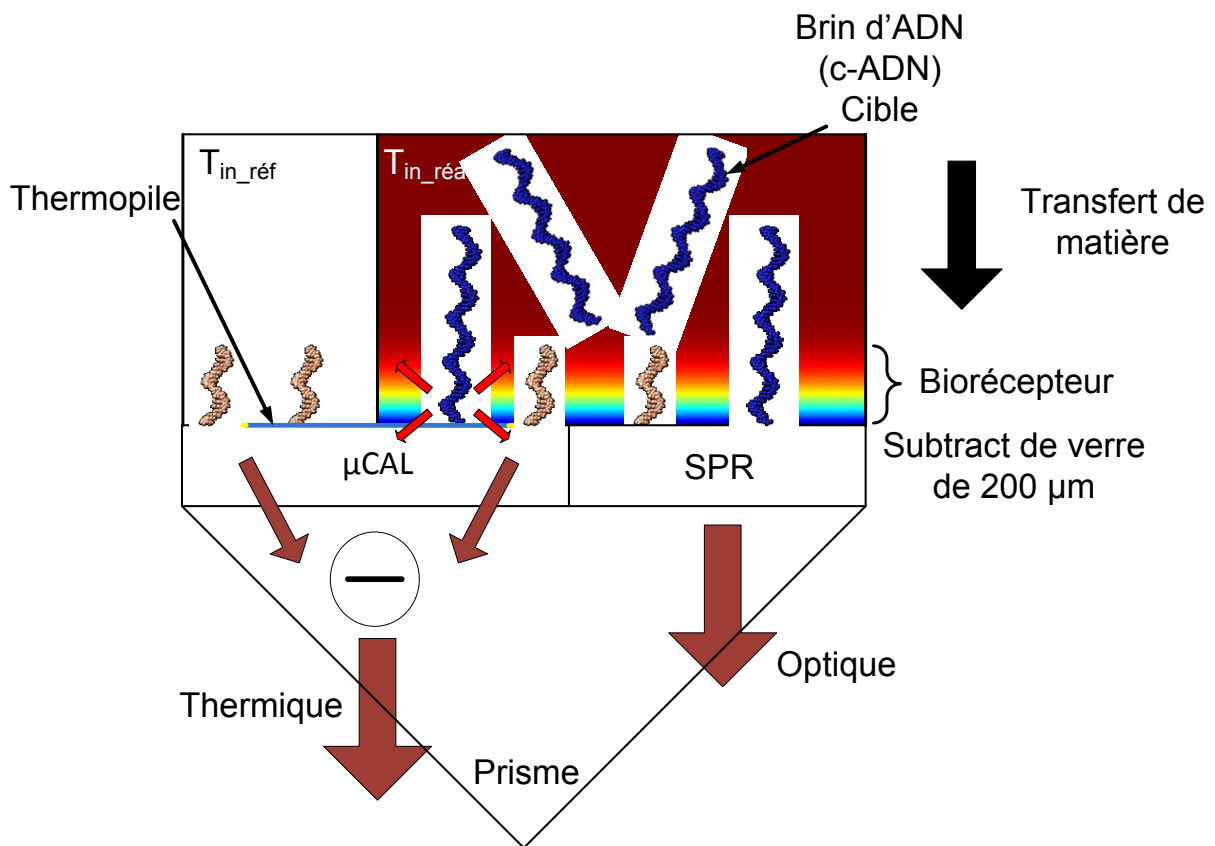


Figure 3.28 Schéma de concept du système complet. Dans la zone de réaction, il est possible de voir un gradient de concentration normal à la surface, gradient qui correspond à la formation de la zone de déplétion près de la surface.

Il est possible de réduire le problème de limite de diffusion avec un flux continu du liquide biologique, ce qui va permettre de régénérer la quantité de molécules près de la surface et ainsi limiter l'apparition de la zone de déplétion. Cela se traduit par un nombre de Péclet appliqué à la diffusion de matière élevé [25]. Le nombre de Péclet appliqué à la diffusion se calcule comme suit :

$$Pe_D = \frac{Lv}{D} \quad (3.11)$$

Où L est la hauteur de la chambre fluide, v est la vitesse du fluide et D est le coefficient de diffusion. Pour éviter d'avoir une zone de déplétion importante, il faut soit une chambre très haute, soit un fort débit. Par contre, pour que le calorimètre soit sensible,

il ne faut pas qu'il y ait beaucoup de convection dans le fluide. Si le fluide au-dessus du calorimètre est renouvelé régulièrement, celui-ci va évacuer la chaleur très rapidement, ce qui va diminuer la sensibilité du calorimètre. Cela se traduit par un nombre de Péclet appliqué à la diffusion thermique faible. Le nombre de Péclet appliqué la diffusion thermique se calcule comme suit :

$$Pe_T = \frac{Lv}{\alpha} \quad (3.12)$$

Où L est la hauteur de la chambre fluide, v est la vitesse du fluide et α est la diffusivité thermique ($\alpha = k/\rho c$). Il n'est pas possible pour conserver la sensibilité calorimétrique d'avoir un flux continu dans le fluide, mais sans avoir de flux il y a un risque de création d'une zone de déplétion et d'être en limite de diffusion et non en limite de réaction, ce qui a pour effet de diminuer la puissance dégagée. Cela ferait en sorte qu'il pourrait être difficile, voir impossible de caractériser les interactions intermoléculaires à l'interface.

La solution proposée ici est d'utiliser un système de mélange actif durant de courtes périodes de temps et de manière périodique. Durant le mélange, la zone de déplétion va fortement diminuer, tandis que durant les périodes où le système de mélange ne fonctionne pas le calorimètre sera en mesure d'effectuer une mesure satisfaisante. Pour ce faire, un système d'ondes acoustiques de surface va être utilisé. Le système sera basé sur les travaux de Renaudin et *al.* [93] et le système comme tel sera explicité au chapitre 5 sous la forme d'un article.

Maintenant que le système est conçu et que les choix technologiques sont faits, il est important de regarder comment il est possible de fabriquer un tel système. Le prochain chapitre, qui est sous la forme d'article scientifique, va porter sur la méthode de fabrication choisie pour le dispositif ainsi que des verrous technologiques que la fabrication d'un tel dispositif demande.

3.6 Conclusion

Tout au long du dernier chapitre, les différentes sections du dispositif de mesure furent conçues. La figure 3.29 montrant le microcalorimètre sur le prisme SPR ainsi que le système de mélange actif basé sur la technologie développée par Renaudin et *al.* [93].

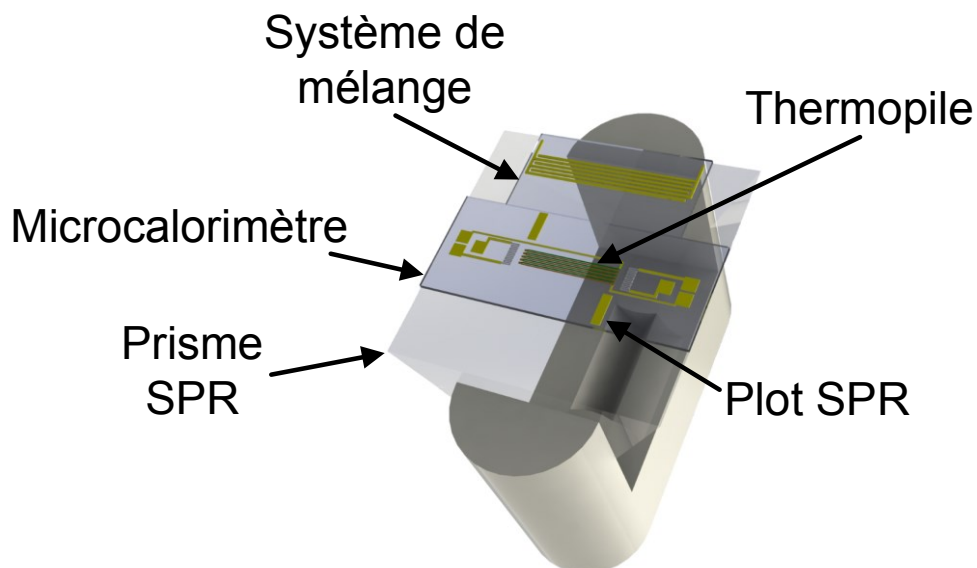


Figure 3.29 Schéma représentatif du dispositif conçu

Voici un résumé des points importants de la conception du dispositif :

Le résumé des choix qui furent réalisés au sujet du biorécepteur :

Tableau 3.11 Résumé des choix de conception du biorécepteur

Caractéristique	Choix
Bioréception choisit	Brin d'ADN de 25 et 18 nucléotides
Fonctionnalisation	Complexe BSA-biotine-Neutravidine-biotine-ADN
Puissance thermique dégagée attendue	800 nW
Sensibilité SPR nécessaire	10^{-4} RIU

Le résumé des choix qui furent réalisés au sujet du microcalorimètre :

Tableau 3.12 Résumé des choix de conception du microcalorimètre

Caractéristique	Choix
Configuration du microcalorimètre	Isotherme à flux en configuration différentiel
Élément de mesure (Transducteur)	Thermopile de 50 paires de Chrome et de Nickel
Support du système	Substrat de verre de 200 μm d'épaisseur

Le résumé des choix qui furent réalisés au sujet de la SPR :

Tableau 3.13 Résumé des choix de conception pour la SPR

Caractéristique	Choix
Type de modulation/méthode de mesure	Modulation par longueur d'onde avec détection du pic
Configuration	Avec un prisme plutôt qu'avec un guide d'onde
Moyen d'intégration avec la microcalorimétrie	Ajout de plot SPR directement sur le substrat de verre où est fabriquée la thermopile

Le résumé des choix qui furent réalisés au sujet du système de mélange :

Tableau 3.14 Résumé des choix pour le système de mélange

Caractéristique	Choix
Système de mélange	Utilisation d'un système actif basé sur des technologies d'onde acoustique de surface
Intégration microcalorimétrique	Sera montrée au chapitre 5
Intégration SPR	Démontrée par Renaudin et <i>al.</i> [37]

Maintenant que le système est conçu et que les choix technologiques sont faits, il est important de regarder comment il est possible de fabriquer un tel système. Le prochain chapitre, qui est sous la forme d'article scientifique, va porter sur la méthode de fabrication choisie pour le dispositif ainsi que des verrous technologiques que la fabrication d'un tel dispositif demande.

CHAPITRE 4 PROCÉDÉ DE FABRICATION (ARTICLE)

4.1 Mise en contexte de l'article

L'intégration de technologie de biodétection est complexe à réaliser, lorsque différentes technologies sont couplées sur un même dispositif. Cet article présente le procédé de fabrication utilisé pour la fabrication du capteur conçu au Chapitre 3. Le procédé fut développé afin d'utiliser les méthodes de fabrication à faibles coûts qui sont disponibles dans les fonderies de microélectronique. Le substrat choisi pour la fabrication du dispositif est une gaufre de Pyrex® de 200 μm à 500 μm d'épaisseur. Le choix de l'épaisseur va jouer sur la sensibilité du microcalorimètre, par contre les fournisseurs à faible tirage ne sont pas en mesure de fournir toutes les épaisseurs en tout temps. Pour le projet, ce sont des gaufres de quatre pouces polies sur deux faces de 500 μm d'épaisseur qui étaient disponibles.

Un des points très importants du procédé de fabrication pour ce type de dispositif est le rendement. Pour la fabrication de dispositifs en salles blanches universitaires, il est plus question de procédés artisanaux que de procédés industriels. Il est donc important de pouvoir corriger les erreurs de fabrication à toutes les étapes. Pour maximiser ce rendement une attention fut prise afin d'utiliser le plus possible des procédés qui utilisent des méthodes industrielles. Par exemple, le chrome est gravé avec une solution industrielle et non pas soulevé, ce qui augmente le rendement et simplifie la fabrication. La stabilité du procédé est très importante puisque le capteur bimodal intégré nécessite plus de 75 étapes de fabrication. De petites variations dans le procédé peuvent entraîner des défauts majeurs dans les dispositifs. Par exemple, la thermopile est faite de 50 lignes de chrome et 50 lignes de nickel de 1 cm le long par 10 μm de large mis en série, ce qui fait une ligne continue de 1 m par 10 μm , s'il y a une défectuosité, la thermopile est non utilisable. Le détail du procédé de fabrication est en Annexe d.

Un des points qui fut traité tout au long du Chapitre 3 est l'importance de la compatibilité entre le procédé de fabrication du microcalorimètre et la mesure SPR. Afin de s'assurer de cette compatibilité, l'article montre une mesure SPR de la fonctionnalisation du biorécepteur. Le biorécepteur est réalisé à l'aide d'un empilement de BSA-biotine-neutravidine-biotine-ADN. La mesure SPR permet de voir qu'il est possible d'effectuer la mesure SPR sur des échantillons qui ont passé par le procédé de fabrication et qu'il est également possible de fonctionnaliser les dispositifs.

Le protocole de fonctionnalisation²³ fut développé à l'École Centrale de Lyon et puisque le système SPR spectroscopique était à l'Université de Sherbrooke, il n'était pas possible de l'utiliser pour effectuer les tests. Un autre système fut monté à l'École Centrale pour effectuer les mesures SPR présentées dans l'article. C'est pour cette raison que les mesures SPR furent réalisées sur un système SPR modulé angulairement. Le système SPR monté à l'École Centrale utilise un système optique pour exciter l'échantillon à tous les angles en même temps pour mesurer la courbe SPR à l'aide d'un CCD ce système est dit à « *fanbeam* ». La Figure 4.1 montre le schéma de fonctionnement du système SPR de Lyon.

²³ Disponible en annexe annexe e

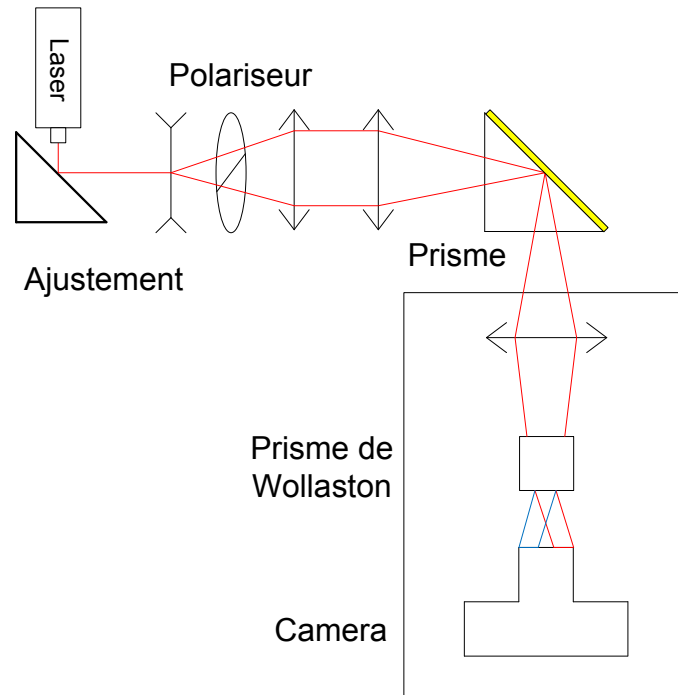


Figure 4.1 Schéma du système SPR de l'École Centrale de Lyon. Ce système fonctionne avec un laser à 635 nm dont le faisceau est focalisé sur l'échantillon. Suite à cela une caméra CCD mesure l'angle à laquelle la résonance SPR se produit. Ce type de système est dit à « *Fanbeam* »

La Figure 4.2 montre le type d'images qui est pris avec le système SPR. Dans l'image il y a deux zones de signal soit :

1. la zone de gauche qui est la polarisation TM et
2. la zone ou il y a couplage SPR et la zone de droite qui est la polarisation TE et qui sert de référence.

La largeur des bandes (axe X) correspond à différents points sur une même ligne sur l'échantillon et la hauteur des bandes (axe angle) correspond à des mesures d'intensité de différents angles d'attaque à l'échantillon. Il est possible d'obtenir un signal SPR en faisant le profil dans la direction des angles de la polarisation TM et en le normalisant avec la polarisation TE. Le profil SPR ainsi obtenu est montré à la Figure 4.3.

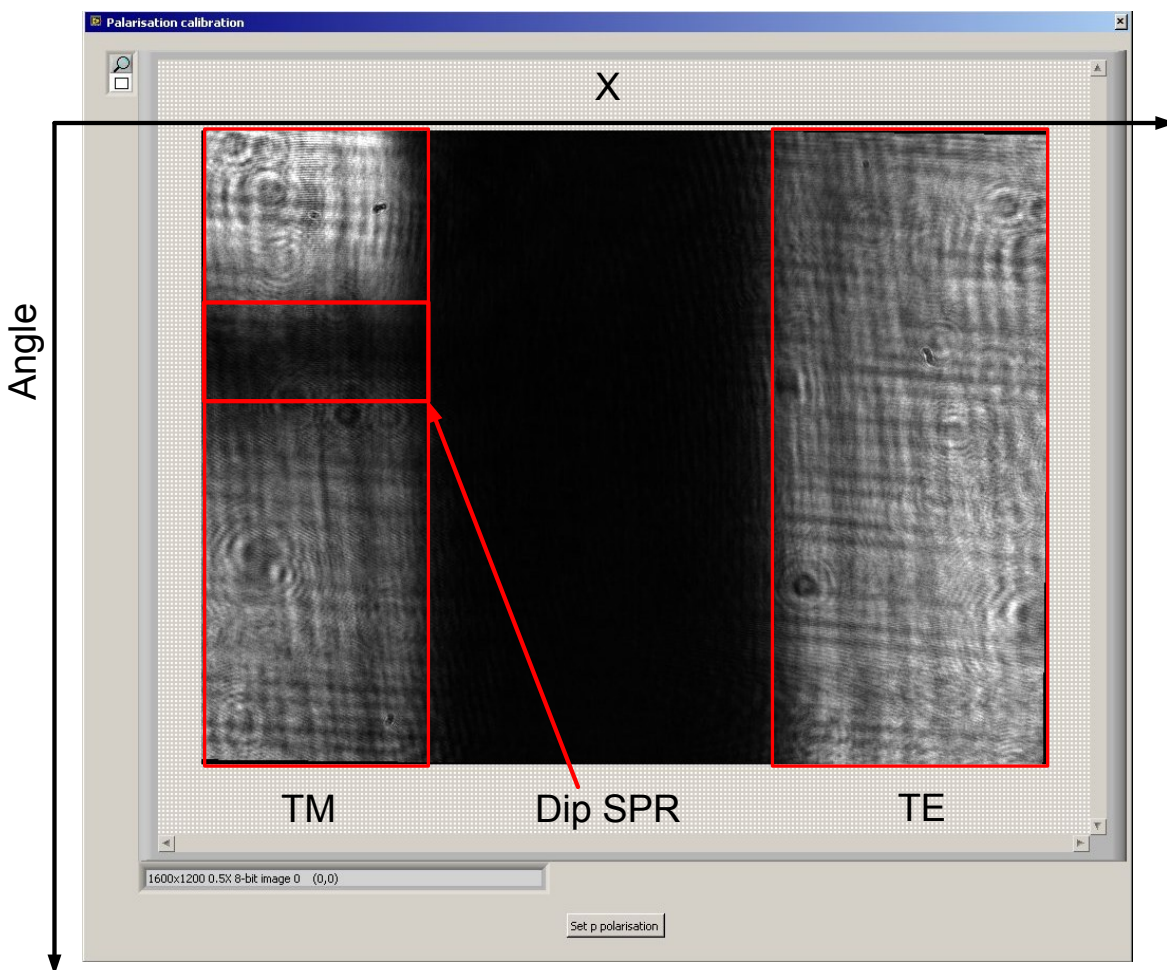


Figure 4.2 Mesure type effectuée par le système SPR « Fanbeam » de Lyon. Il est possible de voir le dip SPR sur l'image prise par une caméra CCD. Tout au long de la cinétique le dip va bouger selon l'axe des angles et c'est en mesurant ce déplacement qu'il est possible d'effectuer une mesure SPR.

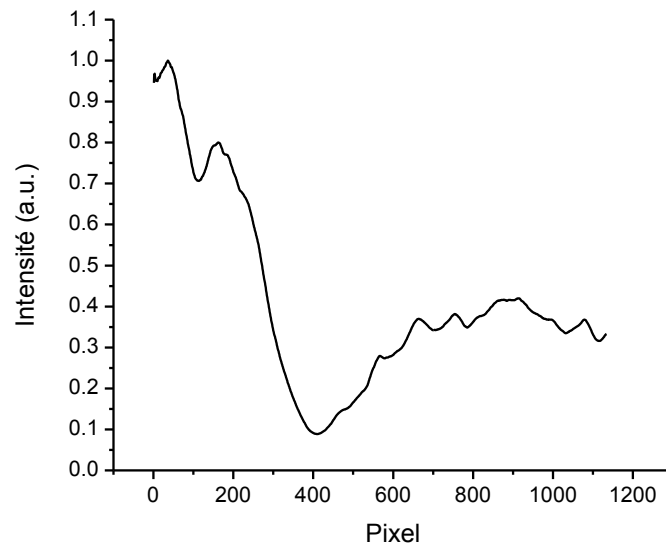


Figure 4.3 Signal SPR obtenu à partir du système SPR « *fanbeam* » de l'École Centrale

En conclusion cet article montre le procédé de fabrication ainsi qu'un test de chimie de surface mesuré par un système SPR avec une modulation par angle.

4.2 Fiche d'identification de l'article du procédé de fabrication

Titre : Micro-Fabrication process for an integrated biosensor composed of a SPR transducer coupled to a microcalorimetric sensor

Auteurs : Rémy Béland, Paul G. Charette, Vincent Aimez, Jean-Pierre Cloarec, Eliane Souteyrand et Yann Chevolut

Soumis au journal : « *International Journal of Nanoscience* » de la société *World Scientific Publishing Company*

État de la soumission : Publiée

DOI : 10.1142/S0219581X12400108

Citation type :

BÉLAND R, CHARETTE PG, AIMEZ V, CLOAREC J-P, SOUTEYRAND E, CHEVOLOT Y. Micro-fabrication process for an integrated biosensor composed of a SPR transducer coupled to a microcalorimetric sensor. *International Journal of Nanoscience*. 2012 Aug;11(4):1240010.

4.2.1 Contribution de l'article à la thèse

Cet article montre comment le dispositif de mesure est fabriqué et il détaille les différentes étapes de sa fabrication réalisées par des procédés habituellement utilisés pour la microélectronique. L'article démontre qu'il est possible de fonctionnaliser le dispositif suite aux différentes étapes de fabrication.

4.2.2 Résumé en français de l'article

L'intégration de technologies de biodétection est complexe à réaliser et à intégrer lorsque différentes technologies sont couplées sur un même dispositif. Cet article présente le procédé de fabrication utilisé pour la fabrication des capteurs intégrés de microcalorimétrie et de SPR. Le procédé fut développé afin d'utiliser les méthodes de fabrication à faibles coûts qui sont disponibles dans les fonderies de microélectronique habituellement utilisées avec du silicium. Afin de s'assurer d'un rendement le plus élevé

possible, une attention particulière fut apportée aux différentes étapes de fabrication afin de s'assurer d'être le plus près possible des méthodes industrielles qui sont plus stables et repérables que certains procédés régulièrement utilisés dans les salles blanches universitaires. La stabilité du procédé est très importante puisque le capteur bimodal intégré nécessite plus de 75 étapes de fabrication. De petites variations dans le procédé peuvent entraîner des défauts majeurs dans les dispositifs.

Un test applicatif de chimie de surface fut réalisé afin de valider la compatibilité des différentes étapes de fabrication des dispositifs avec l'application finale, soit la détection d'interactions intermoléculaires à l'interface solide/liquide. Ce test est constitué d'une adsorption de BSA-biotine, suivi d'une interaction biotine-avidine.

4.3 Article sur le procédé de fabrication

4.3.1 Abstract

Integrated biosensors with several types of transducers are complex to manufacture. This paper presents the fabrication process for a bimodal biosensor by using silicon microfabrication process. The device is composed of a surface plasmons resonance (SPR) transducer and a microcalorimetric device. The fabrication process has a yield in our academic foundry. The device was functionalized with a simple BSA-biotin adsorption. SPR sensing performance was assessed by neutravidin binding to immobilized biotins.

4.3.2 Introduction

Many biochemical reactions and biomolecular interactions can be characterized using biosensing microsystems. Biosensors are composed of a bioreceptor layer that interacts specially with a biomolecular target and a transducer that converts the biorecognition event into a measurable signal. Herein, the microfabrication steps for a hybrid (dual transduction) SPR-microcalorimeter biosensor are presented. The SPR transducer [18] measures reaction kinetics as well as Gibbs energies, while the micro-calorimeter [127] measures release or absorption of heat due to biomolecular interactions. The combination of the two transduction techniques enables the experimental determination of the entropy of biomolecular interactions at a solid/liquid interface. The integration of the two transducers in a micro-system enables the characterization of biomolecular reactions with minute amounts of reagents compared to classical macro-scale calorimetric devices. The biosensor is based on a waveguide surface plasmons resonance (WSPR) sensor [79] coupled to a microcalorimetric sensor.[128] The biorecognition layer is based on neutravidin/biotin interaction. [129,130]

4.3.3 Materials and Methods

Microfabrication process

The entire fabrication process consisted of over 75 individual standard microfabrication steps. Pyrex® wafers (500µm thickness, University Wafer) were used as a substrate due their low thermal conductivity compared to silicon. The microfabrication systems used

included the following: MESC Multiplex CVD (Surface Technologie Systems) for the Plasma- enhanced chemical vapor deposition (PECVD) of SiO₂ layers; BOC Edwards e-beam vapor deposition for metal deposition (chromium, gold and nickel). The chromium, nickel, and gold targets were purchased from Kamis Incorporated.

Substrate preparation: Substrates were cleaned for 10min in Piranha solution (sulphuric acid 96% (H₂SO₄): hydrogen peroxide 30% (H₂O₂), 4:1). After a 10 min rinse in DI water, substrates were dried using a nitrogen flow.

Fabrication of the waveguide: The SPR waveguides consisted in two superimposed PECVD SiO₂ thin-films corresponding to the cladding and core, respectively (Figure 4.4.) The PECVD operating conditions were: 300 mTorr, N₂O 2000 sccm, SiH₄ 17 sccm, 380kHz, 700W. The cladding layer was 4µm thick with a refractive index of 1.47±0.009. The core layer was 3µm thick with a refractive index was 1.48± 0.009. Therefore, the minimum refractive index difference between the core and the cladding was 0.009.

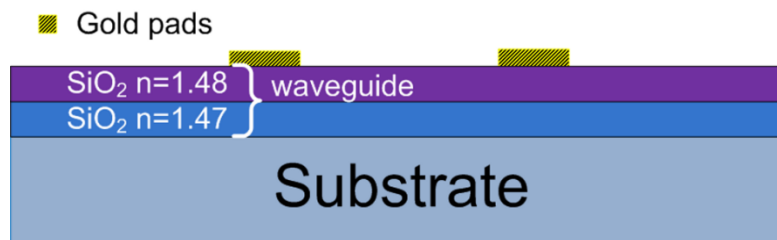


Figure 4.4 Cross-section of the WSPR waveguide and SPR sensor pads

Fabrication of the thermopile: The thermopile fabrication process consisted of a succession of e-beam metal evaporations of chromium (200nm) and nickel (250nm) for 50 thermo-couples in series. Patterning of the chromium layer was achieved using standard photolithography based on Shipley S1813 photoresist and wet etching with standard commercial chromium etching solution (AMTRON ETC 212C). For nickel, the same photolithography process was used, with the addition of a 10 min hard bake at 125°C after exposure. The etching process was completed in a diluted solution of aqua regia composed of concentrated hydrochloric acid, nitric acid and water (HCl:HNO₃:H₂O, 3:1:2).

[131]

Fabrication of the SPR sensing pads and thermopile electrical connection pads:

The thermopile connection pads and the SPR sensing pads consisted of a 50nm gold layer over a 3nm chromium adhesion layer. Patterning was achieved using a lift-off process based on LOR3A and Shipley S1813 photoresists. After metal evaporation and exposure, the fabrication process was completed by lift-off (4 h) in a photoresin remover (Nanoremove PG, MicroChem Corp.). Figure 4.5 shows the final result with the thermopile pattern.

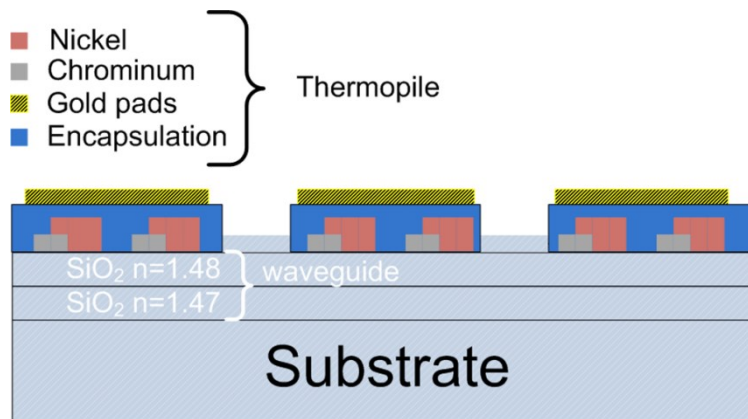


Figure 4.5 (Color online) Cross-section of the hybrid sensor with WSPR waveguide and SPR sensing pads in grey and the calorimetric device in color.

Fabrication and passivation of the calorimetric sensing pads: Thermopile sensing pads were passivated with a deposition of 250nm of SiO₂ by sputtering (Emi- tech, model K550 Sputter coater). The calorimetric sensing pads were fabricated similarly to the SPR sensing pads. The SPR sensing pads were exposed by wet etching with buffered oxide etchant (BOE (6:1) from Amplex Ltée).

Summary: The complete device is shown in Figure 4.6. Figure 4.7 shows a summary of the fabrication process.

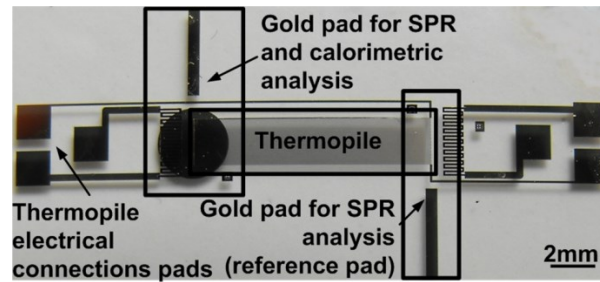


Figure 4.6 Picture of integrated biosensor device.

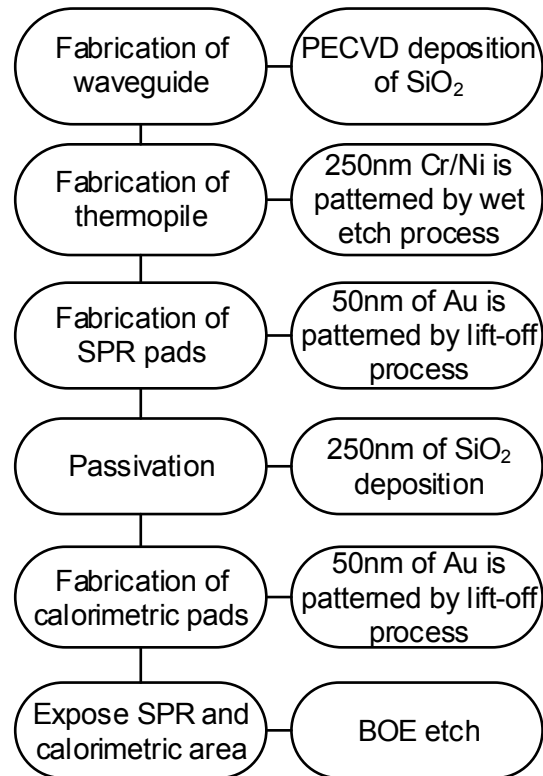


Figure 4.7 Summary chart of the fabrication process.

Surface functionalization

The bioreceptor layer atop the sensing pads was a BSA-biotin monolayer physisorbed onto the gold surfaces. The well-known avidin/neutravidin pair was used as a model for validating SPR transduction.

The biosensor surface was cleaned sequentially for 10min in acetone, isopropyl alcohol (IPA) and DI-water and then dried with a stream of nitrogen. The surface were incubated for 25min at room temperature in 1X PBS solution containing 2mg/mL of BSA-biotin (Thermo Scientific), followed by a rinse in 1X PBS. Bioreceptor/target interaction was

performed by injecting neutravidin (1mg/ml) (Pierce Biotechnology) in 1X PBS buffer. The target solution was left to interact with the bioreceptor film for 25min at room temperature. The samples were then washed in PBS 1X.

4.3.4 Results and Discussion

SPR+calorimetry hybrid sensor

The expected sensitivity of the calorimetric device, obtained by numerical simulation (result not shown), is 1.2V/W. The measured sensitivity of the SPR device is 10^{-5} RIU. This is comparable to standard SPR devices. Analytical performances of both modalities in the hybrid microbiosensor are thus expected to be equivalent to the performances of separate SPR and calorimetric microsensors. Both transducers were designed for performing differential measurements (comparison of sample signal with a reference signal).

The critical element of the hybrid sensor was the fabrication of the thermopile. The thermopile consists of 10 μ m wide tracks that are over 1m long cumulatively. If perfect continuity over the entire track length is broken due to a single micro-fabrication defect, the entire thermopile is non-functional. The fabrication process described in Figure 4.8 was specially developed for this challenging task and has shown excellent yield.

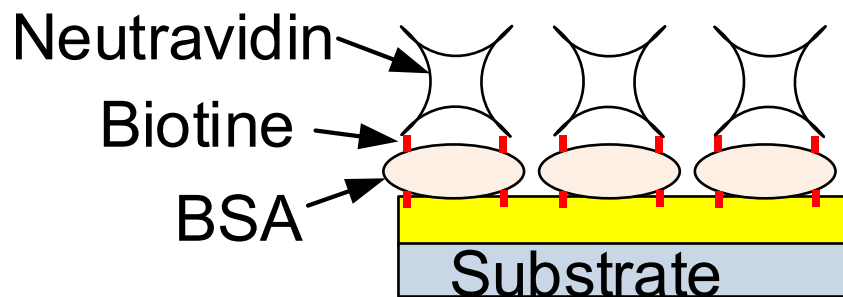


Figure 4.8 Avidin/neutravidin pair used as a model for validating SPR transduction.

Monitoring of surface chemistry on SPR pads

BSA-biotin functionalization and detection of neutravidin were achieved on the gold SPR pads and monitored by SPR real time analysis (Figure 4.9).

In Figure 4.9, the formation of the BSA-Biotin (a) functionalization layer and the binding of neu- travidin (b) involved an important change in the SPR signal. Rinsing after BSA- biotin binding and neutravidin binding did not cause significant decrease of the SPR signal. This showed that the anchoring of the molecules to the surface is stable. These measurements demonstrate that the fabricated structure can be used for SPR applied to the analysis of kinetics of biomolecular binding.

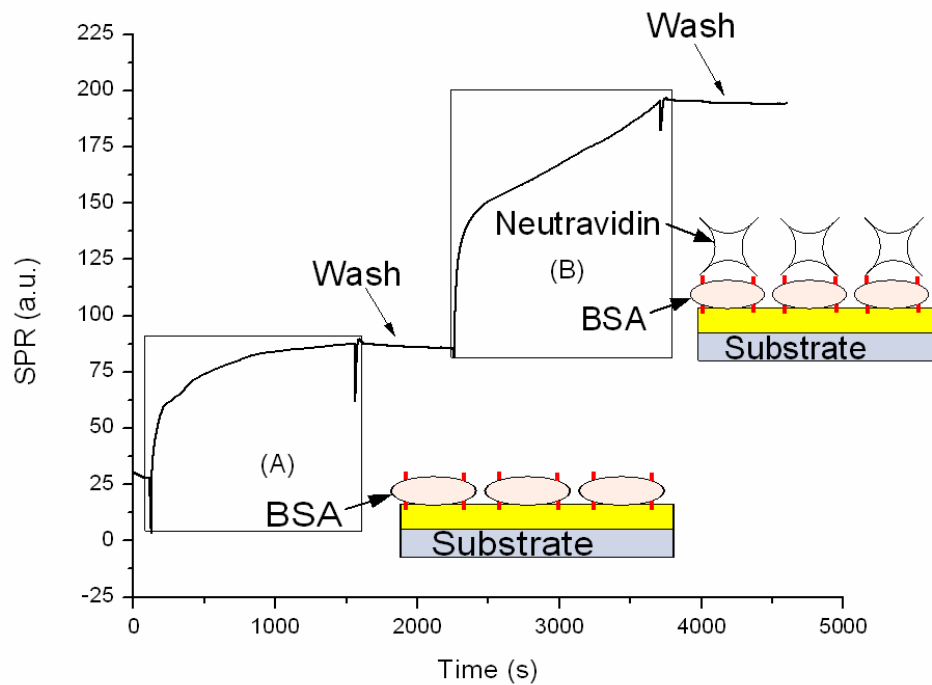


Figure 4.9 SPR monitoring of molecular interaction]{SPR monitoring of molecular interaction: (a) BSA- biotin binding on gold; (b) neutravidin biding to biotin.

4.3.5 Conclusion

The fabrication process of an integrated hybrid WSPR/microcalorimeter was presented. The device allows simultaneous measurement of the kinetics and the enthalpy of molecular interactions at a solid-liquid interface in real time.

4.3.6 Acknowledgments

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), NanoQuébec, la Région Rhône-Alpes (Accueil-Doc), École

Centrale de Lyon, ANR-08-BLAN-0114-01 and LyonBioPole. The authors would like to thank the Institut interdisciplinaire d'innovation technologique (3IT) (Canada) and Nanolyon (France) for technical support.

CHAPITRE 5 MÉTHODE DE MÉLANGE ACTIF PAR ONDES ACOUSTIQUES DE SURFACE

5.1 Avant-propos de l'article

Dans le Chapitre 3 et le Chapitre 4 la conception et la fabrication des dispositifs furent présentées. Le présent chapitre est constitué d'un article scientifique qui démontre l'utilisation et la caractérisation du système de mélange actif basé sur des technologies d'ondes acoustiques de surface (SAW). Dans les chapitres précédents, il fut déjà question de l'intérêt et de la nécessité d'utiliser ce type de dispositif pour des capteurs utilisant des récepteurs fonctionnalisés à une surface.

Les expériences réalisées pour l'article démontrent la fonctionnalité du système utilisant des SAWs afin d'améliorer les mesures microcalorimétriques. Renaudin et *al.* ont montré en 2010 que l'utilisation d'un système de SAWs améliorerait les mesures SPRs pour une interaction moléculaire à l'interface liquide/solide [93].

5.1.1 Microcalorimètre pour les tests de mélanges

Le calorimètre utilisé pour la démonstration du système de mélange fut conçu préalablement au laboratoire de biophotonique pour la mise en œuvre de la méthode de calibration à l'aide des éléments chauffants [46]. L'utilisation de ce type de microcalorimètre est due à la géométrie des échantillons SAW disponibles ainsi qu'à la disponibilité d'échantillon calorimétrique au moment de l'exécution des mesures. La Figure 5.1 montre un schéma du microcalorimètre utilisé. Tous les détails sur ce microcalorimètre sont présentés dans l'article.

Ce calorimètre est environ 5 fois moins sensible que le calorimètre tel que conçu au Chapitre 3, par contre cette différence de sensibilité n'est pas une limitation pour la réalisation de la preuve de concept.

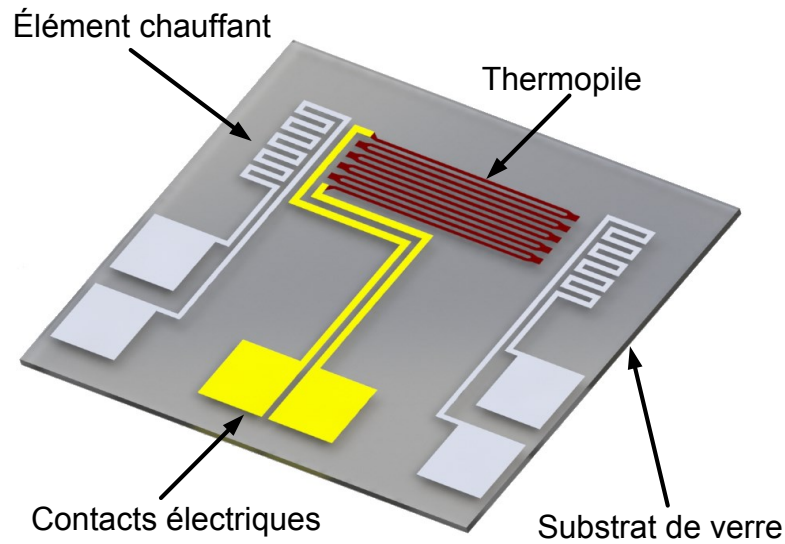


Figure 5.1 Schéma du microcalorimètre utilisé pour effectuer la preuve de concept du système de mélange par ondes acoustiques de surface.

5.1.2 Banc de test calorimétrique

Les mesures furent réalisées dans un banc de test conçu à cet effet. La Figure 5.2 montre un schéma du banc de test calorimétrique utilisé pour réaliser les expériences présentées dans l'article de la section 5.3.

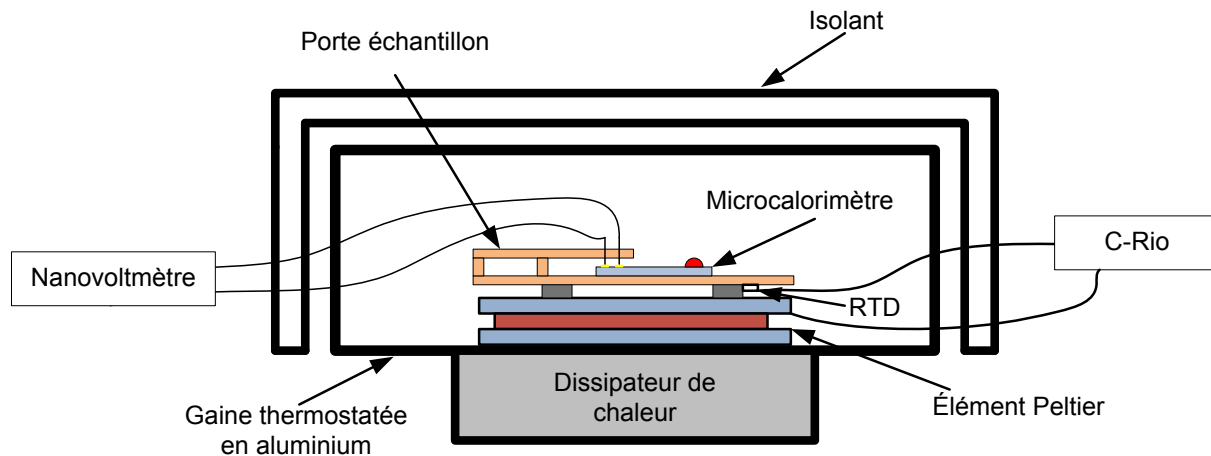


Figure 5.2 Schéma du banc de test utilisé pour la preuve de concept du système de mélange utilisant les ondes acoustiques de surface.

Ce banc de test isole le système calorimétrique de l'environnement. La température à l'intérieur de la gaine thermostatée en aluminium est contrôlée par un contrôleur temps réel CompactRIO par l'entremise d'un élément Peltier avec une précision de de $\pm 0.01^\circ\text{C}$.

Le microcalorimètre est posé sur un support à échantillons et celui-ci est connecté à l'aide de pointes à un nanovoltmètre. C'est par l'entremise du nanovoltmètre que le signal de la thermopile est extrait. Un exemple de mesure du signal calorimétrique est montré à la Figure 5.8 dans l'article à la section 5.3.

5.2 Fiche d'identification de l'article sur le mélange actif

Titre : **Microcalorimetry combined with acoustofluidic mixing for measurements of droplet-based reaction thermodynamics**

Auteur : Rémy Béland, Alan Renaudin, Jean-Pierre Cloarec, Yann Chevolot, Vincent Aimez, Frédéric Sarry, Thibaut Roux-Marchand, Michaël Baudoin, Olivier Bou Matar and Paul G. Charette

Soumis au journal : Lab-on-a-Chip

État de la soumission : En évaluation

Numéro de soumission : LC-ART-09-2013-051059

Citation type :

Béland R, Renaudin A, Cloarec J-P, Chevolot Y, Aimez V, Sarry F, et al. Microcalorimetry combined with acoustofluidic mixing for measurements of droplet-based reaction thermodynamics. Lab on a Chip. 2013;

5.2.1 Contribution de l'article à la thèse

Cet article montre l'utilisation, les bienfaits et les impacts du système de mélange actif basé sur des technologies d'ondes acoustiques de surface (SAW) appliquée pour la mesure avec le dispositif de microcalorimétrie.

5.2.2 Résumé en français de l'article

Cet article présente un dispositif microfabriqué qui combine un système de microcalorimétrie avec un système de mélange actif basé sur une technologie d'ondes acoustiques de surface (SAW). Une mesure test d'analyse thermodynamique fut réalisée par le microcalorimètre avec et sans mélange actif. Cela va permettre de démontrer que pour un système microcalorimétrique, le système actif de mélange permet d'augmenter le signal et d'accélérer une réaction qui est limitée par la diffusion. De plus, une analyse de

l'impact du dispositif de mélange sur la mesure microcalorimétrique est réalisée. Cette analyse a permis de définir un mode de fonctionnement par impulsion du dispositif de mélange. Pour bien comprendre comment le système de mélange fonctionne, une analyse numérique a été réalisée afin de caractériser le mélange.

5.3 Article

5.3.1 Abstract

This paper presents a microfabricated device for measuring reaction thermodynamics in droplets. The device combines a differential microcalorimeter with a microfluidic mixing system based on surface acoustic waves (SAW). The device measures heat absorbed/released by a chemical or physical process in a 10 μl reaction droplet relative to an equal-volume reference droplet. The thermal transducer in the microcalorimeter is a thermopile consisting of 25 Au-Ni thin-film thermocouples connected in series on a glass cover slip. Numerical modelling and experimental results of sucrose dilution experiments are presented. The thermal power measurement signal-to-noise ratio (SNR) is 500:1 and the noise-equivalent-power (NEP) is 90 nW/Hz^{1/2}. The acoustofluidic mixing doubles the speed of the reaction kinetics. The device is sufficiently robust to be used with manual pipetting of droplets.

5.3.2 Introduction

Microfabricated transducers can be used to measure changes in material properties in small volumes, such as variations in refractive index (surface plasmon resonance), mass and viscoelasticity (quartz crystal microbalance), electrical properties (electrical impedance spectroscopy), thermodynamic properties (microcalorimetry, as described in this paper), and others. In addition, microfabricated transducers can be used as sensors for detecting the presence of molecular targets of interest from measurements of local changes in material properties. One of the challenges in sensor design is to choose the optimal combination of material properties to be monitored for effective detection of the intended target.

A microcalorimeter is an instrument designed to measure the thermal dynamics of a physical or chemical process in small volumes. A microcalorimeter has a *reaction* vessel, where the process under study occurs at temperature, T_c , enclosed in a *jacket* that is passively or actively maintained at temperature, T_j . The jacket also isolates the entire system from the outside environment. There are two main types of microcalorimeters: *adiabatic* ($T_c = T_j$, e.g. there is no net thermal energy exchange between the reaction vessel

and the jacket) and *isothermal* or *heat-flow* (T_j is maintained at a constant temperature, resulting in a net thermal flux between the reaction vessel and the jacket). Most microcalorimeters include a second *reference* vessel. Such *differential* microcalorimeters are designed to minimize asymmetries in the system so that any difference in thermal flux from the two vessels to the jacket is overwhelmingly attributable to the respective differences in physical or chemical process taking place inside the two vessels.

Microcalorimeters based on *microfabricated thermopiles* (thin-film thermocouples connected in series on a planar substrate) have been used very successfully in a number of applications, such as melt curve measurements [132], chemical reaction characterisation [60,133], gas detection [19,134], MEMS based accelerometers [135–137], light detection [138], and biological reaction characterisation [20,139]. Some of the most sensitive devices are based on a design published by Herwaarden [118] where the thermopile is fabricated on thin membranes (thickness 0.5-10 μm) to minimize thermal conductivity between the vessels and the jacket, thereby maximizing sensitivity.

One of the disadvantages of microcalorimeters based on thin membranes is their extreme fragility. For example, the simple act of depositing a droplet onto a device by pipetting is enough to burst a thin membrane. Hence, in a droplet-based instrument such as the one described here, the substrate must necessarily be more robust. A thicker substrate will increase the thermal conductivity from the vessels to the jacket, which in turn will reduce the measurement resolution. Our results, however, show that the decrease in resolution is acceptably small compared to similar work in the literature and offset by mixing which reduces total thermal losses to the jacket via shortened reaction times.

In most systems involving microfluidics, reaction kinetics are often *mass-transport-limited* [140], whereby diffusion of reactive particles in the medium is the limiting factor in the overall dynamics due to the laminar nature of flow. As a result, the observable kinetics are the convolution of the intrinsic reaction kinetics with the diffusion dynamics. Though under certain constrained conditions they can be decoupled using modelling, it is ultimately desirable for the intrinsic reaction kinetics to be directly observable. Therefore, mixing in microfluidics-based systems not only converts advantages directly related to

increased reaction speed (improved measurement dynamic range, timeliness of results, etc.), mixing also can reveal intrinsic reaction kinetics directly.

As a result, advanced chemical and physical microfluidic measurement systems incorporate some form of mixing as a solution to the diffusion/mass-transport problem[141–143]. Mixing systems can be either passive[144] or active[24]. Passive mixing relies on microfluidic channel designs and/or obstructions in the flow to produce mixing. Active systems use mechanical actuation, thermal gradients, acoustic streaming, dielectrophoresis, electrokinetic effects, and others[24]. Our group recently developed a biosensing technique that combines SPR with active microfluidic mixing based on surface acoustic waves (SAW) on a common planar substrate[145].

This paper describes a *heat-flow* microcalorimeter that combines a microfabricated thermal transducer with SAW-based microfluidic mixing with a view to simultaneously maximize the thermal flux measurement signal-to-noise ratio and minimize the diffusion/mass-transport limitation problem. The performance of the device is characterized using a standard sucrose dilution protocol[146], with both numerical modelling and experimental results presented.

5.3.3 Materials and Methods

The microcalorimeter and SAW device are fabricated on a glass cover slip and a LiNbO₃ slide, respectively. The microcalorimeter is placed atop the SAW device with a thin film of water between the two acting as an impedance matching layer[147] (Figure 5.3-a). The mechanical energy from the SAW generated at the surface of the LiNbO₃ substrate is transmitted to the glass substrate via the water film as a bulk Lamb-type acoustic wave[148].

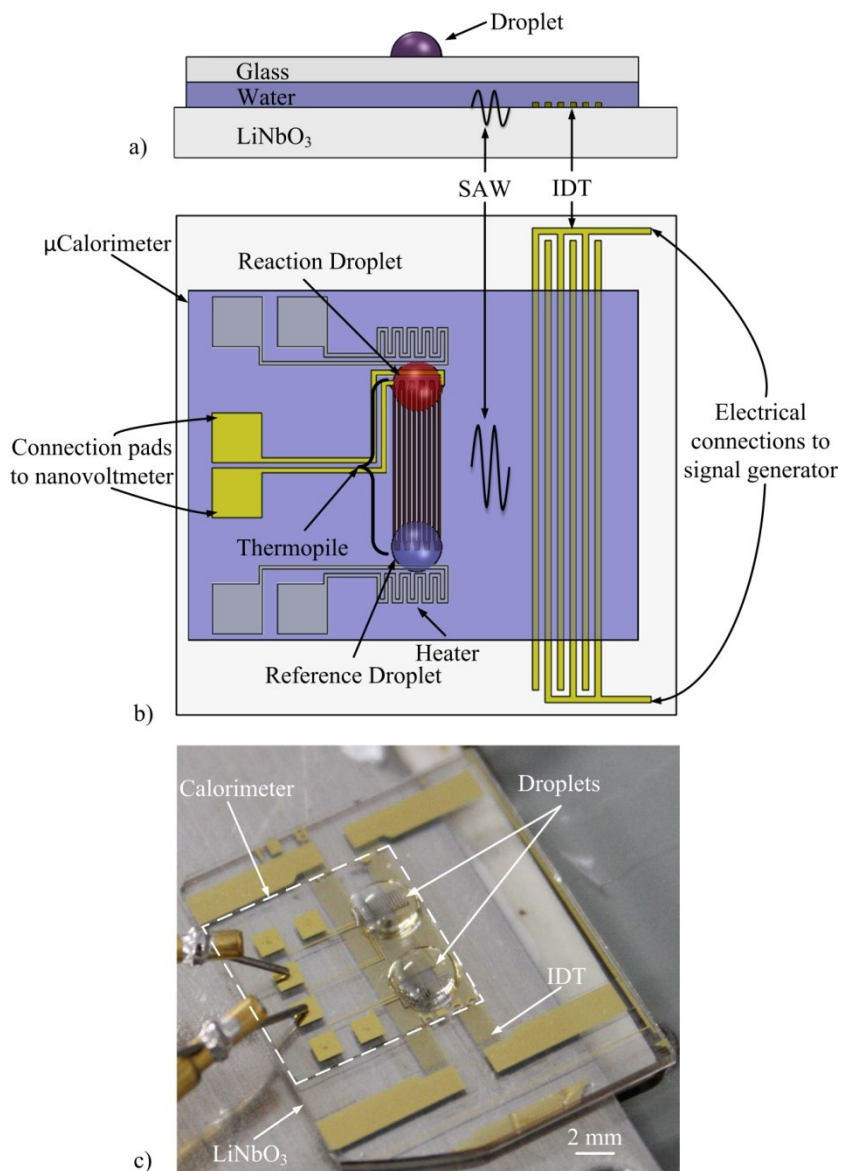


Figure 5.3 (a) Side-view schematic diagram of the device showing the glass and LiNbO₃ substrates with the water film impedance matching layer, as well as the interdigitated transducer electrodes (IDT); (b) Top-view schematic diagram of the device showing the micro

The microcalorimeter measures the heat released or absorbed by a chemical or physical process in a 10 μ l reaction droplet, referenced to a second equal-volume droplet without the reaction, termed the reference droplet (Figure 5.3-b). A picture of the microcalorimeter atop the SAW device is shown in Figure 5.3-c.

The entire system is placed inside a temperature-controlled enclosure consisting of a thermally insulated chamber, a large thermal mass, and a Peltier device. The temperature

inside the enclosure is controlled by a National Instrument™ CompactRIO™ cRIO-9072 real-time controller and maintained at 25°C +/- 0.01°C. Custom LabVIEW-based software controls the experiments.

Microcalorimeter

A *differential* heat-flow microcalorimeter measures the thermal flux from the reaction vessel to the jacket due to the heat released or absorbed by a process in the vessel, $\Phi(t)_s$, relative to the thermal flux from a reference vessel to the jacket, $\Phi(t)_{ref}$. The total heat, $h(t)$, released or absorbed in the reaction vessel after time, t , is the integral of the difference in thermal fluxes to the jacket[49]:

$$h(t) = \int_0^t (\Phi(t)_s - \Phi(t)_{ref}) dt \quad (5.1)$$

In this design, the reaction and reference vessels are 10 μ l fluid droplets. The “jacket” is the local air environment within the temperature-controlled chamber, as well as the glass and LiNbO₃ substrates. The difference in heat flux to the jacket between the droplets is measured by a thermopile (thin-film thermocouples connected in series) with the reaction droplet located atop the hot junction of the thermopile and the reference droplet atop the cold junction. The thermopiles consist of 25 Au-Ni thermocouples in series microfabricated on zinc titanium glass coverslips (No. 1½, 24 mm x 40 mm, 160 μ m - 190 μ m in thickness, Corning, USA). Prior to fabrication, substrates were first cleaned by sequential immersion in acetone, propanol, and de-ionised water and dried under nitrogen. LOR (Microchem, USA) and Shipley resists was used for patterning by UV photolithography (200 Tabletop Aligner, OAI, USA). The photoresist was developed in MF®-319 (Microposit, USA) to provide an undercut for lift-off. Metal films were deposited by physical vapor deposition (PVD) using a BOC Edwards Auto 306 e-beam Evaporator (Edwards, USA). Lift-off was carried out sequentially to fabricate the 100 nm gold thermocouple lines (3 nm Cr adhesion layer) followed by the 200 nm nickel thermocouple lines. A nanovoltmeter (model 2182A, Keithley, USA) measured the voltage difference between the cold and hot junctions of the thermopile. As shown in our prior work, the thermopile voltage, V_{TH} , is linearly related to the difference in thermal fluxes to the jacket

between the thermopile junctions $V_{TH} \propto (\Phi(t)_S - \Phi(t)_{ref})$ to within the noise level of the transducer [128].

Surface acoustic wave (SAW) microfluidic mixing device

The SAW devices were fabricated on X-cut LiNbO₃ substrates[149]. Excitation interdigitated transducer (IDT) electrodes consisted of 10 double split-finger pairs, where the desired wavelength of the acoustic waves, λ_a is equal to the pitch or “finger period”, $2d$, of the IDT electrodes. The excitation frequency, f_0 , is related to the mechanical wave propagation speed in the substrate, ν by:

$$f_0 = \nu / \lambda_a \quad (5.2)$$

where $f_0 = 20$ MHz and $\lambda_a = 180$ μm by design for optimal mixing efficiency. The IDT electrodes were fabricated using 48 nm-thick Au films atop a 3nm-thick Cr adhesion layer. The resonant frequency of the microfabricated devices was measured at 19.5MHz, where the small difference with the intended design frequency is attributable to variations in the fabrication process.

Numerical modelling of SAW mixing

SAW mixing in the droplets was modeled in the frequency domain using the General Form Modes of COMSOL Multiphysics across the four material domains in the device: piezoelectric substrate, water film, glass cover slip, and water droplet. The modeling was carried out in two steps[150,151]:

(1) Calculation of the “acoustic energy-induced” velocity field within the droplets imparted to the fluid by the mechanical energy from the SAW, using linear relationships for acoustic waves in a thermoviscous fluid (dynamic viscosity of 0.01 Pa.s for a 2.5 M sucrose dilution in an aqueous solution). The boundary conditions used were stress-free conditions between the droplet and the ambient air as well as continuity of normal stress and displacement between the droplet and the glass surface. This velocity field gives rise to an acoustic stress force distribution in the droplet given by:

$$F = -\rho_0 \langle (v \cdot \nabla) v + v(\nabla \cdot v) \rangle \quad (5.3)$$

where the $\langle X \rangle$ indicates time averaging, ρ_0 is the fluid density, and v is the acoustic energy-induced velocity.

(2) Calculation of the resulting total velocity field in the droplet by solving the Navier-Stokes equations for incompressible fluids driven by the acoustic stress force distribution, F .

Measurements of thermal dynamics: sucrose dilutions

In microcalorimetry, it is especially challenging to compare results between different experimental setups. For this reason, we chose to publish results using a standard experimental model in the hope that this may be more useful to readers in assessing the potential of this technique for their own specific needs. Validation experiments are therefore based on a widely accepted model for both calorimetry and fluidic mixing [146], namely sucrose dilutions in DI water. The experiments were performed as follows: a 5 μl droplet of 5 M sucrose in DI water was placed on the hot junction of the thermopile (reaction droplet) and a 10 μl droplet of 2.5 M sucrose solution was placed on the cold junction (reference droplet). A baseline voltage measurement from the thermopile was acquired for 1 minute. A 5 μl droplet of DI water was then added to the reaction droplet to both equalize droplet volumes and total quantity of sucrose, using great care to minimize any mixing due to the pipetting action. Immediately after injection, a 30 dBm excitation pulse train with a period of 30 s and a duty cycle of 1/30 (1 sec on and 29 sec off) applied to the IDT electrodes started the SAW generation (30dBm power for 1s is the maximum safe level of operation without risk of mechanical damage to the SAW devices) . The heat released by the sucrose dilution was then monitored by the device for 30 min, followed by a second baseline acquisition for 15 min.

Parasitic heat contributions from acoustofluidic mixing

As with most active mixing methods, the SAW inject parasitic heat into the fluid through mechanical and electrical coupling. SAW have in fact been used to control temperature in fluids[152,153]. The magnitude of this effect is considerably reduced by the differential nature of the device design but sufficient asymmetry remains in the actual microfabricated

devices for the effect to be observable. The amplitude and dynamics of this effect were investigated both by numerical modelling and experimental measurements.

The temperature perturbation profile in 10 μl droplets caused by the SAW excitation protocol described above was measured experimentally with a thermal camera (model SC5000, FLIR, USA). Based on the maximum temperature elevation measured by the camera (0.9 $^{\circ}\text{C}$) due to SAW heat injection during experiments, numerical modelling in COMSOL was used to calculate the time taken by the temperature in the droplets to return to a steady state in order to estimate the duration of the perturbation (“relaxation time”). The perturbation profile in actual thermopile differential voltage measurements was compared to the modelled results.

5.3.4 Result and discussion

Numerical modelling of total velocity field in a 10 μl droplet

Results from the two-step method used to model SAW mixing of a 10 μl droplet of 2.5 M sucrose aqueous solution atop a material stack consisting of glass, water film, and LiNbO_3 layers under 19.5 MHz SAW excitation are shown in Figure 5.4. The top diagram (Figure 5.4-a) shows the distribution of the acoustic stress force amplitude (maximum value = 2.10^{-3} N/mm^3). Figure 5.4-b shows the distribution of the resulting total fluid velocity field amplitude, with values superior to 0.2 mm/s for over 90% of the volume and a maximum value of 1.3 mm/s. Note that the highly heterogeneous nature of the fluid velocity field (amplitude and direction, not shown) gave a fairly high degree of confidence that mixing was fast and complete.

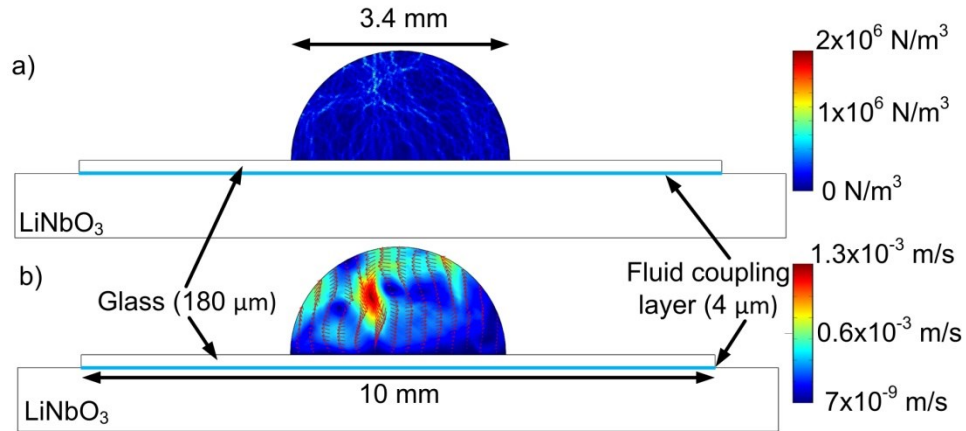


Figure 5.4 Modeling results for a 10 μl droplet of 2.5 M sucrose aqueous solution atop a stack consisting of glass, water film, and LiNbO₃ layers under 19.5 MHz SAW excitation. Top: acoustic stress force amplitude distribution, ; Bottom: fluid total velocity field amplitude distribution.

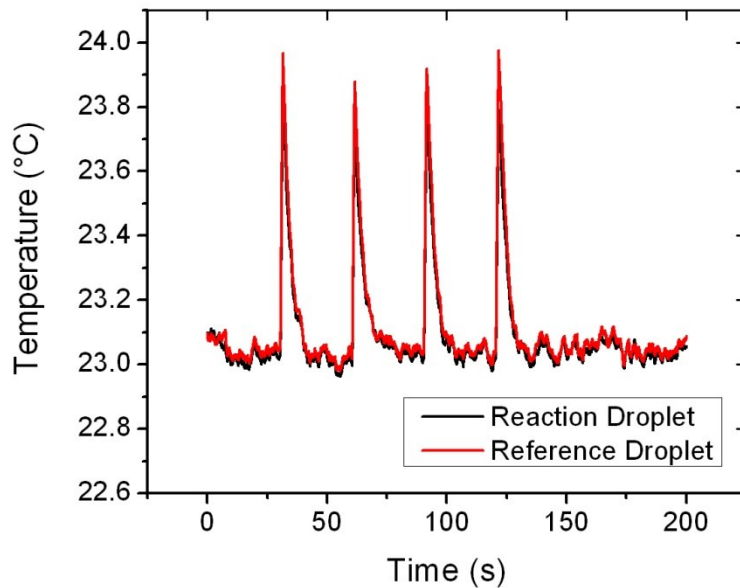


Figure 5.5 Thermal camera measurements of the temperature perturbation profile in 10 μl droplets resulting from a 30 dBm SAW excitation pulse train with a period of 30s and a duty cycle of 1/30 (1 sec on and 29 sec off).

Parasitic heat in the thermal measurements from the SAW

In order to ensure that the parasitic heat arising from SAW excitation did not contaminate the thermal measurements from the actual process under study, this effect was carefully characterized. Firstly, the actual temperature perturbation profile in 10 μl droplets

attributable to the SAW excitation protocol (30 dBm excitation pulse train with a period of 30 s and a duty cycle of 1/30) was measured experimentally with the thermal camera. As seen in the Figure 5.5, the temperature increase reached a maximum of 0.9 °C with a relaxation time of less than ~15s. Figure 5.6 shows a corroborating numerical simulation in COMSOL of temperature decrease in the droplet from a starting value of 25.9°C, with initial boundary conditions of 25°C for the surrounding air and underlying material stack. These results yield a relaxation time in the same order as the thermal camera measurements.

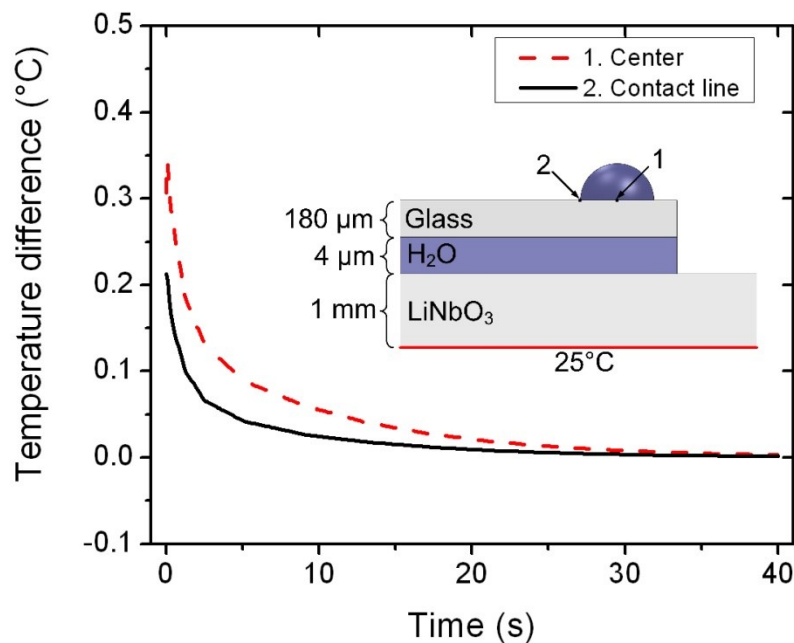


Figure 5.6 Numerical simulation in COMSOL of temperature relaxation time in a 10 µl droplet at two points from a peak at 25.9°C, with initial boundary conditions of 25°C for the surrounding air and underlying substrate stack.

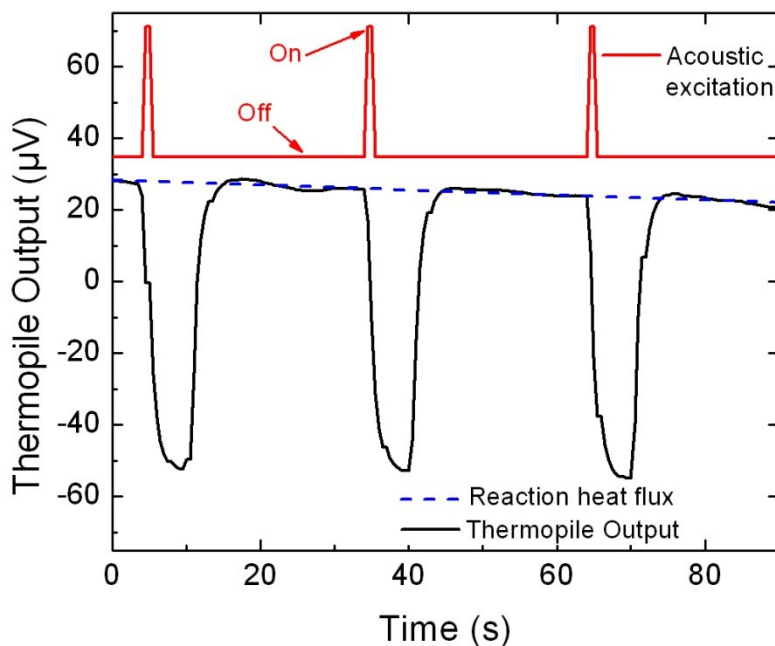


Figure 5.7 Thermopile differential voltage measurements of parasitic heat injected into the fluid resulting from SAW action. Red line: SAW electrical excitation signal; Solid black line: thermopile measurements; Dashed blue lines: slow trend due to heat released by the sucrose dilution reaction.

Note that these results show the *absolute* temperature increase and return to steady-state in both droplets resulting from SAW action. Owing to the differential nature of the design, the importance of this effect in actual thermopile measurements will be reduced. Figure 5.7 shows a high-resolution view of thermopile measurements during a sucrose dilution experiment clearly showing the perturbations from the SAW overlaid on the baseline trend due to the actual heat release from the reaction (hashed line). The perturbation relaxation time is indeed slightly shorter (<10s) than modelling predictions. Note that, since the thermopile junctions atop the glass substrates are in direct contact with the fluid droplets, the limiting factor in the measurement time response was the nanovoltmeter integration time (0.5s), as opposed to heat diffusion times through the substrate.

Based on these results, the optimal excitation protocol for use in the experiments with 30dB SAW power for 1s duration, both with respect to mixing efficiency (maximal use of SAW) and acceptable measurement contamination from parasitic heat injection (minimal use of SAW), was a pulse train with a period equal to twice the worst-case relaxation time

(30s). Only the thermopile measurements made during the second half of the pulse trains were retained for computation.

Sucrose dilution kinetics measurements

Figure 5.8 shows typical thermopile measurements from two sucrose dilution experiments, with and without SAW mixing, as well as a negative control. The experiment with SAW mixing shows higher instantaneous heat flux and a shorter duration. In contrast, the experiment without SAW mixing shows lower instantaneous heat flux and a longer duration. These results indicate that SAW mixing increases the speed of the reaction, as expected. The negative control (identical droplets, no reaction) shows no significant heat flux, also as expected.

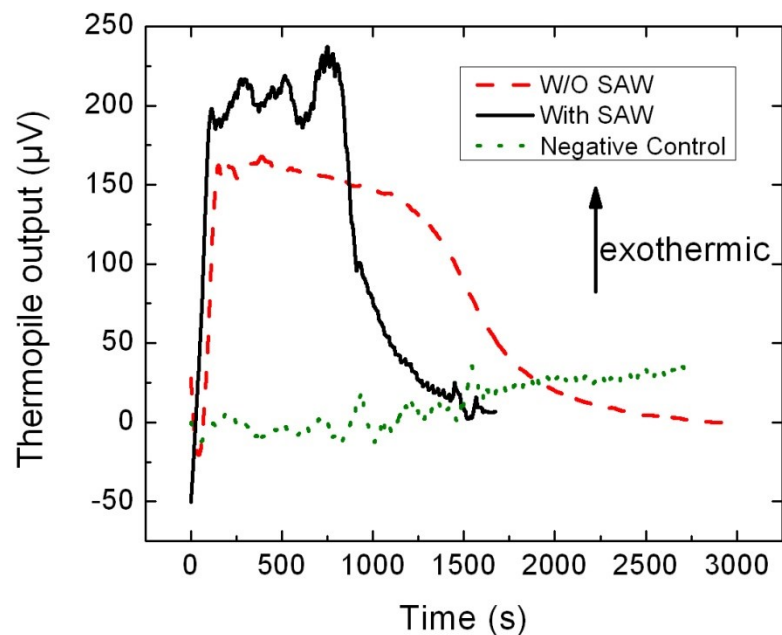


Figure 5.8 Thermopile differential voltage measurements from two sucrose dissolution experiments, with and without SAW mixing, as well as a negative control (identical droplets, no reaction, with SAW)

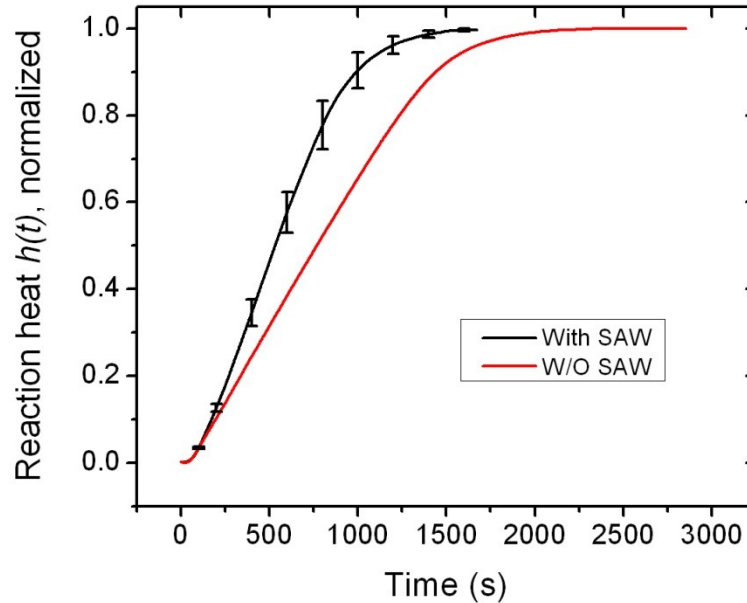


Figure 5.9 Normalised cumulative thermal energy (heat) released by a sucrose dilution as a function of time, with and without SAW mixing. The curves are obtained by integrating measurements as shown in Fig.6.

By integrating the voltage measurements from results as shown in Figure 5.8, the normalized cumulative thermal energy (heat) released by the process in the reaction droplet could be calculated, as per Eq.1. Figure 5.9 shows results from a series of 5 sucrose dilution experiments with SAW mixing, compared to a typical experiment without SAW. The measurement SNR, calculated by taking the ratio between the mean value at the saturation plateau and the *rms* value about the mean at saturation, was $\sim 500:1$ across experiments. Note that results are expressed in normalized units because the proportionality constant between thermopile voltage and heat flux difference is highly dependent the specifics of the instrument configuration, the physical process under study, the nature of the liquid medium, and the geometry of the droplets.

Nevertheless, these normalized results of Figure 5.9 are sufficient in themselves to demonstrate the change in process dynamics due to mixing acoustofluidic in terms of (1) the slope of the initial pseudo-linear section in the data and (2) the time to reach a saturation plateau. The average initial slope for the experiments with SAW mixing is $2\times$ greater than without SAW, indicating that kinetics are twice as fast.

Using the accepted model for calculating the entropy of sucrose dilution in water [146], the total energy released in the reaction droplets during the experiments was estimated to be ~ 50 mJ (the plateaus in Figure 5.9 therefore correspond to this value). Using this value for total energy released, the data in Figure 5.8 can be converted to physically relevant units of heat flux (W), yielding an estimated noise equivalent power (NEP) of $90 \text{ nW/Hz}^{1/2}$ (calculated in the post-reaction plateau sections). This measurement resolution is in the same range as published values for similar thermopile configurations based on thin membranes [139,154].

5.3.5 Conclusion

In this paper we have shown numerical modelling and experimental results for an instrument that combines a microcalorimeter with microfluidic mixing induced by surface acoustic waves (SAW). The instrument was designed to measure the thermal dynamics of a chemical or physical process in a $10 \text{ }\mu\text{l}$ droplet. The differential nature of the design makes the system robust against common mode noise sources, such as evaporation. Parasitic heat injection into the system by the SAW actuation is rejected with an appropriate SAW excitation regime. Even with a greater thermal conduction path from the vessels to the jacket due to the glass substrate, the performance of the device compares favourably with similar systems based on thin membranes. The increased robustness of the device makes it well suited to droplets-based experiments and manual pipetting.

The sucrose model chosen for the validation experiments is useful in evaluating the performance of the instrument for a variety of applications, even in the case of bioanalytical experiments. Indeed, in the study of protein conformation changes reported by Wang *et al.* [20], the thermal energy changes measured by the authors is in the same order of magnitude as that released in our sucrose dilution measurements.

5.3.6 Acknowledgements

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), NanoQuébec, la Région Rhône-Alpes (Accueil-Doc), ANR- 12-BS09-021-02, École Centrale de Lyon, ANR- 08-BLAN-0114-01 and LyonBioPole. The

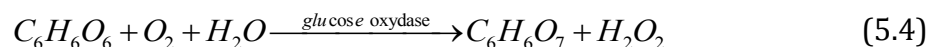
authors would like to thank the Institut interdisciplinaire d'innovation technologique (3IT) (Canada) and Nanolyon (France) for technical support.

5.4 Mesure Biologique

L'article présenté à la section 5.3 fait la démonstration que l'utilisation d'un système de mélange actif accélère les réactions qui sont limitées par la diffusion, ce qui augmente le signal au calorimètre puisque le calorimètre est sensible à la puissance.

L'expérience standard de dilution de sucrose utilisée pour la démonstration dans l'article n'est pas une réaction biologique. Il est intéressant de regarder s'il est possible d'effectuer des mesures biologiques avec le microcalorimètre et le dispositif de mélange. Pour ce faire une série de mesures d'oxydation de glucose à l'aide de l'enzyme de la glucose oxydase comme catalyseur fut réalisée.

La réaction d'oxydation du glucose catalysé par la glucose oxydase est :



avec une enthalpie de réaction de -334.7 kJ/mol ($\Delta H = -80 \text{ kCal}$) [155]. Les expériences furent réalisées avec une solution de glucose de 0.1 M dans un tampon phosphate salin (PBS) avec 50% (volume) de glycérolé afin de limiter l'évaporation. Les gouttes utilisées pour l'expérience ont un volume de $10 \mu\text{L}$ avec une charge en glucose oxydase de 0.4 Unité. 1 Unité de glucose oxydase oxyde $1 \mu\text{mol}$ de glucose en 1 minute à 35°C dans une solution à pH de 5.1 [156]. La température de la gaine calorimétrique est fixée à 25°C et l'atmosphère était saturée en eau. Le choix d'effectuer la réaction à 25°C était pour diminuer l'évaporation ainsi que pour être dans les mêmes conditions expérimentales que dans l'article. Le tableau 5.1 résume les caractéristiques de l'expérience ainsi que l'énergie dégagée.

Tableau 5.1 Résumé de l'énergie dégagée lors de la réaction d'oxydation du glucose

Glucose	Enzyme	Énergie libérée attendue
$1 \mu\text{mol}$ ($10 \mu\text{L}$ à 0.1 M)	0.4 Unité	0.33 Joule

Les gouttes sont pipettées à la main directement sur le microcalorimètre ce qui apporte une erreur de positionnement important, ce qui se reflète sur la reproductibilité des résultats.

La Figure 5.10 montre la mesure de la puissance pour trois expériences d'oxydation du glucose réalisées le même jour.

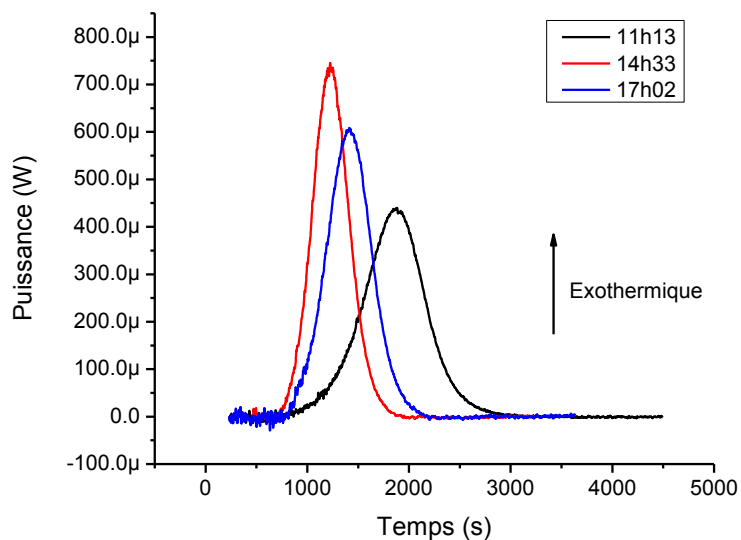


Figure 5.10 Trois répétitions de la mesure de la puissance de la réaction d'oxydation du glucose en utilisant la glucose oxydase comme catalyseur.

En intégrant les puissances mesurées à la Figure 5.10, il est possible d'obtenir l'énergie ainsi que l'allure de la cinétique de la réaction. Le résultat est montré à la Figure 5.11. Sur la figure il est possible de voir que le temps de réaction est très long ce qui pourrait être dû au temps de diffusion. Le rythme maximal de la réaction est de 1 μmol de glucose oxydé en une minute par une unité d'enzyme. Pour la réaction d'intérêt, 0.4 unité d'enzyme fut utilisée pour 1 μmol de glucose. Le temps de réaction pourrait être au mieux de 2min30sec. En regardant la cinétique de l'expérience pour les expériences réalisées à 14h33 et 17h02, le temps de réaction est de plus de 20 minutes. L'expérience ne fut pas réalisée dans les conditions idéales, 25°C dans un pH 7.4 versus 35°C à un pH de 5.1. Cette expérience a permis de valider l'utilisation du calorimètre combiné au système de mélange actif, soit le système calorimétrique en verre sur le système de mélange en LiNbO_3 avec un film d'eau pour l'adaptation d'impédance.

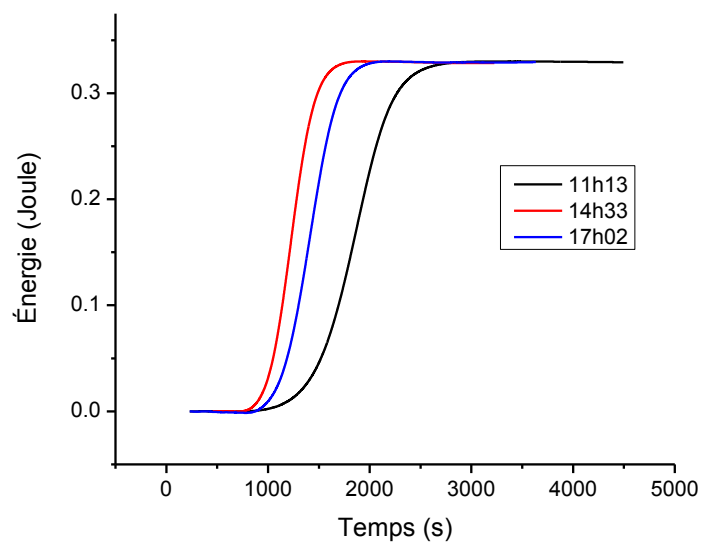


Figure 5.11 Énergie normalisée accumulée due à la réaction d'oxydation du glucose avec de la glucose oxydase. Cette figure est obtenue en intégrant les puissances de la Figure 5.10.

CHAPITRE 6 DISCUSSION ET CONCLUSION

L'objectif de cette thèse tel qu'écrit au Chapitre 1 était :

« L'objet de cette thèse est le développement d'un système de caractérisation des interactions intermoléculaires à l'interface liquide/solide pour l'étude de divers phénomènes moléculaires et biologiques à l'interface. Le système devait être en mesure d'identifier les caractéristiques de cinétique et de thermodynamique en temps réel et sans marquage pour des interactions intermoléculaires tel que l'hybridation de brin d'ADN. »

Il est intéressant de discuter des résultats obtenus et non obtenus par rapport à cet objectif. Une comparaison des caractéristiques finales du dispositif versus celles qui furent présentées dans les tableaux 2.4 à 2.7 du Chapitre 2 va être présentée. Par la suite, une discussion sur les résultats obtenus et ceux qui auraient été intéressants d'obtenir va être faite. Une comparaison entre des dispositifs commerciaux et ceux d'autres groupes de recherche situera le dispositif couplé final. Finalement, un bref paragraphe ouvrira sur les possibilités que peut apporter l'utilisation du capteur ainsi que certaines pistes d'amélioration de celui-ci.

Le dispositif final tel que fabriqué est montré à la Figure 6.1 sous forme de schéma et la Figure 6.2 montre une photo du dispositif réel. Le dispositif fut conçu et fabriqué, ce qui est une réussite. La prochaine section va faire le lien entre les points d'intérêts du cahier des charges et les choix technologiques ou scientifiques qui furent pris.

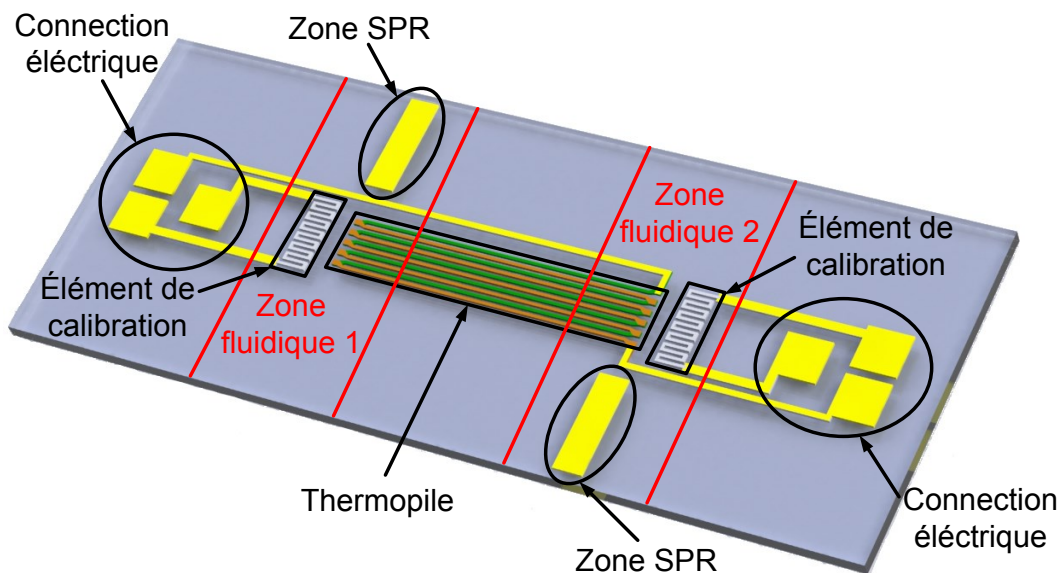


Figure 6.1 Schéma du dispositif final tel que fabriqué. Sur le schéma il est possible de voir les deux zones fluidiques du système différentiel, les zones SPR, la thermopile, les éléments chauffants pour la calibration et les contacts électriques.

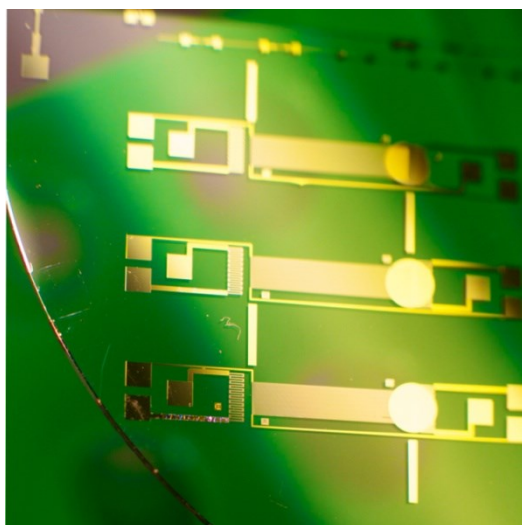


Figure 6.2 Photo du dispositif final, il est possible de voir trois thermopiles sur cette photo.

6.1 Retour sur le cahier de charge du capteur

À la fin du Chapitre 3 il y avait quatre tables 2.4 à 2.7 qui présentait les points importants à prendre en compte pour la conception du système de mesure couplé.

Le tableau 6.1 montre les choix technologiques/scientifiques réalisés pour le microcalorimètre. Dans cette table, les deux choix principaux qui furent réalisés furent l'utilisation d'un substrat de verre et la conception de la thermopile. Le choix de l'utilisation du verre comme substrat n'est pas idéal pour la valeur de la diffusivité thermique. Par contre le choix du verre est très intéressant pour la compatibilité entre la microcalorimétrie et le système SPR ainsi que pour la solidité du système qui permet la fonctionnalisation de celui-ci.

Tableau 6.1 Cahier de charge du microcalorimètre

Cahier de charge	Choix technique/scientifique
Faible conductivité thermique $\downarrow k$	Utilisation du verre comme substrat
Faible chaleur spécifique $\downarrow c$	Limiter à 200 μm l'épaisseur du substrat de verre
Haute diffusivité thermique $\uparrow \alpha$	Limiter à 200 μm l'épaisseur du substrat de verre
Bonne sensibilité du transducteur	Utilisation d'une thermopile de 50 paires de thermocouples de Cr-Ni

Le tableau 6.2 expose les choix qui furent réalisés pour le système SPR. Le système SPR n'a pas été un gros défi de conception, par contre le système SPR impose deux choix technologiques qui ont eu des répercussions sur le système microcalorimétrique, soit : le choix du substrat de verre, et le choix de la surface de réaction sur l'or. Ces deux choix ne sont pas les choix classiques pour un système microcalorimétrique. Par contre avec une faible épaisseur cela n'est pas dramatique pour le système.

Tableau 6.2 Cahier de charge du système SPR

Cahier de charge	Choix technique/scientifique
Surface en métal noble tel que de l'or	Phénomène SPR se produit seulement sur une surface de métal noble
Compatible avec un système de couplage	Utilisation d'un substrat de verre standard
Système suffisamment sensible pour une mesure d'hybridation d'ADN	Utilisation d'un système de modulation par longueur d'onde avec un couplage par prisme

Le système de mélange actif n'avait pas un cahier des charges très important. Le tableau 6.3 résume les deux points du cahier de charge, soit : qu'il faut mélanger et que le mélange ne doit pas nuire au signal. Dans l'article présenté au Chapitre 5, il a été démontré qu'un système de mélange à l'aide d'ondes acoustiques de surface est adapté et utile pour des

mesures de microcalorimétrie. De plus il fut montré par Renaudin et al. [37] que ce type de système était également adapté pour les systèmes SPR.

Par contre ce type de système de mélange injecte du bruit au niveau de la SPR et au niveau de la microcalorimétrie. Pour pouvoir utiliser le système de SAW, il faut utiliser un système d'impulsion suivi de périodes de relaxation. La mesure des interactions se réalise seulement durant la période de relaxation.

Le système de mélange a la capacité de maximiser le taux de signal sur bruit du système calorimétrique. Le système calorimétrique mesure une puissance et comme le système de mélange accélère la réaction, cela se traduit par une plus grande puissance au calorimètre soit un meilleur signal.

Tableau 6.3 Cahier de charge du système de transport de masse

Cahier de charge	Choix technique/scientifique
Avoir un système de mélange	Intégrer un système de mélange SAW
Ne pas diminuer le signal ou injecter du bruit dans la mesure des transductions	Utiliser une méthode avec des périodes d'excitation suivies par des périodes de repos pour assurer la bonne mesure.

Le tableau 6.4 expose les risques qui avaient été identifiés préalablement pour la réalisation du projet. La plupart des risques étaient reliés à la compatibilité et aux différentes interférences que les modalités pouvaient avoir entre elles. Tous les risques ont pu être gérés et il fut possible de vérifier que la solution choisie était valide. Seulement le « *cross-talk* » entre la mesure calorimétrique et la mesure SPR n'a pas pu être vérifié.

Tableau 6.4 Risques associés à la réalisation du système dont il devrait être tenu compte dans la réalisation du projet

Risque	Résultat
--------	----------

Compatibilité du procédé de fabrication entre les deux modalités	Tester au Chapitre 4, le procédé de fabrication et les matériaux sont compatibles.
Interférence entre les mesures (« cross-talk »)	Na pas pu être testé
Possibilité de fonctionnalisation des deux transducteurs de manière identique	L'utilisation d'une fonctionnalisation à base de BSA permet une fonctionnalisation relativement uniforme plus différentes surfaces.
Utilisation de matériaux non adaptés pour les deux techniques	Testés au Chapitre 4, les matériaux sont compatibles.
Interférence avec le système de mélange	Tel que vu au Chapitre 5, l'utilisation du système de mélange peut interférer avec les systèmes de mesure. Pour contrer ce problème l'utilisation d'une méthode de mélange par impulsion fut utilisée

6.2 Comparaison du dispositif microcalorimétrique versus d'autres systèmes semblables

La conception et la fabrication du microcalorimètre ont demandé une certaine quantité de travail. Il est intéressant de regarder les performances du microcalorimètre conçu versus ceux d'autres groupes universitaires d'importance[20,59,60] qui ont conçu des microcalorimètres du même type pour des mesures en milieux liquides. Un système commercial de la compagnie Xensor[67] fut également choisi pour positionner le système par rapport à ce qui se fait commercialement.

Il est intéressant de constater que tous les systèmes, autant ceux académiques qu'industriels utilisent des membranes pour assurer la bonne performance de leur dispositif. En contrepartie ces systèmes peuvent être seulement utilisés pour des réactions de volume ce qui diminue la sensibilité des systèmes comparativement à celui réalisé pour la thèse. Le système conçu pour cette thèse possède donc une sensibilité du même ordre de grandeur que ses concurrents tout en étant beaucoup plus solide et en étant intégrable avec des technologies de transduction optiques. Le système de Lubber et al. [60] est le seul qui prétend avoir une sensibilité supérieure, par contre c'est pour un volume de 2 nL. En rapportant cette sensibilité pour un volume de 2 μ L, celle-ci tombe à une valeur semblable aux autres systèmes.

Un autre point intéressant à observer est le choix du mode de mesure. Malgré que tous les microcalorimètres utilisent une thermopile comme transducteur, seulement le groupe de Wang [20,59] utilise une chambre de référence pour effectuer une mesure différentielle.

Tableau 6.5 Comparaison des caractéristiques du système calorimétrique avec les groupes académiques [20,59,60] et d'un dispositif commercial[67]

Groupe		Sensibilité (V/W)	Transducteur utilisé	Géométrie	Volume de la chambre fluïdique	Mode
Dispositif conçu		2.58 ²⁴	Thermopile Cr-Ni	Plan sur substrat de 200 µm	2.5 µL	Différentielle avec une référence
Wang et al.	2008 [59]	1.2	Thermopile Cr-Ni	Membrane de 5 µm de SU-8	0.8 µL	Différentielle avec une référence
	2012 [20]	4	Thermopile Bi/Sb	Membrane de 50 µm de polyimide	1 µL	Différentielle avec une référence
Lubbe r et al. [60]	2.5 nl	60	Thermopile Bi/Sb	Membrane de 1.5 µm de nitrure	2.5 nL	Non différentiel
	2.5 µL	3.6 ²⁵			2.5 µL	Non différentiel
Xensor (commercial, (XEN-LCM2506) [67])		4	Thermopile Si-Al	Membrane de 4 à 8 µm de silicium	Inconnu	Non différentiel

²⁴ Sensibilité pour une réaction de surface

²⁵ Calculé selon le modèle de l'article [60]

6.3 Retour sur les résultats obtenus, les résultats attendus et contributions à l'avancement

Les résultats présentés dans le Chapitre 3 et dans les deux articles des chapitres 4 et 5 montrent la conception du dispositif, la fabrication de celui-ci, les tests de fonctionnalisation du biorécepteur et l'apport d'un système de mélange sur la mesure calorimétrique. Il est intéressant de comparer ces résultats avec les objectifs prévus à la base.

6.3.1 Résultats obtenus versus les résultats attendus

Ces résultats sont encourageants pour la réussite de la mesure d'hybridation ADN avec un microcalorimètre couplé à un système SPR. Par contre, la mesure couplée microcalorimétrie et SPR de l'hybridation de l'ADN n'a pas pu être réalisée au cours de la thèse. Le dispositif tel que conçu est un bon pas dans cette direction et pourra être la base afin de réaliser la mesure couplée.

Le Chapitre 3 montre toutes les étapes de la conception du dispositif couplé ainsi que les performances attendues de celui-ci. La conclusion de ce chapitre a permis de déterminer comment le dispositif devait être fabriqué, avec quels matériaux et avec quels types d'éléments de détection.

Le Chapitre 4 montre un article publié qui démontre la méthode de fabrication du dispositif avec les 75 étapes de fabrication. Ce procédé de fabrication fut pensé afin de permettre l'intégration des deux modalités de détection, ainsi que la possibilité de fonctionnaliser les deux sites de transductions de manière identique. À la fin de l'article, une mesure SPR de la formation du biorécepteur sur le dispositif est montrée, ce qui démontre la possibilité de fonctionnaliser le dispositif.

Le Chapitre 5 montre une mesure d'une réaction de sucrose sur des microcalorimètres avec et sans l'utilisation du système à mélange actif basé sur des technologies de SAW. Le Chapitre 5 permet de démontrer que l'utilisation d'un tel système permet d'augmenter le signal du système microcalorimétrique ainsi que d'accélérer une réaction limitée par la diffusion, ce qui devrait permettre de maximiser le transport de masse vers l'interface.

6.3.2 Contribution à l'avancement

Le développement des prochaines générations de systèmes de biodétection va demander l'intégration de technologies venant de différents domaines. Cette thèse fut un projet très multidisciplinaire et un projet dont la conception du système fut pensée de manière à intégrer au début de la conception les différentes notions des différents domaines.

Cette thèse a permis de démontrer la faisabilité d'un système de détection de l'hybridation de l'ADN à l'interface liquide/solide à bimodalité, soit une modalité de détection par SPR et une modalité de détection par microcalorimétrie. Des verrous technologiques sur la méthode de fabrication, sur la compatibilité des différents systèmes ont été montrés dans cette thèse. L'utilité d'un système de mélange actif pour des mesures de microcalorimétrie intégrée, ainsi qu'une méthode pour arriver à effectuer un mélange sans bruite le signal, mais en amplifiant celui-ci a été démontrée et réalisée.

Les différents travaux et avancées présentés dans cette thèse ont mené à la publication de deux articles scientifiques dans des journaux à comité de lecture, à une présentation orale à la conférence internationale Biosensor et à la présentation d'une affiche à la conférence internationale MicroTAS.

6.4 Possibilités d'applications et améliorations possibles du dispositif

Les connaissances multidisciplinaires acquises entre le Laboratoire de Biophotonique de l'Université de Sherbrooke et l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies de l'INL²⁶ positionnent le système de mesure développé au cours de cette thèse pour être en mesure d'être utilisé afin de développer des futures méthodes de fonctionnalisation à l'interface ainsi que pour les études des interactions biologiques à l'interface liquide/solide.

Le système pourra être utilisé pour effectuer la mesure d'hybridation d'ADN à l'interface puisque tout ce qui manque est la finalisation de la cellule fluide et la réalisation de la mesure telle que décrite au chapitre de conception. Puisque ce système est conçu pour mesurer les interactions biologique à l'interface, il serait intéressant de tester ce système

²⁶ Institut des nanotechnologies de Lyon

avec d'autres modèles biologiques tels que puce à sucre ou encore certains récepteurs cellulaires.

ANNEXE A DÉMONSTRATION

A.1 Démonstration de l'équation du flux thermique, équation (2.2)

Considérant l'équation de chaleur :

$$k\Delta T + \frac{dq}{dt} = \rho c \frac{dT}{dt} \quad (\text{A.1})$$

où k est la conductivité thermique exprimée en $\text{W}/\text{m}^{-1}\text{K}^{-1}$, ΔT est le Laplacien de la température en Kelvin, dq/dt est la puissance thermique produite par unité de volume exprimée en W/m^3 , ρ est la masse volumique du matériau en kg/m^3 et c est la chaleur spécifique du matériau en $\text{J}/\text{kg}\cdot\text{K}$ [45]. Il est possible d'en déduire l'équation du flux entre deux milieux en régime permanent ($dT/dt = 0$). Considérons un système unidimensionnel spatialement comme représenté à la Figure a.1.

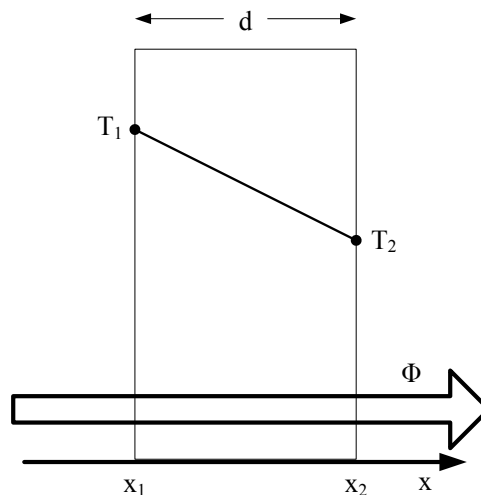


Figure A.1 Représentation du flux de chaleur dû à la conduction

Puisque T_1 et T_2 sont constants dans le temps, que le système n'a qu'une dimension spatiale et que la puissance produite entre les points x_1 et x_2 est nulle, il est possible de réduire d'équation (A.1) à :

$$k \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} = 0 \quad (\text{A.2})$$

Dans ce cas particulier, T est obligatoirement de forme $T = ax + b$ puisque la conduction entre x_1 et x_2 est considérée constante. En fixant les conditions limites suivantes :

$$T(0) = T_1 \text{ et } T(d) = T_2 \quad (\text{A.3})$$

Il est possible de déterminer que :

$$b = T_1 \text{ et } a = \frac{T_2 - T_1}{d} \quad (\text{A.4})$$

la température pour une position x va être :

$$T(x) = \frac{T_2 - T_1}{d}(x - x_1) + T_1 \quad (\text{A.5})$$

La densité de flux thermique surfacique étant définie par :

$$\varphi = -k \frac{dT}{dx} = \frac{k}{d}(T_1 - T_2) \quad (\text{A.6})$$

où φ est exprimé en Watt par unité de surface. Pour une surface définie, le flux va donc être définie par :

$$\Phi = \frac{kA}{d}(T_1 - T_2) \quad (\text{A.7})$$

où ϕ est exprimé en Watt.

A.2 Démonstration de l'équation (2.4)

Considérant l'équation de chaleur :

$$k\Delta T + \frac{dq}{dt} = \rho c \frac{dT}{dt} \quad (\text{A.8})$$

où k est la conductivité thermique exprimée en $\text{W/m}^{-1}\text{K}^{-1}$, ΔT est le Laplacien de la température en Kelvin, dq/dt est la puissance thermique produite par unité de volume exprimée en W/m^3 , ρ est la masse volumique du matériau en kg/m^3 et c est la chaleur spécifique du matériau en $\text{J/kg}\cdot\text{K}$ [45]. Dans le cas où il y a flux thermique $\Delta T \neq 0$, que le système est en régime permanent $dT/dt = 0$ et qu'il y a production de chaleur $P \neq 0$. L'équation de conduction de Fourier peut être réduite à:

$$\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{1}{k} \frac{dq}{dt} = 0 \quad (\text{A.9})$$

En régime permanent la solution va être de la forme suivante :

$$T = -\frac{1}{2k} \frac{dq}{dt} x^2 + C_1 x + C_2 \quad (\text{A.10})$$

Pour un système unidimensionnel tel que montré à la Figure a.2 les constantes C_1 et C_2 vont être définies par :

$$C_1 = \frac{T_L - T_{-L}}{2L} \text{ et } C_2 = \frac{1}{2k} \frac{dq}{dt} L^2 + \frac{T_{-L} + T_L}{2} \quad (\text{A.11})$$

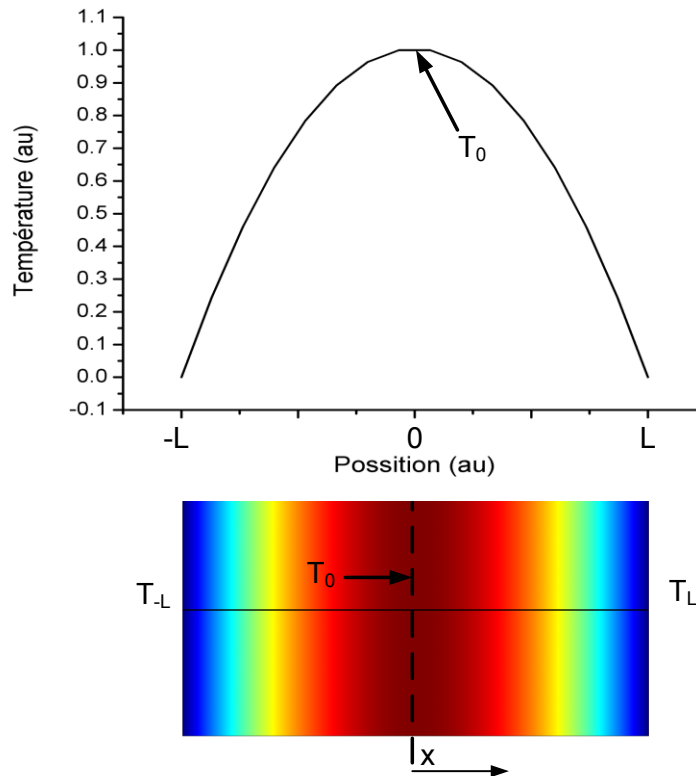


Figure A.2 Profil de température pour un système unidimensionnel lorsque le système émet une puissance thermique

Pour le cas d'intérêt tel que montré à la Figure a.2, les températures T_{-L} et T_L vont être égales puisque que le système est symétrique aux conditions limites. En posant $T_{-L} = T_L$ dans l'équation (A.10) cette dernière devient:

$$T(x) = \frac{1}{2k} \frac{dq}{dt} (L^2 - x^2) + T_L \quad (\text{A.12})$$

Pour le cas général avec la puissance mise en évidence et considérant $T_L = 0$ l'équation peut s'écrire comme suit:

$$\frac{dq}{dt} = \frac{2kT(x)}{(L^2 - x^2)} \quad (\text{A.13})$$

A.3 Démonstration de l'équation (2.5)

Considérons l'équation de chaleur :

$$k\Delta T + \frac{dq}{dt} = \rho c \frac{dT}{dt} \quad (\text{A.14})$$

qui peut également être représenté sous la forme suivante :

$$\frac{dq}{dt} = \frac{dT}{dt} - \alpha\Delta T \quad (\text{A.15})$$

où k est la conductivité thermique exprimée en $\text{W/m}^{-1}\text{K}^{-1}$, ΔT est le Laplacien de la température en Kelvin, dq/dt est la puissance thermique produite par unité de volume exprimée en W/m^3 , ρ est la masse volumique du matériau en kg/m^3 et c est la chaleur spécifique du matériau en $\text{J/kg}\cdot\text{K}$, α est la diffusivité thermique en m^2/s [45]. En supposant un domaine unidimensionnel à une température initial T_0 qui est les conditions limites aux bornes $x(-L)$ et $x(L)$. Au temps $t(0)$ on applique un dégagement d'énergie thermique de puissance dq/dt . La température aux bornes $x(-L)$ et $x(L)$ sera considérée constante $T(x,t)$ vérifie donc:

$$T(-L,t) = T(L,t) = T_0$$

et

$$T(x,0) = T_0 \text{ pour tout } x$$

Considérons la fonction suivante :

$$G = T - \frac{1}{2\alpha} \frac{dq}{dt} (L^2 - x^2) \quad (\text{A.16})$$

tel que cette fonction vérifie aux conditions de l'équation (A.16) définie plus haut tel que :

$$\frac{dG}{dt} - \alpha\Delta G = 0$$

$$G(-L,t) = G(L,t) = 0$$

$$G(x,0) = -\frac{1}{2\alpha} \frac{dq}{dt} (L^2 - x^2)$$

La fonction G peut être résolue en étant développée en série de Fourier de forme:

$$G = \sum_{n=1}^{\infty} b_n \sin\left(\frac{n\pi x}{2L}\right) e^{-\frac{n^2\pi^2\alpha t}{4L^2}}$$

Puisque la fonction G est symétrique tel que montrée à la Figure a.3, alors $G(x) = G(-x)$. Ce qui permet d'affirmer que les coefficients b_n pair sont nuls de sorte que :

$$G = \sum_{n=1}^{\infty} b_{2n+1} \sin\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right) e^{-\frac{(2n+1)^2 \pi^2 \alpha t}{4L^2}}$$

Pour $t = 0$:

$$G(x, 0) = -\frac{1}{2\alpha} \frac{dq}{dt} (L^2 - x^2)$$

et

$$e^{-\frac{(2n+1)^2 \pi^2 \alpha t}{4L^2}} = 1$$

ce qui permet de conclure que :

$$-\frac{1}{2\alpha} \frac{dq}{dt} (L^2 - x^2) = \sum_{n=1}^{\infty} b_{2n+1} \sin\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right)$$

Il est possible de trouver les coefficients b_{2n+1} , qui sont :

$$b_{2n+1} = -\frac{8L^2}{(2n+1)^3 \pi^3 \alpha}$$

Il est possible d'en déduire la valeur de $T(x, t)$ par :

$$T(x, t) = \frac{1}{2\alpha} \frac{dq}{dt} (L^2 - x^2) - \frac{8L^2}{\pi^3 \alpha} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^3} \sin\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right) e^{-\frac{(2n+1)^2 \pi^2 \alpha t}{4L^2}} \quad (\text{A.17})$$

Pour $t = \infty$ la température du système va tendre vers la même solution qu'en régime permanent tel que montré à l'équation (A.12). Finalement l'équation (A.17) peut être réécrit comme suit :

$$T(x, t) = T(x, \infty) - H(x) e^{-\frac{C^* \alpha t}{L^2}} \quad (\text{A.18})$$

où

$$H(x) = \frac{8L^2}{\pi^3 \alpha} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^3} \sin\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right)$$

La Figure a.3 montre différents profils de température à différents moments correspondant au cas de la Figure a.1 lorsque le système est initialement au repos et que

celui-ci est soumis à une puissance uniforme. Les conditions limites à $-L$ et L sont fixées à $T = T_0$. La constante de temps d'un tel système, soit le temps avant que la production de chaleur dans le milieu soit en équilibre avec la température extérieure, est dictée par les caractéristiques physiques du système. Cette constante de temps correspond à $L^2/\alpha = \rho c L^2/k$, si on ne peut pas changer la géométrie du système, pour qu'un système arrive rapidement en régime permanent il faut que les caractéristiques physiques du système soient une conductivité thermique la plus élevée possible ($k \uparrow$), la masse volumique et la capacité thermique doivent être les plus faibles possibles ($\rho \downarrow$ et $c \downarrow$).

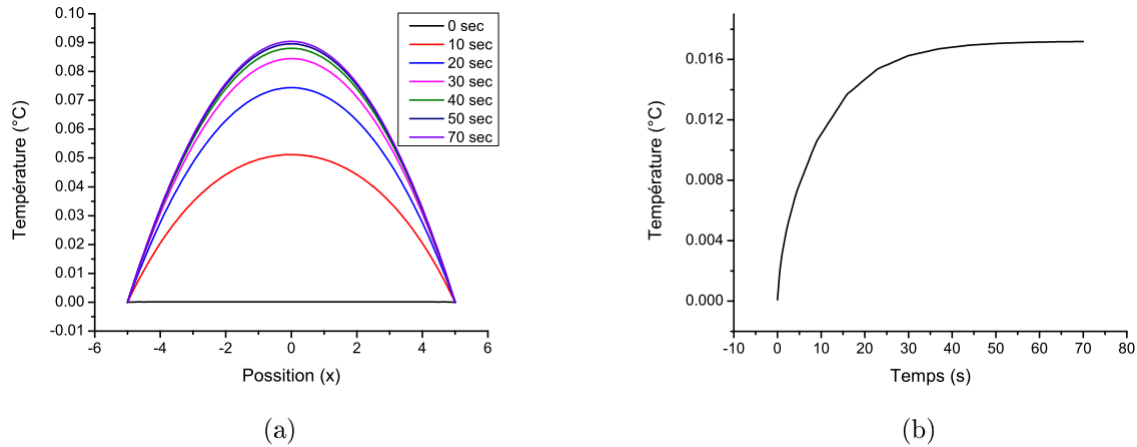


Figure A.3 Profil de température à différents moments lorsqu'un domaine unidimensionnel est initialement au repos (a), Augmentation de la température pour une position en fonction du temps (b)

ANNEXE B RADIATION

La radiation thermique est une radiation électromagnétique due à la température d'un milieu, ce transfert de chaleur est possible même sans la présence de matière. La puissance de l'onde électromagnétique est directement reliée à la température par l'équation de Stefan-Boltzmann :

$$P = \varepsilon A \sigma T^4 \quad (\text{B.1})$$

où σ est la constante de Stefan-Boltzmann ($\sigma = 5.6703 \times 10^{-8} \text{ W/m}^2 \text{ K}^4$), A est l'aire du corps, ε est l'émissivité du corps et T est la température. La loi de Stefan-Boltzmann est directement reliée à la loi de thermodynamique de Bose-Einstein²⁷. En étudiant cette relation, il est possible de définir la densité spectrale d'énergie de radiation. Soit :

$$E(\lambda, T) = \frac{8\pi hc}{\lambda^5 (e^{hc/\lambda kT} - 1)} \quad (\text{B.2})$$

où h est la constante de Planck, k est la constante de Boltzmann, λ est la longueur d'onde et c est la vitesse de la lumière. En unité internationale, l'équation (B.2) est en $\text{J/m}^2 \cdot \mu\text{m}$.

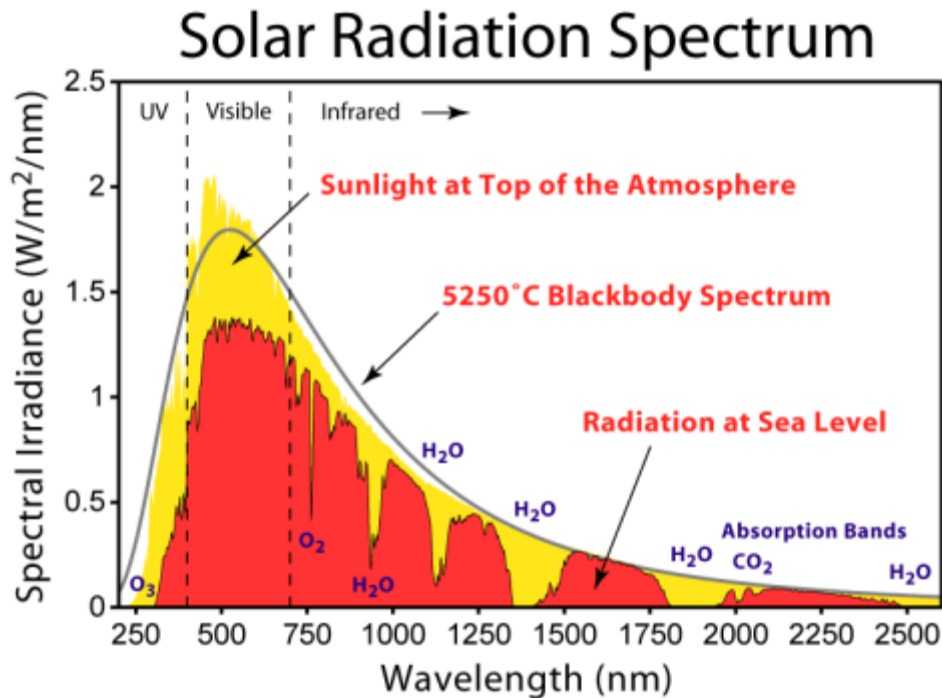


Figure B.1 Spectre de l'émission du soleil en fonction de la température. La figure est sous licence GNU FDL

²⁷ La loi de Bose-Einstein relie la distribution de la population des Bosons et la température d'un corps.

Le phénomène de radiation va souvent être relié au phénomène de corps noir. Par ailleurs, un exemple de ce type de transfert de chaleur est le soleil. La chaleur qui provient du soleil est transmise à l'aide d'un rayonnement électromagnétique et l'énergie de ce rayonnement est directement reliée à sa température [45]. La Figure b.1 montre le spectre d'émission de la radiation du soleil en fonction de sa température.

B.1 Radiation d'une surface vers l'ambient

La radiation d'une surface vers l'environnement ambient est décrite par l'équation Stefan-Boltzmann (B.1) avec deux hypothèses, soit :

- La température du domaine ambient à la surface d'intérêt à une température constante (T_{amb}).
- Le domaine ambient est considéré comme un corps noir, l'émissivité et l'absorption est égale à 1, la réflexion est considérée à 0.

La puissance de radiation va être

$$P = \varepsilon A \sigma (T_{amb}^4 - T_{surface}^4) \quad (2.3)$$

Où T_{amb} est la température ambiante et $T_{surface}$ est la température de la surface. Puisque la puissance de radiation est proportionnelle à la différence à la 4 des températures, si cette différence est faible tel que pour des réactions en microcalorimétrie, celle-ci peut être négligée par rapport à la conduction et la convection.

ANNEXE C EFFET THERMOÉLECTRIQUE ET TRANSDUCTEUR DE TEMPÉRATURE

C.1 Effet thermoélectrique

Dans cette section, il sera question des trois différents effets thermoélectriques. Il est important de bien comprendre leurs effets, car c'est habituellement leurs applications qui permettent la mise en oeuvre de transducteurs pour mesurer la température dans les systèmes de calorimétrie Wang et al., 2008b, van Herwaarden, 2005, Hagleitner et al., 2001, Efremov et al., 2003. Il est possible de définir un effet thermoélectrique comme un effet présent dans certains matériaux qui lie un flux de chaleur à un courant ou à une tension électrique. Il existe trois effets thermodynamiques, l'effet Seebeck, l'effet Peltier et l'effet Thomson. Lors de l'application de ces effets, il y a habituellement deux types de bruits dont il faut tenir compte, soit le bruit Joule et le bruit Johnson.

C.1.1 Effect Seebeck

L'effet Seebeck relie la différence de tension (V) entre deux conceptions (A et B) de natures différentes, reliées entre eux par deux jonctions (J_1 et J_2) qui possèdent une différence de température.

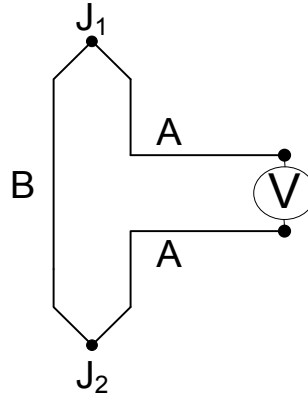


Figure C.1 Représentation du principe de l'effet Seebeck

$$U(T) = \int_{T_{J_1}}^{T_{J_2}} (S_B(T) - S_A(T)) dT \quad (\text{C.1})$$

$S_B(T)$ est le coefficient de Seebeck en fonction de la température du matériau B, $S_A(T)$ est le coefficient de Seebeck en fonction de la température du matériau A et $U(T)$ est la tension associée à la différence de température pour les conducteurs A et B. Il est donc possible d'en déduire l'équation suivante :

$$S(T) = \frac{dU}{dT} \quad (C.2)$$

Le coefficient de Seebeck est en Volt par Kelvin. La Figure c.1 représente un montage d'un thermocouple. L'effet Seebeck s'explique grâce au potentiel d'oxydoréduction des deux matériaux. Pour mieux comprendre, regardons l'exemple d'une pile électrochimique, soit une pile constituée de deux métaux plongés dans des électrolytes tels que montrés à la Figure c.2.

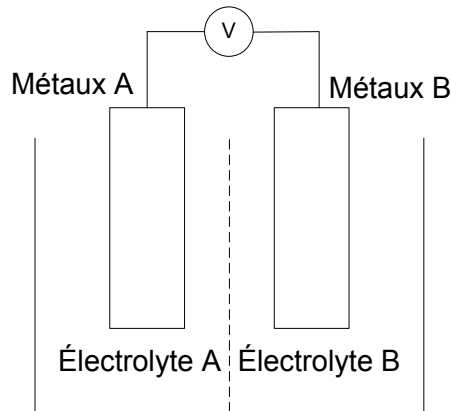


Figure C.2 Diagramme d'une pile

Une telle pile va avoir des potentiels différents pour ses deux métaux puisque ceux-ci ne sont pas directement en contact et qu'ils sont plongés dans des électrolytes qui leur permettent de garder une charge constante, car celles-ci servent de réservoir à électrons. La Figure c.3 montre le niveau du potentiel électrochimique de la pile à une température donnée.

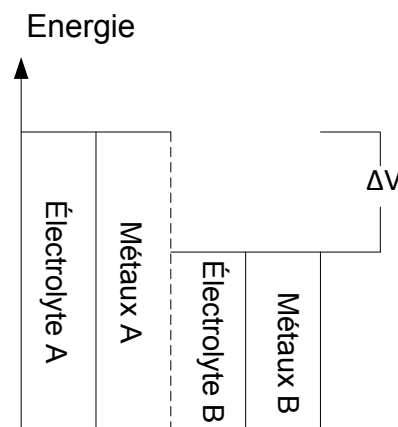


Figure C.3 Schéma du potentiel des paires métaux/électrolyte d'une pile

La différence de potentiel de la pile vient de la différence de potentiels électrochimiques des différents métaux. Cette différence de potentiels est possible puisque les deux métaux ne sont pas directement en contact, lorsqu'il y a transfert d'électrons des métaux avec le

plus haut potentiel vers celui avec le plus bas, les électrolytes permettant soit de donner ou soit recevoir un électron pour garder le potentiel stable. Si les deux métaux étaient directement en contact un avec l'autre, il en résulterait un alignement des potentiels tel que montré à la Figure c.4 (A). Puisque ce potentiel est directement relié à la température, si deux jonctions sont faites avec deux métaux et que ces deux jonctions sont à deux températures différentes et que la boucle de courant n'est pas fermée telle que montrée à la Figure c.1, il en résultera une différence de potentiels puisque les électrons des deux jonctions ne vont pas avoir la même énergie.

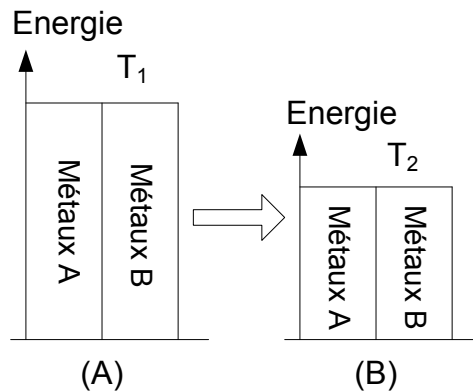


Figure C.4 Représentation des potentiels électrochimiques de deux métaux pour deux températures

Les métaux ont des coefficients de Seebeck différents qui varient en fonction de la température. Habituellement dans la littérature, les coefficients de Seebeck sont référencés par rapport au Platine. À titre indicatif voici les coefficients de Seebeck de l'or [115] du nickel [116] et du chrome [117] sont montrés à la Figure c.5.

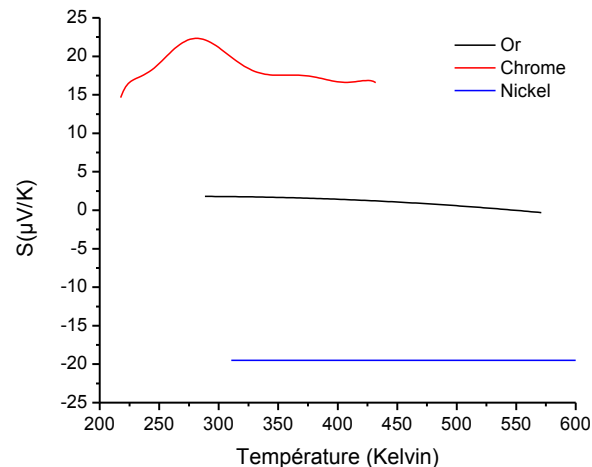


Figure C.5 Coefficient de Seebeck de différents métaux

Il n'y a pas que les métaux qui possèdent des coefficients de Seebeck, les semi-conducteurs également. Avec les semi-conducteurs, il est possible d'avoir des coefficients de Seebeck

très élevés, tels que $-240 \mu\text{V/K}$ pour le polysilicium [64] et plus de $1000 \mu\text{V/K}$ pour le silicium dopé [118]. Pour la fabrication de biocapteur, l'utilisation de silicium ou autre semi-conducteur est complexe dû aux contraintes de fabrication.

C.1.2 Effet Peltier

L'effet Peltier se produit lorsqu'un courant électrique passe à travers de deux métaux formant une jonction. Tout dépendant de la direction du courant, les électrons avec un niveau d'énergie élevé vont partir vers l'autre jonction pour être remplacés par des électrons de faible énergie. Cela va créer un transfert de chaleurs entre les deux jonctions. L'effet Peltier est caractérisé par le coefficient de Peltier (Π) qui s'exprime en Joule par ampère. Ce coefficient permet de définir le transfert de chaleur comme suit :

$$Q = \Pi_{ab} I = (\Pi_a - \Pi_b) I \quad (\text{C.3})$$

où Π_x est le coefficient de Peltier pour la jonction x , I est le courant en ampère et Q est la chaleur en joule.

C.1.3 Effet Thomson

L'effet Thomson décrit la relation qu'il y a entre le transfert de chaleur (gradient de température) et le courant dans un conducteur. C'est l'étude de cet effet par Kelvin William Thomson en 1851 qui a permis de décrire le lien qu'il y a entre l'effet Peltier et l'effet Seebeck. L'effet Thomson est décrit par :

$$\frac{dq}{dx} = \rho J^2 - \mu J \frac{dT}{dx} \quad (\text{C.4})$$

où ρ et la résistivité du conducteur, J est la densité de courant et μ est le coefficient de Thomson. Le terme ρJ^2 représente l'effet Joule. Il est possible de relier les trois effets thermoélectriques par les équations de Kelvin :

$$\Pi = ST \quad (\text{C.5})$$

et

$$\mu = T \frac{dS}{dT} \quad (\text{C.6})$$

C.1.4 L'effet Joule

L'effet Joule se produit lorsqu'un courant électrique traverse un conducteur. Suite au passage de ce courant, l'énergie électrique va se transformer en énergie thermique, soit :

$$q_{thermique} = q_{électrique} = R \int_{t_1}^{t_2} i(t)^2 dt \quad (\text{C.7})$$

Où q est l'énergie thermique ou électrique, R est la résistance du conducteur et $i(t)$ est la fonction du courant en fonction du temps. En divisant l'énergie par le laps de temps $t_2 - t_1$ il est possible d'en déduire la puissance moyenne durant ce laps de temps. L'équation (C.7) devient :

$$P_{thermique} = P_{electrique} = \frac{R}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} i(t)^2 dt \quad (C.8)$$

En observant l'équation (C.8) il devient évident qu'une petite augmentation du courant dans une conduction va apporter une grande augmentation de la puissance thermique. Ce principe se voit au quotidien par l'utilisation d'un élément chauffant.

C.1.5 Bruit Johnson

Le bruit Johnson relie le bruit électrique d'un conducteur dû à la température absolue de celui-ci. Ce bruit est dû à l'agitation des électrons dans un conducteur ce qui provoque le déplacement d'électron et de courant. Ce bruit est un bruit blanc, c'est-à-dire qu'il s'étant sur toute la bande de fréquence. Il est possible de le caractériser par :

$$U_{rms} = \sqrt{4kTBR} \quad (C.9)$$

où U_{rms} est la tension rms du bruit Johnson, k est la constante de Boltzmann, T est la température, B est la bande passante et R est l'impédance du système.

C.2 Transducteur de température

Pour effectuer la mesure de température, quatre types de transducteurs sont régulièrement utilisés, soit; les thermocouples, les résistances thermomètres (RTD), les thermistances et les diodes. Chacun de ces transducteurs ont leurs avantages et leurs inconvénients.

Tableau C.1 Récapitulatif des différents transducteurs de températures

Type	Mode	Excitation	Mesure	Précision ²⁸	Gamme
Thermocouple	Passif	N/A	Tension	1°C	Élevée

²⁸ À titre indicatif puisque la précision dépend fortement du milieu de mesure et de l'appareil de mesure

Résistance Thermomètre (RTD)	Actif	Courant	Impédance	0.01°C	Moyenn e
Thermistance	Actif	Courant	Impédance	0.005°C	Faible
Diode	Actif	Courant	Courant	4°C	Élevée

C.2.1 Thermocouples

Un thermocouple est un outil qui permet de mesurer des différences de température. Il est constitué de deux jonctions de deux matériaux et il fonctionne en utilisant l'effet Seebeck. Ce type de transducteur est simple et peut fonctionner dans une grande gamme de température. Lorsqu'il est utilisé pour effectuer une mesure de température absolue, la deuxième jonction doit être maintenue à une température de référence telle que montrée sur la Figure c.6. Sur cette figure, la mesure de température s'effectue au niveau de la jonction J_1 et la jonction J_2 est maintenue à une température constante et connue, ce qui permet de connaître la température absolue.

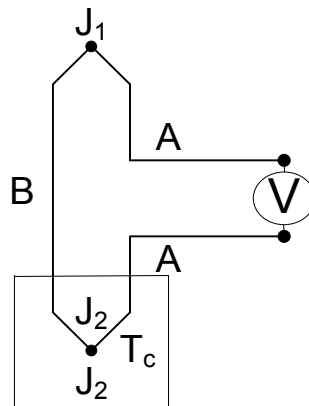


Figure C.6 Représentation d'un thermocouple

Dans l'industrie, il existe certains types de thermocouples qui sont standardisés. La plupart utilisent un développement en série de polynômes de l'équation (C.10) pour mesurer la température puisque les coefficients de Seebeck ne sont jamais linéaires.

$$\Delta T = \sum_{n=0}^N a_n U^n \quad (C.10)$$

Normalement les coefficients a_n (en K/V soit l'inverse du coefficient de Seebeck) sont définis jusqu'au 8^e ordre. Le tableau c.2 montre une liste des différents types de thermocouple disponible sur le marché ainsi que leurs caractéristiques principales.

Tableau C.2 Représentation des différents thermocouples disponible sur le marché²⁹

Type	Plage de température	Tolérance classe un (°C)	Tolérance classe deux (°C)
K	-800 - 1300 °C	±4 °C à 1000 °C	±7.5 °C à 1000 °C
J	-180 – 800 °C	±4 °C à 1000 °C	±7.5 °C à 1000 °C
N	-270 - 1300 °C	±4 °C à 1000 °C	±7.5 °C à 1000 °C
R	-50 – 1700 °C	±1 °C à 1000 °C	±2.5 °C à 1000 °C
S	-50 – 1750 °C	±1 °C à 1000 °C	±2.5 °C à 1000 °C
B	0 – 1820 °C	N/A	±2.5 °C à 1000 °C
T	-250 – 400 °C	±1 °C à 400 °C	±4 °C à 400 °C
E	-40 – 900 °C	±3.6 °C à 900 °C	±6.8 °C à 900 °C

Le principal bruit associé au thermocouple est le bruit Johnson. L'effet Joule n'est que très peu présent puisque l'utilisation des thermocouples se fait à l'intérieur d'un circuit à très haute impédance. Pour ce qui est du bruit Johnson, il est facilement contrôlable pour la plupart des systèmes puisqu'il ne suffit que de filtrer le signal lu à la fréquence la plus faible possible pour enlever la majeure partie du bruit Johnson.

Un des défauts majeurs des thermocouples est qu'ils ne sont pas très sensibles. Les meilleurs thermocouples faits de métaux ont des coefficients de Seebeck de l'ordre de $40 \mu\text{V}/\text{K}$. Pour augmenter leurs sensibilités, il est possible d'utiliser un montage dit de thermopile.

Thermopile :

Un montage en thermopile est constitué de plusieurs thermocouples qui sont disposés en série. Cela permet, sans trop augmenter le bruit, d'augmenter le coefficient de Seebeck du système d'un facteur équivalent au nombre de thermocouples utilisés. La Figure c.7 montre le concept de la thermopile. Par exemple un thermocouple constitué d'une paire (une paire équivaut à un thermocouple) or/nickel va avoir un coefficient d'environ $20 \mu\text{V}/\text{K} = S_{\text{or}} - S_{\text{nickel}} = 2 - (-18)$, si 50 paires sont utilisées, alors le coefficient va être de l'ordre de $20 \mu\text{V}/\text{K} * 50 = 1000 \mu\text{V}/\text{K}$.

²⁹ Information provenant de la « National Institute of Standards and Technology »

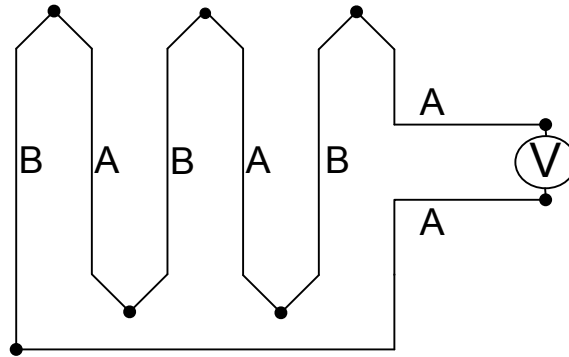


Figure C.7 Schéma d'une thermopile constituée de trois paires ou trois thermocouples

C.2.2 Résistance détectrice de température (RTD)

La résistance thermique est habituellement faite d'un métal, habituellement le platine et exploite la caractéristique de certain métal du changement linéaire de résistivité en fonction de la température. La mesure de température s'effectue en faisant circuler un courant dans la RTD. La tension mesurée aux bornes de la RTD sera directement proportionnelle à l'impédance et va permettre d'en déduire la température. La Figure c.8 présente deux types de circuits régulièrement utilisés pour mesurer l'impédance d'un RTD.

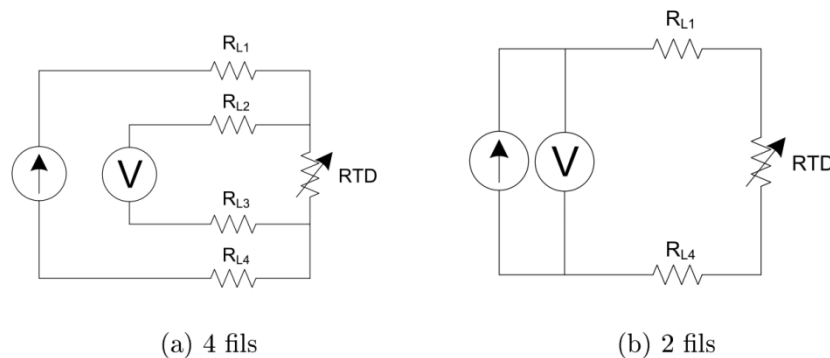


Figure C.8 Méthode de mesure des résistances thermiques

La méthode à 4 fils permet de réduire l'effet de l'impédance des lignes. Cette méthode est utilisée lorsque les lignes de transmissions sont longues et que la résistance thermique fut calibrée à l'extérieur du circuit de mesure.

La résistivité du platine des RTD varie en première approximation linéairement avec la température. Il existe également un modèle d'ordre trois pour augmenter la précision de la mesure.

$$R_T = R_0 \cdot (1 + \alpha T) \quad (\text{C.11})$$

et

$$R_T = R_0 (1 + \alpha T + \beta T^2 + \gamma (T - 100) T^3) \quad (\text{C.12})$$

où R_0 est l'impédance de la RTD à 0 °C, α , β et γ sont les coefficients propres à chaque type de RTD en °C⁻¹. L'équation (C.11) est normalement utilisée au-dessus de 0 °C et l'équation (C.12) pour des températures en dessous de 0 °C. Pour des utilisations à basses températures, moins de 300 °C, les RTD permettent habituellement des mesures de températures plus précises. Par contre, la précision d'une RTD est directement reliée à la qualité du circuit de mesure. De plus, il est difficile d'utiliser des RTD pour de très faibles deltas de température, car il existe un phénomène d'autochauffe de la RTD dû à l'effet Joule puisque, pour mesurer la température, il faut lui injecter un courant. Les RTD standards ont habituellement des résistances qui vont de 25 Ω à 1000 Ω à 0 °C.

C.2.3 Thermistance

Les thermistances sont des senseurs de température qui tout comme les RTD fonctionnent en effectuant une mesure de l'impédance. Les thermistances utilisent les mêmes types de circuits pour la mesure de la température que les RTD. Par contre contrairement aux RTD qui sont fabriqués avec du platine, les thermistances sont fabriquées d'un semi-conducteur qui fait jonction avec un oxyde.

La réponse des thermistances n'est pas linéaire par rapport à la température, le plus souvent, c'est un modèle logarithmique qui est utilisé [157].

$$\frac{1}{T} = a + b \ln R_T + c (\ln R_T)^3 \quad (\text{C.13})$$

où R_T est la résistance à la température T et a , b et c sont les coefficients propres à la thermistance.

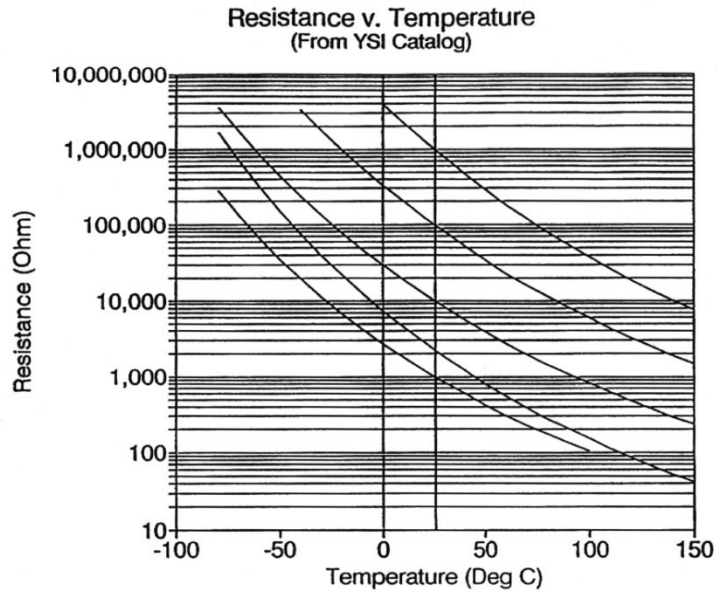


Figure C.9 Valeur de l'impédance de thermistance en fonction de la température [157]

Un des avantages des thermistances par rapport au RTD est leur grande sensibilité ($d\Omega/dT$), soit $438 \Omega/K$ pour une thermistance à $10 \text{ k}\Omega$ comparativement à $0.392 \Omega/K$ pour une RTD de 100Ω [157]. De plus, puisque l'impédance des thermistances est plus élevée avec une plus grande sensibilité cela permet de réduire le courant d'excitation et ainsi limiter l'échauffement dû à l'effet Joule. La principale erreur de mesure avec l'utilisation de thermistance vient du modèle montré à l'équation (C.13).

C.2.4 Jonction de semi-conducteur (Diode)

Les jonctions à l'intérieur des semi-conducteurs sont sensibles au changement de température. Un capteur de température peut facilement utiliser ce type de dispositif. La majorité du temps un transistor bipolaire avec un court-circuit entre la base et le collecteur qui est utilisé [158]. La Figure c.10 montre le circuit type de mesure.

Le courant dans une jonction pn se caractérise par l'équation [159] :

$$I_{ex} = I_0 e^{qV_{BE}/kT} \quad (\text{C.14})$$

Il est possible de mettre en évidence V_{BE} :

$$V_{BE} = \frac{kT}{q} \ln \left(\frac{I_{ex}}{I_0} \right) \quad (\text{C.15})$$

où

- V_{BE} est la tension entre la base et l'émetteur

- I_{ex} est le courant d'excitation injecté dans le collecteur
- I_0 est le courant de saturation en inverse de la jonction
- k est la constante de Boltzmann
- T est la température
- q est la charge d'un électron

I_0 peut être considéré relativement constant en fonction de la température et I_{ex} est contrôlé, $\ln(I_{ex}/I_0)$ va être une constante. La tension V_{BE} est proportionnelle à la température et le coefficient de changement de la tension en fonction de la température va être de l'ordre de $-2\text{mV}/^\circ\text{C}$. Il est normalement établi que la précision absolue de ce type de mesure va être de l'ordre de $\pm 2^\circ\text{C}$ [160].

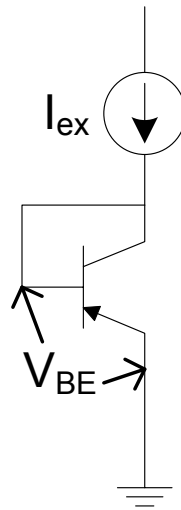


Figure C.10 Transistor bipolaire en configuration pour la mesure de la température

ANNEXE D PROCÉDÉ DE FABRICATION

D.1 Révision

2010-06-10 : 1^{ère} version papier détaillé du procédé complet

2010-06-15 : Ajout de détail pour la passivation et pour les plots de réaction de la calorimétrie

2010-06-22 : Ajout des figures des photomasques

2010-06-28 : Modification du dépôt de chrome, gravure plutôt que soulèvement, détails pour les dépôts PECVD de SiO₂. Ouverture des contacts par gravure BOE plutôt qu'à l'AOE.

2010-08-09 : Modification des photolithographies pour l'utilisation de la développeuse automatique

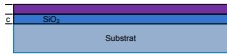
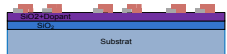



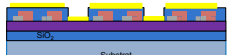
2011-01-18 : Modification de la vitesse d'étalement de la LOR3A de 4000rpm à 3000rpm.

2011-03-30 : Modification de l'étape de Nickel pour passer à la gravure, ajout du taux de gravure du SiO₂.

2011-05-16 : Modification du schéma récapitulatif

Étapes du procédé de fabrication des guides d'ondes SPR

Tableau D.1 Résumé des étapes de fabrication

Numéro	Description de l'étape	Schéma
D.2	Préparation des substrats	
2	Nettoyage des échantillons	
3	Formation du guide d'onde plan	
4	Fabrication des thermopiles	
5	Formation des plots de réaction SPR et des connecteurs	
6	Passivation	
7	Formation des plots de réactions de la calorimétrie	
8	Ouverture des connecteurs	

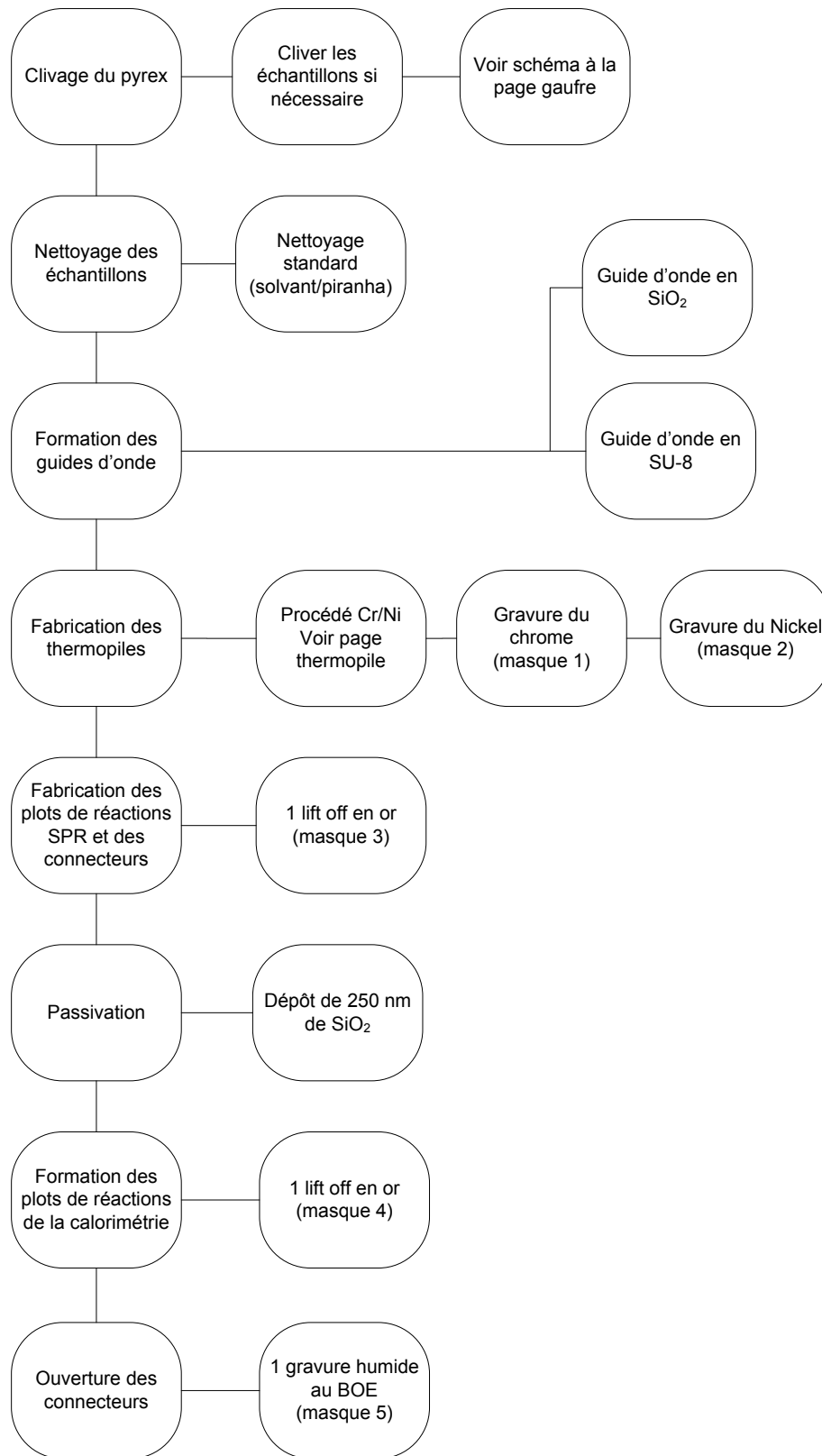


Figure D.1 Résumé du procédé de fabrication

D.2 Préparation des substrats

Les substrats seront constitués de gaufres de Pyrex de 6po. Obtenus de chez University Wafer :

- Borofloat glass
- Diameter: 150mm
- Thickness: 500um
- Double side polished
- SQ: 80/50
- Edges: C radius ground and polished edges
- Qty: 10 pcs
- Price: \$44.90 each
- Refractive index 1.471 [161]

Les gaufres seront clivées selon les besoins, soit en demi-gaufre ou en quart de gaufre. Si on utilise des guides en SiO₂, le découpage va être effectué après le dépôt du guide.

D.3 Nettoyage des substrats

- Pirhana (4 :1 H₂SO₄ :H₂O₂) ou OptiClear 10 minutes;
- Rinçage à l'eau;
- Séchage sous jet d'azote

D.4 Formation du guide d'onde

D.4.1 Guide en SiO₂

Dépôt de SiO₂ à faible indice de réfraction par PECVD, ce procédé va être effectué sur la gaufre de 6po complète, elle sera découpée par la suite pour le reste du procédé.

Tableau D.2 Formation des couches de SiO₂ pour la formation du guide d'onde

Épaisseur de la couche	Indice de réfraction
4 µm	1.460
3 µm	1.470 ³⁰

³⁰ 0.009 de plus que la couche de 4 µm

1^{ère} couche :

Programme standard optimisé par Abdelatif Jaouad pour des oxydes à faible indice.

2^e couche :

Programme utilisé standard optimisé par Abdelatif Jaouad pour des oxydes à faible indice avec paramètres différents pour augmenter l'indice.

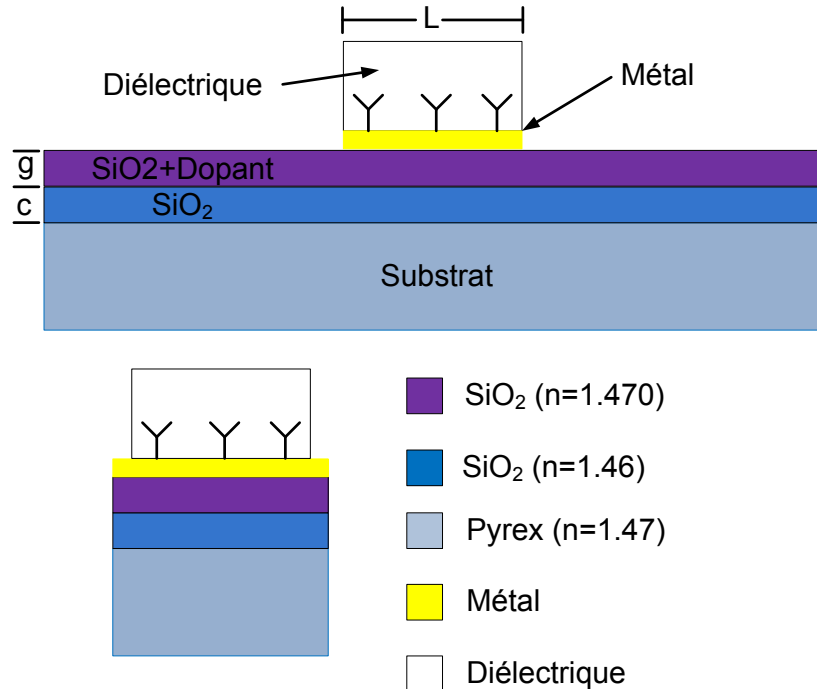


Figure D.2 : Schéma du guide d'onde en SiO₂

D.4.2 Guide en KMPR ou SU-8

Il est important d'effectuer un dépôt le plus mince possible. Dû à la valeur élevée de l'indice de réfraction, il devient très simple de guider plusieurs modes.

D.4.3 Guide en KMPR

- Utilisation de la KMPR 1005
- Étalement
- Étalement à 500 rpm avec accélération de 100rpm/sec pour 5 secondes
- Étalement à 4000 rpm avec accélération à 300rpm/sec pour 30 secondes
- « Soft bake » de 5 minutes à 100°C

- Exposition à la lampe UV 525mJ/cm²
- « Hard bake » de 1 heure à 180°C avec une rampe de 50°C/minutes

Formation d'un guide d'onde de 5µm avec ce procédé.

D.4.4 Guide en SU-8

- Utilisation de la SU-8 2002
- Étalement
- Étalement à 500 rpm avec accélération de 100rpm/sec pour 5 secondes
- Étalement à 3000 rpm avec accélération à 300rpm/sec pour 30 secondes
- « Soft bake »
- 1 minute à 65°C
- 2 minutes à 95°C
- Exposition à la lampe UV 200mJ/cm²
- « Hard bake » de 1 heure à 180°C avec une rampe de 50°C/minutes

Formation d'un guide d'onde de 2µm avec ce procédé.

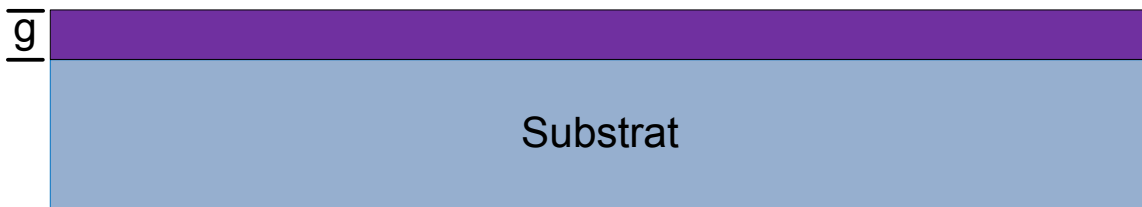


Figure D.3 : Guide d'onde en résine (KMPR ou SU-8)

D.5 Fabrication des thermopiles

D.5.1 Dépôt du chrome

D.5.2 Métallisation du chrome

- Descum plasma d'oxygène 75W, 2 min.
- Dépôt de 200 nm à l'évaporateur avec plasma en argon

D.5.3 Photolithographie du Chrome (Photomasque 1)

- Étuvage 125°C 30 min.

- Revêtement de Shipley 1813, 3000rpm 30 secondes
- Recuit plaque chauffante 1min 30sec, 115°C
- Exposition OAI 20mW/cm² environ 6s à optimiser (de 5.5s à 7.5s).
- Développement dans la développeuse, programme standard (7)
- Inspection au microscope optique
- Recuit dure de 10min à 110°C

D.5.4 Gravure du chrome

- Faire un décrottage ("descum") au plasma O₂ (appareil Plasmaline), 1 à 2 minutes à 75 ou 100 watts;
- Plonger l'échantillon dans la solution de gravure (il faut environ 20 s avant que la gravure s'amorce). Le temps de gravure dépend de l'épaisseur du chrome et de l'aire de la surface à graver;
- Quand la gravure est terminée, rincer l'échantillon dans un bécher d'eau et observer au microscope optique pour être certain que la gravure est complète;
- Si la gravure est incomplète, répéter les deux étapes plus haut;
- Enlever la résine en plongeant l'échantillon dans l'acétone (5 à 10 minutes) puis dans l'IPA, suivi d'un séchage au jet d'azote;
- Éliminer les résidus organiques avec un traitement au plasma oxygène (appareil Plasmaline), 2 minutes à 100W.

D.5.5 Dépôt du Nickel

D.5.6 Photolithographie du Nickel 1, ouverture du marque d'alignement (Photomasque 6)

- Étuvage 125°C 30 min.
- Revêtement LOR3A 3000rpm, 30 secondes
- Recuit plaque chauffante 20min. 180°C
- Revêtement de Shipley 1813, 3000rpm 30 secondes
- Recuit plaque chauffante 1min 30sec, 115°C
- Photolithographie avec photomasque6
- Exposition OAI 20mW/cm² environ 7.5s à optimiser (de 5.5s à 7.5s).

- Développement, programme lift-off dans la développeuse
- Inspection au microscope optique

D.5.7 Seconde métallisation du Nickel

- Descum plasma d'oxygène 100W, 1 min.
- Dépôt de 300nm de nickel avec plasma argon

D.5.8 Soulèvement

- Immersion bain de Remover PG (1165) 65°C jusqu'au lendemain
- Pipetage (jets de Remover PG) si nécessaire
- Inspection sous immersion avec microscope dédié
- Bain d'acétone 5 min.
- Bain d'IPA 5 min.
- Rinçage bain d'eau déionisée
- Séchage au jet d'azote

D.5.9 Photolithographie du Nickel 2, gravure du Nickel (Photomasque 2 version 2)

- Étuvage 125°C 30 min.
- Revêtement de Shipley 1813, 3000rpm 30 secondes
- Recuit plaque chauffante 120sec, 115°C
- Photolithographie avec photomasque 2
- Exposition OAI 20mW/cm² environ 7.5s à optimiser (de 5.5s à 7.5s).
- Développement standard dans la développeuse (programme 7)
- Inspection au microscope optique
- Recuit dure, 125°C, 5 min

D.5.10 Gravure du Nickel

- Gravure à l'aquaregia (environ 12min) HCL:HNO₃:H₂O, 3:1:2 [131]
- Eau (2min)
- Azote
- Acétone pour enlever la résine

- IPA
- Eau
- Azote

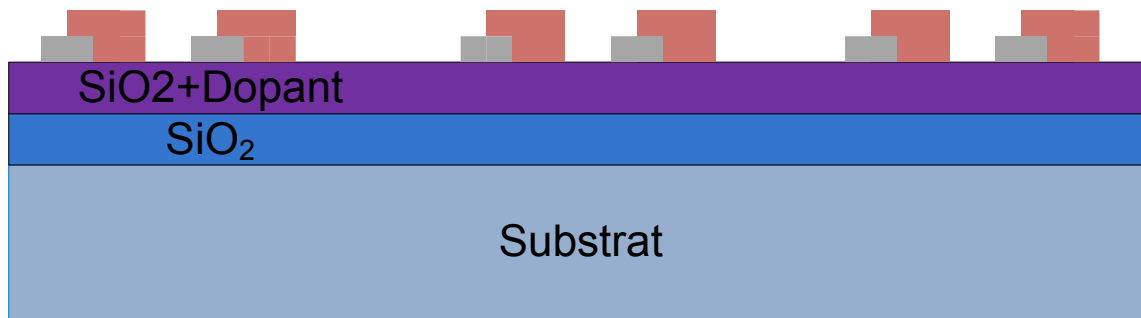


Figure D.4 : Formation des thermopiles

D.6 Formation des plots de réaction SPR et des connecteurs

D.6.1 Dépôt de l'or pour les connexions

D.6.2 Photolithographie de l'or (PhotoMasque 3)

- Étuvage 125°C 30 min.
- Revêtement LOR3A 3000rpm, 30 secondes
- Recuit plaque chauffante 20min. 180°C
- Revêtement de Shipley 1813, 3000rpm 30 secondes
- Recuit plaque chauffante 1min 30sec, 115°C
- Procédure EBR avec masque 6
- Développement standard dans la développeuse (programme 7)
- Exposition OAI 20mW/cm² environ 6s à optimiser (de 5.5s à 7.5s).
- Développement, programme lift-off dans la développeuse
- Inspection au microscope optique

D.6.3 Métallisation de l'or

- Descum plasma d'oxygène 75W, 2 min
- 5 nm de chrome + 50 nm d'or avec plasma argon

D.6.4 Soulèvement

- Immersion bain de Remover PG 65°C jusqu'au lendemain
- Pipetage (jets de Remover PG) si nécessaire
- Inspection sous immersion avec microscope dédié
- Bain d'acétone 5 min.
- Bain d'IPA 5 min.
- Rinçage bain d'eau déionisée
- Séchage au jet d'azote

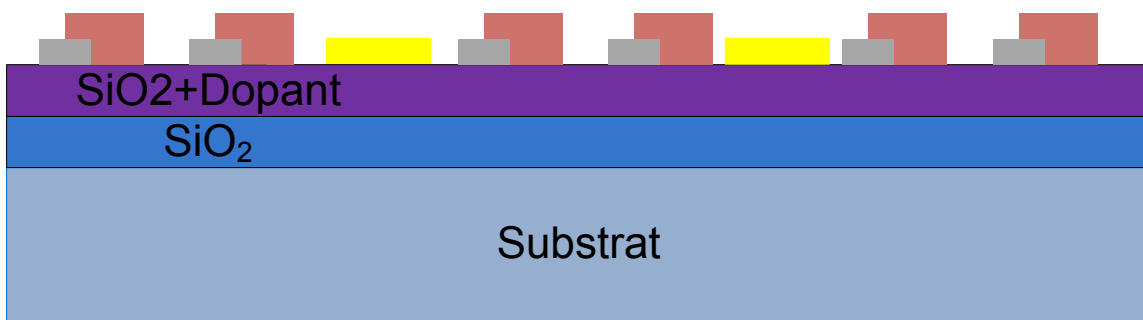


Figure D.5 : Formation des plots d'or pour le SPR

D.7 Passivation

Dépôt de 300nm de SiO₂, avec la même recette que pour le dépôt de 4μm, soit un dépôt d'indice de 1.46 où de 0.01 plus faible que celui du guide d'onde.

- Utilisation de PECVD recette HF

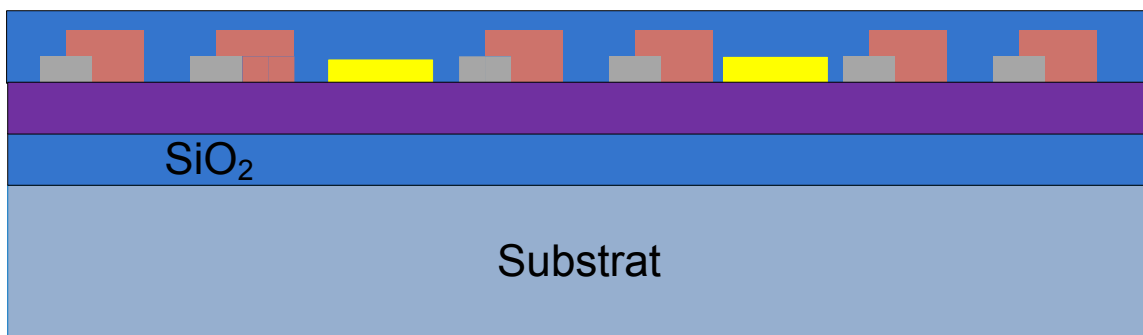


Figure D.6 : Passivation des thermopiles

D.8 Formation des plots de réactions de la calorimétrie

D.8.1 Photolithographie de l'or pour la calorimétrie (PhotoMasque 4)

- Étuvage 125°C 30 min.
- Revêtement LOR3A 4000rpm, 30 secondes
- Recuit plaque chauffante 20min. 180°C
- Revêtement de Shipley 1813, 3000rpm 30 secondes
- Recuit plaque chauffante 1min 30sec, 115°C
- Procédure EBR avec masque 6
- Développement standard dans la développeuse (programme 7)
- Exposition OAI 20mW/cm² environ 6s à optimiser (de 5.5s à 7.5s)
- Développement, programme lift-off dans la développeuse
- Inspection au microscope optique

D.8.2 Métallisation de l'or

- Descum plasma d'oxygène 75W, 2 min
- 5 nm de chrome + 50 nm d'or avec plasma argon

D.8.3 Soulèvement

- Immersion bain de Remover PG (1165) 65°C jusqu'au lendemain
- Pipetage (jets de Remover PG) si nécessaire
- Inspection sous immersion avec microscope dédié
- Bain d'acétone 5 min.
- Bain d'IPA 5 min.
- Rinçage bain d'eau déionisée

Séchage au jet d'azote

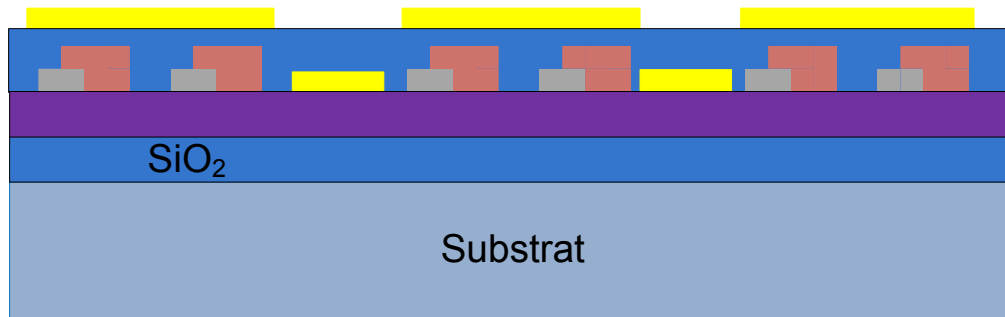


Figure D.7 : Dépôt des plots pour la calorimétrie

D.9 Ouverture des connecteurs

D.9.1 Photolithographie d'ouverture des connecteurs (PhotoMasque5)

- Étuvage 125°C 30 min.
- Étalement de résine (ShIPLEY1813)
- Cuisson plaque chauffante 1min30. 115°C
- Exposition OAI 20mW/cm² environ 7.5s à optimiser.
- Développement par pulvérisation (programme 7)
- Rinçage bain d'eau déionisée et séchage au jet d'azote
- Inspection au microscope optique

D.9.2 Gravure du SiO₂

- Gravure humide au BOE (6 :1) (selon [162], le taux de gravure est de 1000 Å/min)
- Enlever la résine à l'aide d'acétone
- Rincer à l'eau déionisée et séchage au jet d'azote

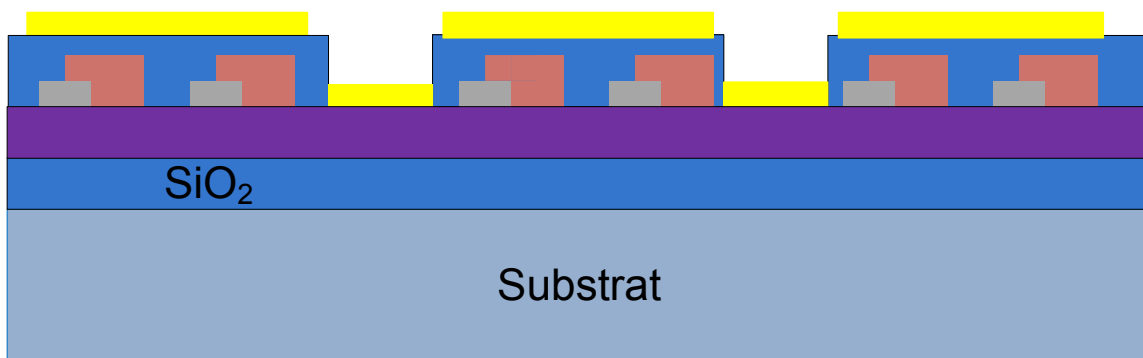


Figure D.8 : Ouverture des connecteurs

D.10 Photomasques

D.10.1 Photomasque 1

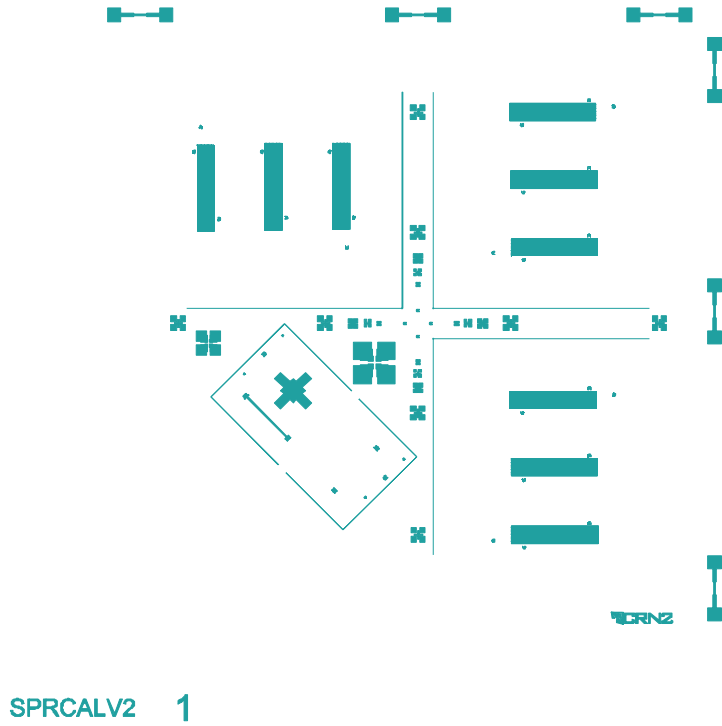


Figure D.9 : Photomasque 1 (chrome, champ clair)

D.10.2 Photomasque 2

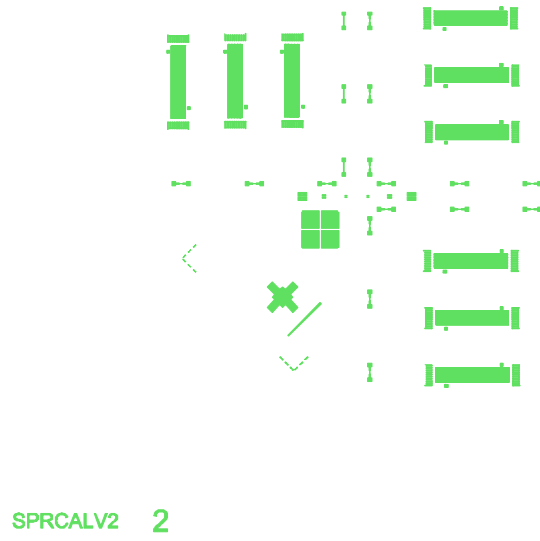


Figure D.10 : Photomasque 2 (nickel, champ clair)

D.10.3 Photomasque 3

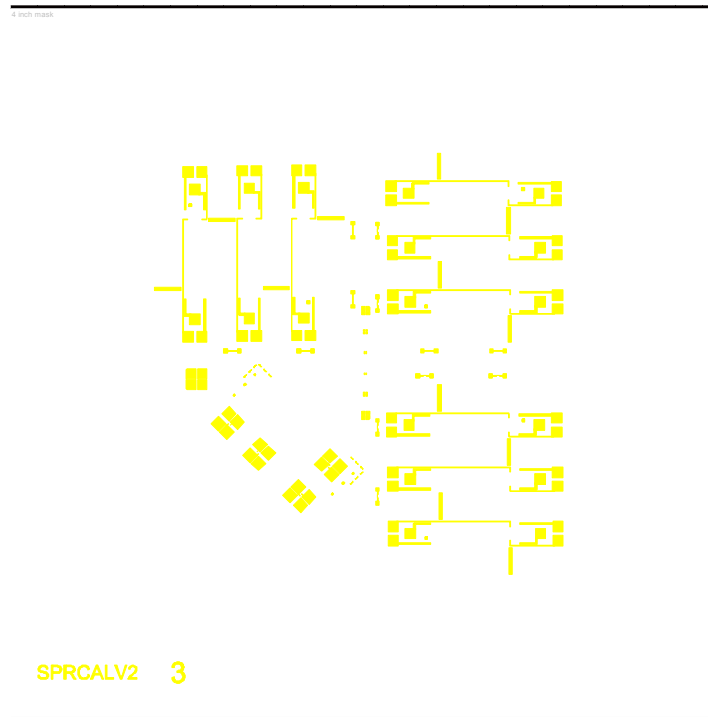


Figure D.11 : Photomasque 3 (or, champ foncé)

D.10.4 Photomasque 4



Figure D.12 : Photomasque 4 (or, champ foncé)

D.10.5 Photomasque 5

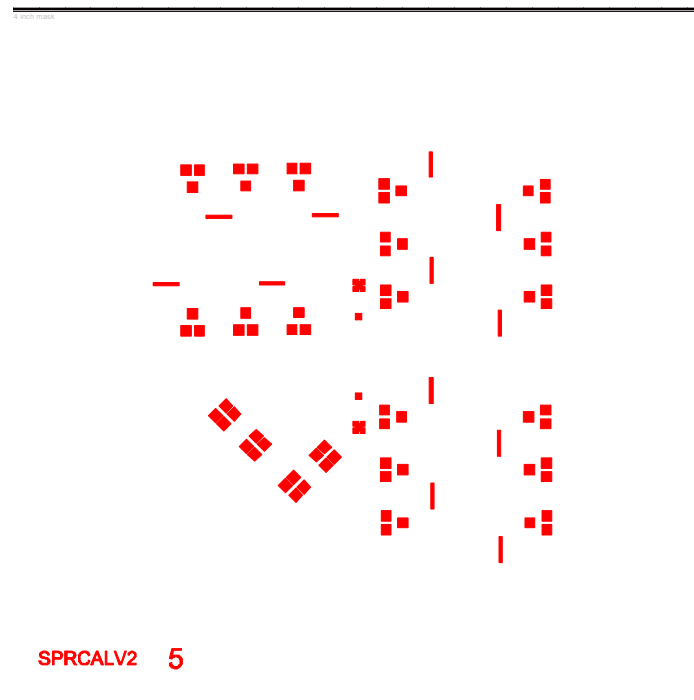


Figure D.13 Photomasque 5 (ouverture des plots, champ foncé)

D.10.6 Photomasque 6

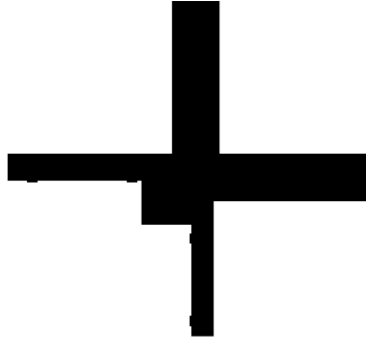


Figure D.14 Photmasque 6 (ouverture des marques d'alignement pour le nickel)

ANNEXE E PROTOCOLE DE FONCTIONNALISATION

E.1 Introduction

Description du protocole de fonctionnalisation de chimie de surface utilisé comme modèle de validation de dispositifs couplé SPR et calorimétrie.

La fonctionnalisation a pour but d'utiliser une chimie simple et robuste pour tous les tests et la caractérisation des futurs dispositifs.

Ce protocole est basé sur la **BSA** (bovine serum albumin), la streptavidine et l'ADN.

Le protocole utilisé est également décrit dans plusieurs publications [26].

E.2 Information générale

Solvant : SSC1x pour l'ADN et PBS1x pour tout le reste

Température : Pièce pour la fonctionnalisation peut devoir être changée pour l'hybridation.

E.3 Protocole

E.3.1 Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être propres physiquement, c'est-à-dire qu'il ne doit pas y avoir de saletés ou de particules. Un nettoyage aux solvants est suffisant. Si les dispositifs le permettent, un nettoyage au Piranha acide peut être réalisé pour s'assurer d'une propreté chimique. La Figure e.1 montre l'échantillon tel qu'il doit être suite à la préparation de l'échantillon.

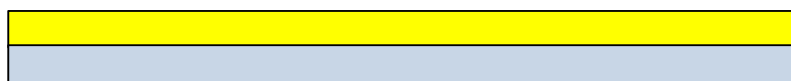


Figure E.1 Échantillons de départ

Étapes à réaliser :

Sans Piranha

1. Acétone 10min
2. Alcool (Éthanol ou IPA) 10min
3. Eau DI (18.2 M Ω) 5min
4. Azote

Avec Piranha³¹

1. Acétone 10min
2. Alcool (Éthanol ou IPA) 10min
3. Eau DI (18.2 MΩ) 5min
4. Azote
5. Piranha
6. Eau DI (18.2MΩ) 5min
7. Azote

E.3.2 Formation de la monocouche de BSA

La formation de la monocouche de BSA est faite par adsorption de la BSA sur la surface à fonctionnaliser. La BSA utilisée doit être avec de la biotine. La Figure e.2 montre le concept d'une monocouche de BSA-biotine.

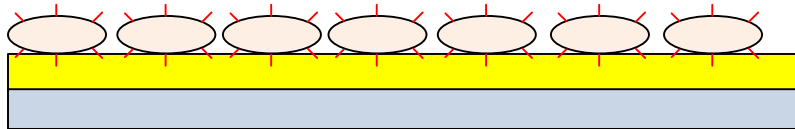


Figure E.2 : Échantillon avec la monocouche de BSA-biotine

Étapes à réaliser :

1. Mettre du PBS 1x sur la surface à fonctionnaliser
2. Rajouter de la BSA-biotine pour obtenir une concentration de 2mg/ml
3. Attendre que la couche soit stable
4. Rincer au PBS 1x
5. Vérifier que la monocouche est bien présente

E.3.3 Formation de la couche de neutravidine

Pour la couche d'interaction, l'utilisation de la neutravidine est privilégiée. S'il n'est pas possible d'utiliser la neutravidine, il est possible de remplacer celle-ci par de la streptavidine. Par contre, il est à noter que les interactions entre la streptavidine et la biotine sont moins fortes que les interactions entre la neutravidine et la biotine.

³¹ Un nettoyage au piranha en vue d'une fonctionnalisation doit être réalisé moins de 10min avant le début de la réaction de fonctionnalisation. Sinon celui-ci n'a aucun effet. L'eau DI peut servir pour entreposer les échantillons propres après nettoyage et avant fonctionnalisation.

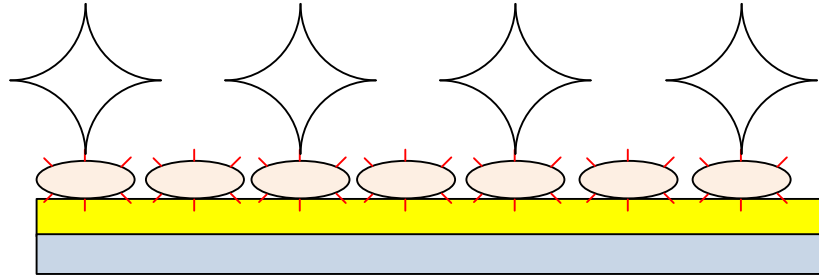


Figure E.3 : Formation de la couche de Neutravidine

Étapes à réaliser :

1. Dans du PBS1x
2. Mettre de la neutravidine pour obtenir une concentration de 1mg/ml
3. Faire incuber durant xxx min
4. Rinsier au PBS1x

E.3.4 Greffe de l'ADN sonde

La greffe de l'ADN sonde est la dernière étape de la fonctionnalisation de la surface avant la détection de l'hybridation. Le travail avec l'ADN demande plus de minutie que pour celui des étapes précédentes. Il est intéressant d'utiliser des sondes avec un fluorophore. Cela permet de vérifier l'uniformité de la fonctionnalisation de la surface. La Figure e.4 montre la greffe de l'ADN sonde.

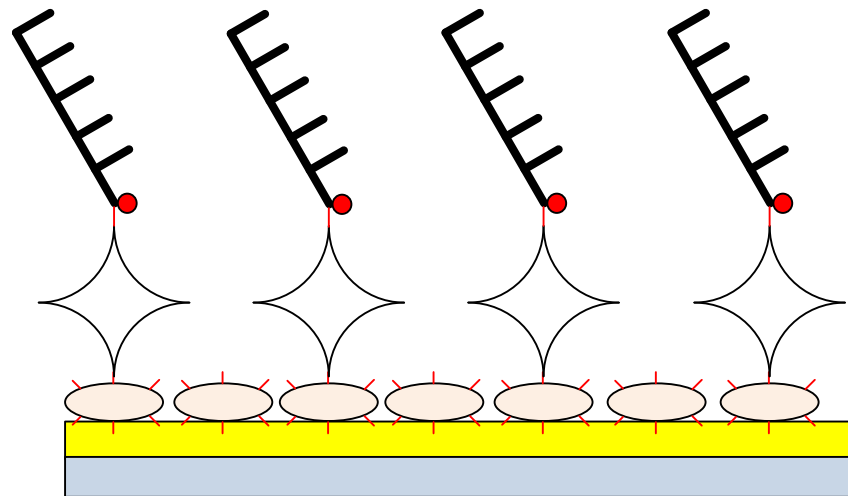


Figure E.4 : Greffe de l'ADN sonde

Étapes à réaliser :

1. Dans du SSC 1x
2. Mettre l'ADN sonde pour avoir une concentration de l'ordre de 1.7[μMol]
3. Faire incuber durant 10min (99% de la réaction) ou durant une nuit (100% de la réaction)

4. Rincer au SSC 1x

E.3.5 Détection des brins d'ADN ciblé par hybridation

La détection de l'ADN cible est l'étape où le signal va être le plus faible. Pour effectuer une mesure SPR de l'hybridation, une résolution de l'ordre de 10^{-5} RIU du système est souhaitée. Le changement d'indice entre les monobrins des sondes et les brins d'ADN cibles et sondes hybridés est de l'ordre de 0.08 RIU pour une chaîne de 27 bases [95]. La Figure E.5 montre le concept de la détection par hybridation. Il est possible d'effectuer l'hybridation à température pièce, mais celle-ci est plus efficace à des températures légèrement sous les températures de déhybridation des séquences de bases choisies [99]. Pour déterminer cette température, il est possible d'utiliser le modèle développé par Zuker et disponible sur le web [163].

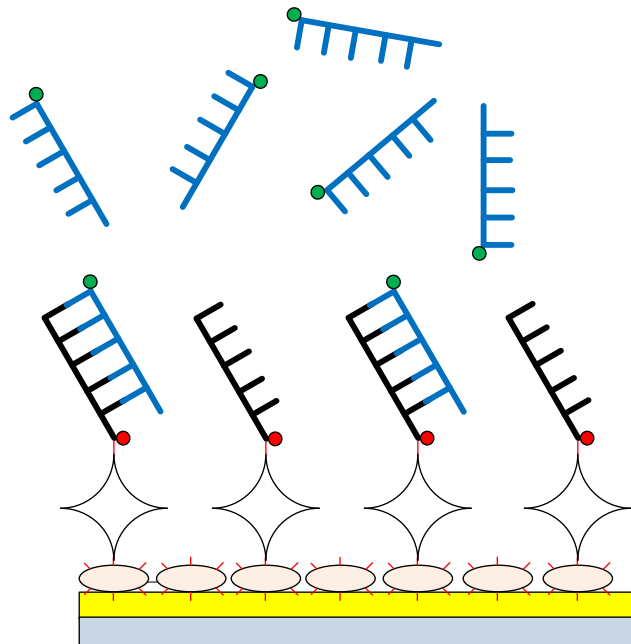


Figure E.5 : Détection d'ADN cible par hybridation

Étapes à réaliser :

1. Dans du SSC 1x
2. Mettre l'ADN cible³²

³² La concentration va dépendre de l'expérience choisie.

ANNEXE F DÉTAL DE LA SIMULATION COMSOL

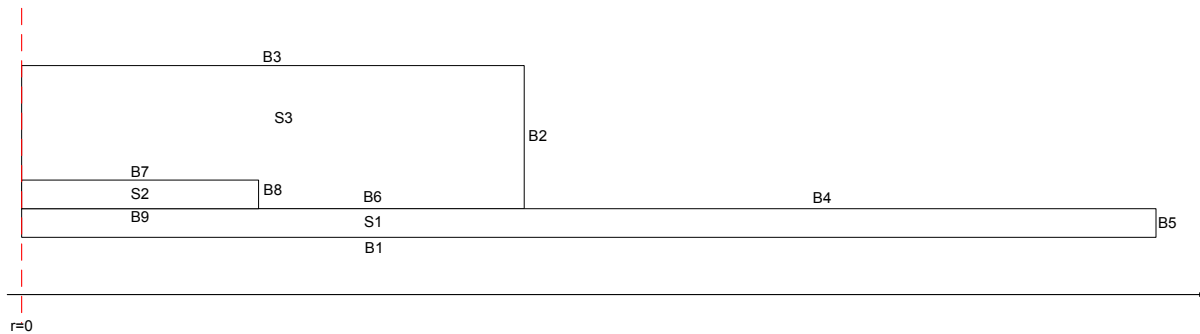


Figure F.1 Schéma du système simulé avec les différents domaines et condition limite

La simulation est réalisée à l'aide du logiciel COMSOL 4.0a avec le module physique standard de transfert de chaleur.

La simulation fut résolue pour la solution stationnaire à l'aide du « *solver* » non-linéaire.

Domaines :

- S1 = verre, température initiale = 25 °C
- S2 = eau température initiale= 25 °C
- S3 = PMMA température initiale = 25 °C

Conditions limites :

- B1 convection avec $h=22 \text{ W/m}^2 \cdot \text{K}$
- B2 convection avec $h=22 \text{ W/m}^2 \cdot \text{K}$
- B3 convection avec $h=22 \text{ W/m}^2 \cdot \text{K}$
- B4 convection avec $h=22 \text{ W/m}^2 \cdot \text{K}$
- B5 convection avec $h=22 \text{ W/m}^2 \cdot \text{K}$
- B6 continuité
- B7 continuité
- B8 continuité
- B9 source de chaleur de 0.2084 W/m^2 ce qui correspond à la puissance d'une hybridation d'ADN

Température du milieu ambiant de 25°C.

ANNEXE G MOLÉCULE D'ADN

La molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique) fut découverte par Watson et Crick en 1953 [30]. Cette molécule est présente dans tous les êtres vivants et est porteuse du code génétique. Elle permet la synthèse et le transfert de l'hérédité.

La molécule d'ADN est constituée de trois parties principales, un groupe phosphate, un sucre (désoxyribose) et une base azotée. Les groupes phosphate et le sucre forment un squelette sur lequel une base azotée est disposée pour former un nucléotide. Un brin d'ADN est formé d'un enchaînement de plusieurs nucléotides. La Figure g.1 montre le schéma d'un brin d'ADN avec les trois différentes parties.

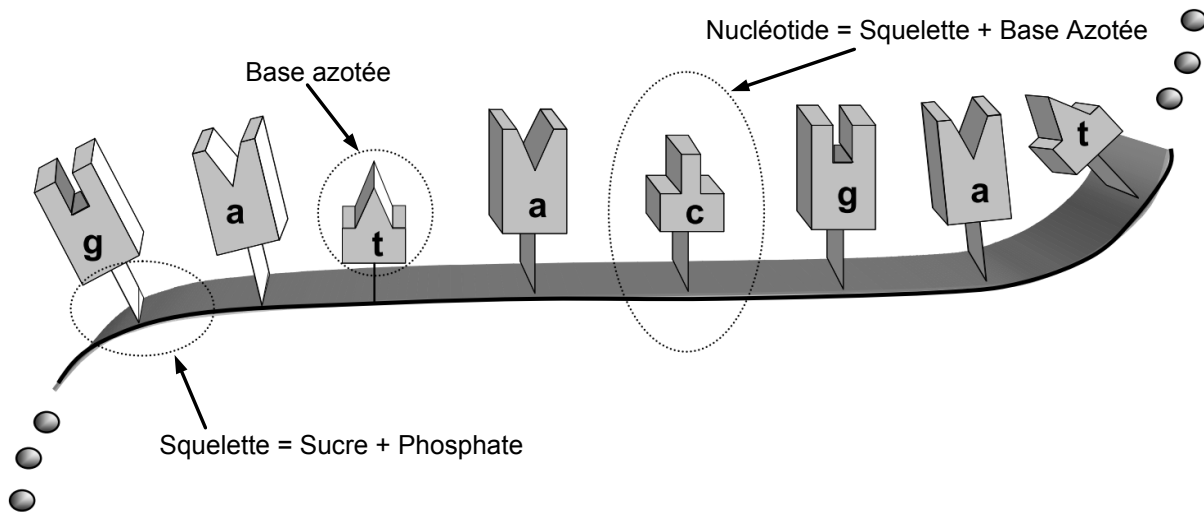


Figure G.1 Représentation d'une molécule d'ADN

Il y a quatre types de bases azotées possibles sur un brin d'ADN, l'adénine, la thymine, la guanine, la cytosine. L'enchaînement des différentes bases le long du brin est la séquence d'ADN. C'est cette séquence qui constitue le message porté par la molécule.

Les bases azotées ont la propriété de l'associer avec une autre base azotée complémentaire. La complémentarité des bases est la suivante :

- Adénine avec la Thymine
- Cytosine avec la Guanine

Dans un même ordre d'idée, deux séquences d'ADN complémentaires ont la possibilité de s'associer, ce phénomène est nommé hybridation. La dissociation de deux brins d'ADN est la dissociation. Dans le cas où deux brins non complémentaires d'ADN seraient en contact, les chances pour qu'il y ait hybridation se verraient extrêmement réduits. La Figure g.2 montre l'hybridation de deux brins d'ADN dont les séquences de nucléotides sont complémentaires.

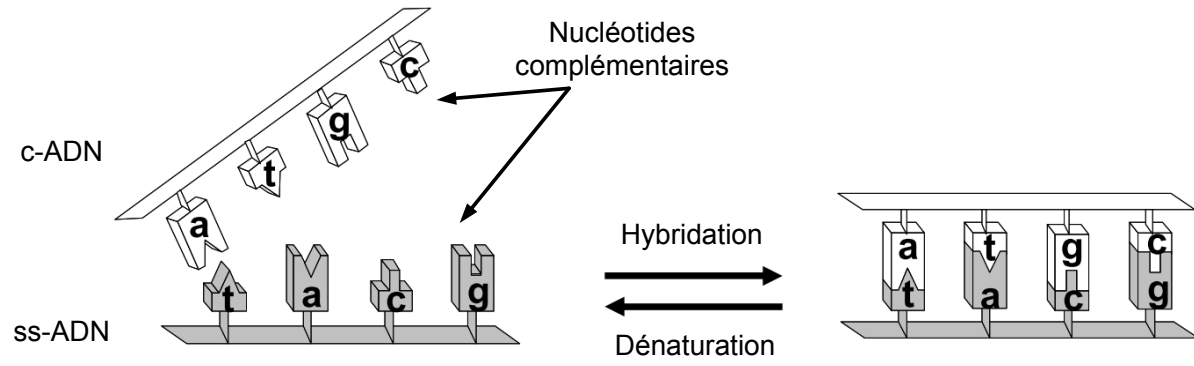


Figure G.2 Reconnaissance entre deux oligonucléotides complémentaires [32]

ANNEXE H VALEURS PHYSIQUES

Tableau H.1 Valeur d'indice de réfraction de l'or

Longueur d'onde (μm)	n	k
0.1	1.2	0.836
0.12	1.258	0.963
0.13	1.307	1.02
0.14	1.357	1.07
0.15	1.419	1.102
0.16	1.483	1.106
0.17	1.519	1.07
0.18	1.47	1.085
0.19	1.427	1.135
0.195	1.424	1.17
0.2	1.427	1.215
0.45	1.4	1.88
0.5	0.84	1.84
0.55	0.331	2.324
0.6	0.2	2.897
0.65	0.142	3.374
0.7	0.131	3.842
0.75	0.14	4.266
0.8	0.149	4.654
0.85	0.157	4.993
0.9	0.166	5.335
0.95	0.174	5.691
1	0.179	6.044
1.5	0.36	10.4
2	0.55	13.9
2.5	0.82	17.3
3	1.17	21
4	2.04	27.9
5	3.27	35.2
6	4.7	35.2
8	7.82	54.6
10	11.5	67.5
12	15.4	80.5

Tableau H.2 Valeur de l'indice de réfraction du chrome

Longueur d'onde (μm)	n	k
0.4	2.014	2.847
0.45	2.324	3.136
0.5	2.782	3.305
0.55	3.182	3.329
0.6	3.194	3.3
0.65	3.107	3.332
0.7	3.054	3.385
0.75	3.077	3.417
0.8	3.163	3.462
0.85	3.243	3.497
0.9	3.31	3.525

LISTE DES RÉFÉRENCES

- [1] Ozkumur E, Yalçın A, Cretich M, Lopez CA, Bergstein DA, Goldberg BB, et al. (2009). Quantification of DNA and protein adsorption by optical phase shift. *Biosens. Bioelectron.*, 25, 1, p. 167–72.
- [2] Kukanskis K, Elkind J, Melendez J, Murphy T, Miller G, Garner H. (1999). Detection of DNA hybridization using the TISPR-1 surface plasmon resonance biosensor. *Anal. Biochem.*, 274, 1, p. 7–17.
- [3] Fuchs J. (2009). Physicochemical study of DNA biochips DNA duplex stability, point mutation detection and beyond. Université Grenoble I - Joseph Fourier; 198 p.
- [4] Besselink GAJ, Kooyman RPH, van Os PJHJ, Engbers GHM, Schasfoort RBM. (2004). Signal amplification on planar and gel-type sensor surfaces in surface plasmon resonance-based detection of prostate-specific antigen. *Anal. Biochem.*, 333, 1, p. 165–73.
- [5] Minunni M, Mascini M, Cozzani I. (2000). Screening methodologies for genetic modified organisms (GMOs). *Anal. Lett.*, 33, p. 3093–125.
- [6] Fernández F, Hegnerová K, Piliarik M, Sanchez-Baeza F, Homola J, Marco M-P. (2010). A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples. *Biosens. Bioelectron.*, 26, 4, p. 1231–8.
- [7] Fratamico PM, Strobaugh TP, Medina MB, Gehring AG. (1998). Detection of Escherichia coli O157 : H7 using a surface plasmon resonance biosensor. *Biotechnol. Tech.*, 12, p. 571–6.
- [8] Clark L, Wolf R, Granger D, Taylor Z. (1953). Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J. Appl. Physiol.*, 6, 3, p. 189–93.
- [9] Thillaivinayagalingam P, Gommeaux J, McLoughlin M, Collins D, Newcombe AR. (2010). Biopharmaceutical production: Applications of surface plasmon resonance biosensors. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 878, 2, p. 149–53.
- [10] Matharu Z, Sumana G, Pandey MK, Gupta V, Malhotra BD. (2009). Low density lipoprotein sensor based on surface plasmon resonance. *Thin Solid Films*, 518, 2, p. 719–23.
- [11] Fu E, Chinowsky T, Nelson K, Johnston K, Edwards T, Helton K, et al. (2007). SPR imaging-based salivary diagnostics system for the detection of small molecule analytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1098, p. 335–44.

- [12] Pollet J, Delpont F, Janssen KPF, Jans K, Maes G, Pfeiffer H, et al. (2009). Fiber optic SPR biosensing of DNA hybridization and DNA-protein interactions. *Biosens. Bioelectron.*, 25, 4, p. 864–9.
- [13] Reddy PJ, Sadhu S, Ray S, Srivastava S. (2011). Cancer Biomarker Detection by Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Clin. Lab. Med.*,
- [14] Manz A, Pamme N, Lossifidis D. (2004). *Bioanalytical Chemistry*. World Scientific Publishing Company; 220 p.
- [15] Clark Jr. L, Lyon C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 102, p. 29–45.
- [16] Lu Q, Li CM. (2008). One-step co-electropolymerized conducting polymer-protein composite film for direct electrochemistry-based biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 24, 4, p. 773–8.
- [17] Trévisan M, Schawaller M, Quapil G, Souteyrand E, Mérieux Y, Cloarec J-P. (2010). Evanescent wave fluorescence biosensor combined with DNA bio-barcode assay for platelet genotyping. *Biosens. Bioelectron.*, 26, 4, p. 1631–7.
- [18] Homola J, Yee SS, Gauglitz G. (1999). Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors Actuators B Chem.*, Elsevier; 54, 1-2, p. 3–15.
- [19] Hagleitner C, Hierlemann A, Lange D, Kummer A, Kerness N, Brand O, et al. (2001). Smart single-chip gas sensor microsystem. *Nature*, 414, 6861, p. 293–6.
- [20] Wang B, Lin Q. (2012). A MEMS Differential-Scanning-Calorimetric Sensor for Thermodynamic Characterization of Biomolecules. *J. Microelectromechanical Syst.*, 21, 5, p. 1165–71.
- [21] Sheehan PE, Whitman LJ. (2005). Detection limits for nanoscale biosensors. *Nano Lett.*, ACS Publications; 5, 4, p. 803–7.
- [22] Myszka DG, He X, Dembo M, Morton TA, Goldstein B. (1998). Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophys. J.*, 75, 2, p. 583–94.
- [23] Kankare J, Vinokurov IA. (1999). Kinetics of Langmuirian Adsorption onto Planar, Spherical, and Cylindrical Surfaces. *Langmuir*, 15, 17, p. 5591–9.
- [24] Nguyen, Wu. (2005). Micromixers - a review. *J. Micromechanics Microengineering*, 15, 2, p. R1–R16.
- [25] Squires TM, Messinger RJ, Manalis SR. (2008). Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nat. Biotechnol.*, 26, 4, p. 417–26.

- [26] Malicka J, Gryczynski I, Gryczynski Z, Lakowicz JR. (2003). DNA hybridization using surface plasmon-coupled emission. *Anal. Chem.*, American Chemical Society; 75, 23, p. 6629–33.
- [27] Boozer C, Ladd J, Chen S, Yu Q, Homola J, Jiang S. (2004). DNA directed protein immobilization on mixed ssDNA/oligo(ethylene glycol) self-assembled monolayers for sensitive biosensors. *Anal. Chem.*, 76, 23, p. 6967–72.
- [28] Lue J-H, Ding T-J, Yang T-H, Huang H-C, Hsu C-L, Liu J-T, et al. (2011). Real-time monitoring DNA hybridization by guided resonant mode biosensor. *2011 6th IEEE Int. Conf. Nano/Micro Eng. Mol. Syst.*, IEEE; 1208–11 p.
- [29] Yu Y, Feng C, Caminade A-M, Majoral J-P, Knoll W. (2009). The detection of DNA hybridization on phosphorus dendrimer multilayer films by surface plasmon field enhanced-fluorescence spectroscopy. *Langmuir*, American Chemical Society; 25, 23, p. 13680–4.
- [30] Watson JD, Crick FH. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 4356, p. 737–8.
- [31] Wikipedia. (2012). Page Wikipedia sur ADN - fr. *Wikipedia*.
- [32] Cloarec J-P. (1997). Des mesures d'impédances électrochimiques a la détection directe d'ADN : faisabilité de capteurs d'oligonucléotides et fonctionnalisation de la structure électrolytes - diélectrique - semi-conducteur. Ecole Centrale de Lyon;
- [33] Pasquarelli A. (2008). Biochips: Technologies and applications. *Mater. Sci. Eng. C*, Elsevier; 28, 4, p. 495–508.
- [34] Katiyar A, Thiel SW, Gulians V V, Pinto NG. (2010). Investigation of the mechanism of protein adsorption on ordered mesoporous silica using flow microcalorimetry. *J. Chromatogr. A*, 1217, 10, p. 1583–8.
- [35] Schasfoort RBM, Tudos AJ, editors. (2008). *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Cambridge: Royal Society of Chemistry;
- [36] SantaLucia J, Allawi HT, Seneviratne PA. (1996). Improved Nearest-Neighbor Parameters for Predicting DNA Duplex Stability. *Biochemistry*, ACS Publications; 35, 11, p. 3555–62.
- [37] Renaudin A, Chabot V, Grondin E, Aimez V, Charette PG. (2010). Integrated active mixing and biosensing using surface acoustic waves (SAW) and surface plasmon resonance (SPR) on a common substrate. *Lab Chip*, The Royal Society of Chemistry; 10, 1, p. 111–5.

- [38] Dugas V, Depret G, Chevalier Y, Nesme X, Souteyrand E. (2004). Immobilization of single-stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization: covalent binding or adsorption? *Sensors Actuators B Chem.*, 101, 1-2, p. 112–21.
- [39] Khilko SN, Corr M, Boyd LF, Lees A, Inman JK, Margulies DH. (1993). Direct detection of major histocompatibility complex class I binding to antigenic peptides using surface plasmon resonance. Peptide immobilization and characterization of binding specificity. *J. Biol. Chem.*, 268, 21, p. 15425–34.
- [40] Lu B, Smyth MR, O’Kennedy R. (1996). Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst*, 121, 3, p. 29R–32R.
- [41] Herne TM, Tarlov MJ. (1997). Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 38, p. 8916–20.
- [42] Wang R, Tombelli S, Minunni M, Spiriti MM, Mascini M. (2004). Immobilisation of DNA probes for the development of SPR-based sensing. *Biosens. Bioelectron*, 20, p. 967–74.
- [43] Schreiber F. (2000). Structure and growth of self-assembling monolayers. *Prog. Surf. Sci.*, 65, 5-8, p. 151–257.
- [44] Thermo, Scientific. (2013). Avidin-Biotin Interaction, data sheet.
- [45] Incropera FP, DeWitt DP, Bergman TL, Lavine AS. (2007). *Fundamentals of Heat and Mass Transfer. Water*. John Wiley & Sons; 997 p.
- [46] Bourque-Viens A, Béland R, Aimez V, Charette PG. (2013). In situ evaluation of shape factor corrected sensitivity in a thermopile-based miniaturized calorimeter using twin-RTDs. *J. Therm. Anal. an Calorim.*, In preparation.
- [47] Wang L, Lin Q. (2005). Theory and Experiments of MEMS Thermal Biosensors. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2, p. 1301–4.
- [48] Wadsö I. (1997). Isothermal microcalorimetry near ambient temperature: An overview and discussion. *Thermochim. Acta*, 294, 1, p. 1–11.
- [49] Wadsö I. (1997). Trends in isothermal microcalorimetry. *Chem. Soc. Rev.*, Royal Society of Chemistry; 26, 2, p. 79–86.
- [50] Efremov MY, Olson EA, Zhang M, Allen LH. (2003). Glass transition of thin films of poly(2-vinyl pyridine) and poly(methyl methacrylate): nanocalorimetry measurements. *Thermochim. Acta*, 403, p. 37–41.

- [51] Karmouch R, Mercure JF, Schiettekatte F. (2005). Nanocalorimeter fabrication procedure and data analysis for investigations on implantation damage annealing. *Thermochim. Acta*, Elsevier; 432, 2, p. 186–91.
- [52] Kuepferling M, Sasso CP, Basso V, Giudici L. (2007). An Isothermal Peltier Cell Calorimeter For Measuring the Magnetocaloric Effect. *IEEE Trans. Magn.*, 43, 6, p. 2764–6.
- [53] Herwaarden A Van, Sarro P, Gardner J, P. (1994). Liquid and gas micro-calorimeters for (bio) chemical measurements. *Sensors Actuators A*, 43, p. 24–30.
- [54] Fontaine R, Bélanger F, Cadorette J, Leroux J, Martin J, Michaud J, et al. (2005). Architecture of a Dual-Modality, High-Resolution, Fully Digital Positron Emission Tomography/Computed Tomography (PET/CT) Scanner for Small Animal Imaging. *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, 52, 3, p. 691–6.
- [55] Merzlyakov M. (2003). Integrated circuit thermopile as a new type of temperature modulated calorimeter. *Thermochim. Acta*, 403, 1, p. 65–81.
- [56] Köhler J, Zieren M. (1997). Micro flow calorimeter for thermoelectrical detection of heat of reaction in small volumes. *Fresenius. J. Anal. Chem.*, Springer; 358, 6, p. 683–6.
- [57] Zhang Y, Tadigadapa S. (2003). Microthermopiles integrated with fluidic channels as calorimetric MEMS biosensors. *TRANSDUCERS, Solid-State Sensors, Actuators Microsystems, 12th Int. Conf. on, 2003*, 1176–9 p.
- [58] Baier V, Ihring A, Kessler E, Lerchner J, Wolf G. (2005). Highly sensitive thermopile heat power sensor for micro-fluid calorimetry of biochemical processes. *Sensors Actuators A Phys.*, 123-124, p. 354–9.
- [59] Wang L, Sipe DM, Xu Y, Lin Q. (2008). A MEMS thermal biosensor for metabolic monitoring applications. *J. Microelectromechanical Syst.*, IEEE AND ASME; 17, 2, p. 318.
- [60] Lubbers B, Baudenbacher F. (2011). Isothermal Titration Calorimetry in Nanoliter Droplets with Subsecond Time Constants. *Anal. Chem*, 83, 20.
- [61] Koppaarthi VL, Tangutooru SM, Nestorova GG, Guilbeau EJ. (2012). Thermoelectric microfluidic sensor for bio-chemical applications. *Sensors Actuators B Chem.*, 166-167, null, p. 608–15.
- [62] Hamadi D, Garnier B, Willaime H, Monti F, Peerhossaini H. (2012). A novel thin-film temperature and heat-flux microsensors for heat transfer measurements in microchannels. *Lab Chip*, 12, 3, p. 652–8.

- [63] Bourque-Viens A, Aimez V, Taberner A, Nielsen P, Charette PG. (2009). Modelling and experimental validation of thin-film effects in thermopile-based microscale calorimeters. *Sensors Actuators A Phys.*, 150, 2, p. 199–206.
- [64] Lahiji GR, Wise KD. (1982). A batch-fabricated silicon thermopile infrared detector. *IEEE Trans. Electron Devices*, 29, 1, p. 14–22.
- [65] Adamovsky S, Schick C. (2004). Ultra-fast isothermal calorimetry using thin film sensors. *Thermochim. Acta*, 415, 1-2, p. 1–7.
- [66] Van Herwaarden AW. (2005). Overview of calorimeter chips for various applications. *Thermochim. Acta*, 432, 2, p. 192–201.
- [67] Van Herwaarden S. (2012). Liquid Nanocalorimeters. 11 p, data sheet.
- [68] Lerchner J, Wolf A, Wolf G, Baier V, Kessler E, Nietzsche M, et al. (2006). A new micro-fluid chip calorimeter for biochemical applications. *Thermochim. Acta*, 445, 2, p. 144–50.
- [69] Torres FE, Kuhn P, De Bruyker D, Bell AG, Wolkin M V, Peeters E, et al. (2004). Enthalpy arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 26, p. 9517–22.
- [70] Recht MI, De Bruyker D, Bell AG, Wolkin M V, Peeters E, Anderson GB, et al. (2008). Enthalpy array analysis of enzymatic and binding reactions. *Anal. Biochem.*, 377, 1, p. 33–9.
- [71] Johannessen E, Weaver J, Cobbold P, Cooper J. (2002). Heat conduction nanocalorimeter for pl-scale single cell measurements. *Appl. Phys. Lett.*, 80, 11, p. 2029.
- [72] Ladbury JE. (2001). Isothermal titration calorimetry: application to structure-based drug design. *Thermochim. Acta*, 380, 2, p. 209–15.
- [73] Homola J, Dostálek J. (2006). *Surface plasmon resonance based sensors. Techniques.* Springer; 251 p.
- [74] Yariv A, Yeh P. (2002). *Optical Waves in Crystals: Propagation and Control of Laser Radiation (Wiley Series in Pure and Applied Optics).* Wiley-Interscience; 604 p.
- [75] Kabashin AV, Patskovsky S, Grigorenko AN. (2009). Phase and amplitude sensitivities in surface plasmon resonance bio and chemical sensing. *Opt. Express*, OSA; 17, 23, p. 21191–204.
- [76] Homola J, Ctyroki J, Skalski M, Hradilova J, Kolarova P. (1997). A surface plasmon resonance based integrated optical sensor. *Sensors Actuators B Chem.*, Elsevier; 39, 1-3, p. 286–90.

- [77] Akowuah EK, Gorman T, Haxha S, Oliver J V. (2010). Dual channel planar waveguide surface plasmon resonance biosensor for an aqueous environment. *Opt. Express, OSA*; 18, 24, p. 24412.
- [78] Dostálek J. (2001). Surface plasmon resonance biosensor based on integrated optical waveguide. *Sensors Actuators B Chem.*, 76, 1-3, p. 8–12.
- [79] Harris R, Wilkinson J. (1995). Waveguide surface plasmon resonance sensors. *Sensors Actuators B Chem.*, 29, p. 261–7.
- [80] Hong S-H, Kong C-K, Kim B-S, Lee M-W, Lee S-G, Park S-G, et al. (2010). Implementation of surface plasmon resonance planar waveguide sensor system. *Microelectron. Eng.*, Elsevier B.V.; 87, 5-8, p. 1315–8.
- [81] Hecht E. (2001). *Optics (4th Edition)*. Addison-Wesley; 680 p.
- [82] Nylander C, Liedberg B, Lind T. (1982). Gas detection by means of surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators*, 3, null, p. 79–88.
- [83] Chabot V, Cuerrier CM, Escher E, Aimez V, Grandbois M, Charette PG. (2009). Biosensing based on surface plasmon resonance and living cells. *Biosens. Bioelectron.*, 24, 6, p. 1667–73.
- [84] Malic L, Cui B, Veres T, Tabrizian M. (2007). Enhanced surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization on periodic gold nanoposts. *Opt. Lett.*, 24, p. 2218–24.
- [85] Jin W, Lin X, Lv S, Zhang Y, Jin Q, Mu Y. (2009). A DNA sensor based on surface plasmon resonance for apoptosis-associated genes detection. *Biosens. Bioelectron.*, 24, p. 1266–9.
- [86] Fiche JB, Fuchs J, Buhot a, Calemczuk R, Livache T. (2008). Point mutation detection by surface plasmon resonance imaging coupled with a temperature scan method in a model system. *Anal. Chem.*, 80, 4, p. 1049–57.
- [87] Boozer C. (2003). Surface functionalization for self-referencing surface plasmon resonance (SPR) biosensors by multi-step self-assembly. *Sensors Actuators B Chem.*, 90, 1-3, p. 22–30.
- [88] Weisser M. (1999). Refractive index and thickness determination of monolayers by multi mode waveguide coupled surface plasmons. *Sensors Actuators B Chem.*, 56, 3, p. 189–97.
- [89] Ward AFH, Tordai L. (1946). Time-Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time-Effects. *J. Chem. Phys.*, 14, 7, p. 453.

- [90] Kankare J, Vinokurov IA. (1999). Kinetics of Langmuirian Adsorption onto Planar, Spherical, and Cylindrical Surfaces. *Langmuir*, 15, 17, p. 5591–9.
- [91] Rampazzo L. (1969). Diffusion to a plane with adsorption according to frumkin's isotherm. *Electrochim. Acta*, 14, 8, p. 733–9.
- [92] Sritharan K, Strobl CJ, Schneider MF, Wixforth A, Guttenberg Z. (2006). Acoustic mixing at low Reynold's numbers. *Appl. Phys. Lett.*, American Institute of Physics; 88, 5, p. 054102.
- [93] Renaudin A, Chabot V, Grondin E, Aimez V, Charette PG. (2010). Integrated active mixing and biosensing using surface acoustic waves (SAW) and surface plasmon resonance (SPR) on a common substrate. *Lab Chip*, The Royal Society of Chemistry; 10, 1, p. 111–5.
- [94] Renaudin A, Tabourier P, Camart J-C, Druon C. (2006). Surface acoustic wave two-dimensional transport and location of microdroplets using echo signal. *J. Appl. Phys.*, AIP; 100, 11, p. 116101.
- [95] Elhadj S, Singh G, Saraf RF. (2004). Optical properties of an immobilized DNA monolayer from 255 to 700 nm. *Langmuir*, 20, 13, p. 5539–43.
- [96] Palik ED. (1985). *Handbook of Optical Constants of Solids*. Palik ED, editor. Most. Academic Press; 547 p.
- [97] Gray DE. (1972). *American Institute of Physics Handbook*. Gray DE, editor. McGrawHill handbooks. McGraw-Hill; 409 p.
- [98] Piliarik M, Homola J. (2009). Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits? *Opt. Express*, 17, 19, p. 16505–17.
- [99] Dimitrov RAR a, Zuker M. (2004). Prediction of hybridization and melting for double-stranded nucleic acids. *Biophys. J.*, Elsevier; 87, 1, p. 215–26.
- [100] Markham NR, Zuker M. (2005). DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.*, , July, p. 577–81.
- [101] Axelrod D, Wang M. (1994). Reduction-of-dimensionality kinetics at reaction-limited cell surface receptors. *Biophys. J.*, Elsevier; 66, 3, p. 588–600.
- [102] Chan V, Graves D, Mckenzie S. (1995). The biophysics of DNA hybridization with immobilized oligonucleotide probes. *Biophys. J.*, Elsevier; 69, 6, p. 2243–55.
- [103] Erickson D, Li D, Krull UJ. (2003). Modeling of DNA hybridization kinetics for spatially resolved biochips. *Anal. Biochem.*, 317, 2, p. 186–200.

- [104] Garciadelatorre J. (1994). Hydrodynamic properties of a double-helical model for DNA. *Biophys. J.*, Elsevier; 66, 5, p. 1573–9.
- [105] Yong WJ, Jae JY, Young DK, Deokha W. (2011). Study of the Interaction Between Biomolecule Monolayers Using Total Internal Reflection Ellipsometry. *J. Korean Phys. Soc.*, 58, 42, p. 1031.
- [106] Dubois LH, Nuzzo RG. (1992). Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 43, 1, p. 437–63.
- [107] GREEN NM. (1963). AVIDIN. 1. THE USE OF (14-C)BIOTIN FOR KINETIC STUDIES AND FOR ASSAY. *Biochem. J.*, 89, p. 585–91.
- [108] Laitinen OH, Hytönen VP, Nordlund HR, Kulomaa MS. (2006). Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63, 24, p. 2992–3017.
- [109] Miyamoto S, Kollman PA. (1993). Absolute and relative binding free energy calculations of the interaction of biotin and its analogs with streptavidin using molecular dynamics/free energy perturbation approaches. *Proteins*, 16, 3, p. 226–45.
- [110] Katiyar A, Thiel SW, Guliants V V, Pinto NG. (2010). Investigation of the mechanism of protein adsorption on ordered mesoporous silica using flow microcalorimetry. *J. Chromatogr. A*, Elsevier B.V.; 1217, 10, p. 1583–8.
- [111] Wright AK, Thompson MR. (1975). Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence. *Biophys. J.*, 15, 2, p. 137–41.
- [112] Szunerits S, Maalouli N, Wijaya E, Vilcot J-P, Boukherroub R. (2013). Recent advances in the development of graphene-based surface plasmon resonance (SPR) interfaces. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405, 5, p. 1435–43.
- [113] Mariana F, Buchholz F, Lerchner J, Neu TR, Harms H, Maskow T. (2013). Chip-calorimetric monitoring of biofilm eradication with antibiotics provides mechanistic information. *Int. J. Med. Microbiol.*, 303, 3, p. 158–65.
- [114] Haynes WM. (2013). *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 94th Edition*. CRC Press; 2668 p.
- [115] Holmes R. (1923). The Thermoelectric Properties of Sputtered films of Gold, Platinum, and Palladium; and of Solid Palladium containing Occluded Hydrogen. *Phys. Rev.*, 22, 2, p. 137–47.
- [116] Morin F. (1954). Electrical Properties of NiO. *Phys. Rev.*, 93, 6, p. 1199–204.

- [117] Moore JP, Williams RK, Graves RS. (1977). Thermal conductivity, electrical resistivity, and Seebeck coefficient of high-purity chromium from 280 to 1000 K. *J. Appl. Phys.*, 48, 2, p. 610.
- [118] Van Herwaarden A, Sarro P. (1986). Thermal sensors based on the Seebeck effect. *Sensors and Actuators*, Elsevier; 10, 3-4, p. 321–46.
- [119] Lerchner J, Maskow T, Wolf G. (2008). Chip calorimetry and its use for biochemical and cell biological investigations. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, 47, 6, p. 991–9.
- [120] Schott. (2007). N-BK7 Data sheet.
- [121] Patskovsky S, Song I-H, Meunier M, Kabashin AV. (2009). Silicon based total internal reflection bio and chemical sensing with spectral phase detection. *Opt. Express, OSA*; 17, 23, p. 20847–52.
- [122] Nassiopoulou a. G, Kaltsas G. (2000). Porous Silicon as an Effective Material for Thermal Isolation on Bulk Crystalline Silicon. *Phys. Status Solidi*, 182, 1, p. 307–11.
- [123] Auguet C, Lerchner J, Torra V, Wolf G. (2003). IDENTIFICATION OF MICRO-SCALE CALORIMETRIC DEVICES Part III . The 3-D effects. *J. Therm. Anal. an Calorim.*, 71, p. 407–19.
- [124] Liedberg B, Nylander C, Lundström I. (1995). Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started. *Biosens. Bioelectron.*, 10, 8, p. i–ix.
- [125] Thirstrup C, Zong W. (2005). Data analysis for surface plasmon resonance sensors using dynamic baseline algorithm. *Sensors Actuators B Chem.*, 106, 2, p. 796–802.
- [126] Sheehan PE, Whitman LJ. (2005). Detection limits for nanoscale biosensors. *Nano Lett.*, ACS Publications; 5, 4, p. 803–7.
- [127] Hierlemann A, Lange D, Hagleitner C, Kerness N, Koll A, Brand O, et al. (2000). Application-specific sensor systems based on CMOS chemical microsensors. *Sensors Actuators B Chem.*, 70, 1-3, p. 2–11.
- [128] Bourque-Viens A, Aimez V, Taberner A, Nielsen P, Charette PG. (2009). Modelling and experimental validation of thin-film effects in thermopile-based microscale calorimeters. *Sensors Actuators A Phys.*, 150, 2, p. 199–206.
- [129] Whelan RJ, Wohland T, Neumann L, Huang B, Kobilka BK, Zare RN. (2002). Analysis of biomolecular interactions using a miniaturized surface plasmon resonance sensor. *Anal. Chem.*, 74, 17, p. 4570–6.

- [130] Trévisan M, Schawaller M, Quapil G, Souteyrand E, Mérieux Y, Cloarec J-P. (2010). Evanescent wave fluorescence biosensor combined with DNA bio-barcode assay for platelet genotyping. *Biosens. Bioelectron.*, 26, 4, p. 1631–7.
- [131] Williams KR, Gupta K, Wasilik M. (2003). Etch rates for micromachining processing-part II. *J. Microelectromechanical Syst.*, 12, 6, p. 761–78.
- [132] Minakov AA, Mordvintsev DA, Schick C. (2004). Melting and reorganization of poly(ethylene terephthalate) on fast heating (1000 K/s). *Polymer (Guildf.)*, 45, 11, p. 3755–63.
- [133] Lerchner J, Wolf A, Wolf G, Fernandez I. (2006). Chip calorimeters for the investigation of liquid phase reactions: Design rules. *Thermochim. Acta*, 446, 1-2, p. 168–75.
- [134] Auguet C, Seguin JL, Martorell F, Moll F, Torra V, Lerchner J. (2006). IDENTIFICATION OF MICRO-SCALE CALORIMETRIC DEVICES Part V . Basic properties for gas – solid reactions. *J. Therm. Anal. an Calorim.*, 86, p. 521–9.
- [135] Milanović V, Bowen E, Zaghloul ME, Tea NH, Suehle JS, Payne B, et al. (2000). Micromachined convective accelerometers in standard integrated circuits technology. *Appl. Phys. Lett.*, 76, 4, p. 508.
- [136] Mailly F, Giani A, Maritinez A, Bonnet R, Temple-Boyer P, Boyer A. (2003). Micromachined thermal accelerometer. *Sensors Actuators A Phys.*, 103, 3, p. 359–63.
- [137] Dauderstädt UA, de Vries PHS, Hiratsuka R, Sarro PM. (1995). Silicon accelerometer based on thermopiles. *Sensors Actuators A Phys.*, 46, 1-3, p. 201–4.
- [138] St-Antoine BC, Ménard D, Martel R. (2011). Single-walled carbon nanotube thermopile for broadband light detection. *Nano Lett.*, American Chemical Society; 11, 2, p. 609–13.
- [139] Zhang Y, Tadigadapa S. (2004). Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels. *Biosens. Bioelectron.*, 19, 12, p. 1733–43.
- [140] Sheehan PE, Whitman LJ. (2005). Detection limits for nanoscale biosensors. *Nano Lett.*, ACS Publications; 5, 4, p. 803–7.
- [141] Ward AFH, Tordai L. (1946). Time-Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time-Effects. *J. Chem. Phys.*, 14, 7, p. 453.
- [142] Kankare J, Vinokurov IA. (1999). Kinetics of Langmuirian Adsorption onto Planar, Spherical, and Cylindrical Surfaces. *Langmuir*, 15, 17, p. 5591–9.

- [143] Myszka DG, He X, Dembo M, Morton TA, Goldstein B. (1998). Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophys. J.*, 75, 2, p. 583–94.
- [144] Raynal F, Beuf A, Plaza F, Scott J, Carriere P, Cabrera M, et al. (2007). Towards better DNA chip hybridization using chaotic advection. *Phys. Fluids*, 19, 1, p. 1–11.
- [145] Renaudin A, Chabot V, Grondin E, Aimez V, Charette PG. (2010). Integrated active mixing and biosensing using surface acoustic waves (SAW) and surface plasmon resonance (SPR) on a common substrate. *Lab Chip*, The Royal Society of Chemistry; 10, 1, p. 111–5.
- [146] Wadsö I, Goldberg RN. (2001). Standards in isothermal microcalorimetry. *Pure Appl. Chem*, 73, 10, p. 1625–39.
- [147] Kondoh J, Yasuda N, Sugimoto M. (2009). *A novel integrated system of sensor and actuator for droplets on sensor plate/matching layer/piezoelectric substrate structure*. 2009 IEEE Int. Ultrason. Symp. IEEE; 602–5 p.
- [148] Hodgson RP, Tan M, Yeo L, Friend J. (2009). Transmitting high power rf acoustic radiation via fluid couplants into superstrates for microfluidics. *Appl. Phys. Lett.*, 94, 2, p. 024102.
- [149] Renaudin A, Tabourier P, Zhang V, Camart J, Druon C. (2006). SAW nanopump for handling droplets in view of biological applications. *Sensors Actuators B Chem.*, 113, 1, p. 389–97.
- [150] Li Y, Bou Matar O. (2010). Convolutional perfectly matched layer for elastic second-order wave equation. *J. Acoust. Soc. Am.*, ASA; 127, 3, p. 1318–27.
- [151] Brunet P, Baudoin M, Matar OB, Zoueshtiagh F. (2010). Droplets displacement and oscillations induced by ultrasonic surface acoustic waves: a quantitative study. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear Soft Matter Phys.*, American Physical Society; 81, 3 Pt 2, p. 036315.
- [152] Kondoh J, Shimizu N, Matsui Y, Sugimoto M, Shiokawa S. (2009). Development of temperature-control system for liquid droplet using surface Acoustic wave devices. *Sensors Actuators A Phys.*, 149, 2, p. 292–7.
- [153] Roux-Marchand T, Beyssen D, Sarry F, Grandemange S, Elmazria O. (2012). Microfluidic heater assisted by Rayleigh Surface Acoustic Wave on AlN/128°Y-X LiNbO₃ multilayer structure. 2012 IEEE Int. Ultrason. Symp., IEEE; 1706–9 p.

- [154] Wang L, Wang B, Lin Q. (2008). Demonstration of MEMS-based differential scanning calorimetry for determining thermodynamic properties of biomolecules. *Sensors Actuators B Chem.*, 134, 2, p. 953–8.
- [155] Zhang Y, Tadigadapa S. (2004). Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels. *Biosens. Bioelectron.*, 19, 12, p. 1733–43.
- [156] Sigma. (2005). Glucose Oxidase, data sheet.
- [157] Zurbuchen JM. (2000). Precision thermistor thermometry, technical report.
- [158] Webster JG. (1998). *The Measurement, Instrumentation and Sensors Handbook (Electrical Engineering Handbook)2 volume set*. CRC Press; 2630 p.
- [159] Streetman B, Banerjee S. (2005). *Solid State Electronic Devices (6th Edition)*. Prentice Hall; 608 p.
- [160] Stitt RM, Kunst D. (1991). Diode-Based temperature measurement, technical report.
- [161] Harris RD, Luff BJ, Wilkinson JS, Piehler J, Brecht a, Gauglitz G, et al. (1999). Integrated optical surface plasmon resonance immunoprobe for simazine detection. *Biosens. Bioelectron.*, 14, 4, p. 377–86.
- [162] Williams KR, Muller RS. (1996). Etch rates for micromachining processing. *Microelectromechanical Syst. J.*, IEEE; 5, 4, p. 256–69.
- [163] Markham N, Zuker M. (2005). DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.*, , July, p. 577–81.