

N° d'ordre : 40935

**Université Lille 1 Sciences et Technologies**

**Thèse**

Présentée à

**L'École Doctorale Sciences pour l'Ingénieur**

Spécialité Micro et Nanotechnologies, Acoustique et Télécommunications

Par

*Guillaume Perry*

**Contribution à la réalisation de  
dispositifs microfluidiques à base  
d'électromouillage pour la détection  
SPR**

---

Soutenue publiquement le **17 Décembre 2012** devant le jury d'examen :

Président	M. Jean-Pierre Vilcot	Directeur de recherche CNRS, IEMN
Rapporteur	M. Thierry Livache	Directeur de recherche CEA, INAC Grenoble
Rapporteur	M. Liviu Nicu	Chargé de recherche HDR CNRS, LAAS Toulouse
Examineur	M. Cyril Delattre	Directeur Advanced Liquid Logic France, Grenoble
Examineur	M. Sylvain Gabriele	Tenured Assistant Professor, Université de Mons
Examineur	M. Bernard Pinchemel	Professeur, Université de Lille 1
Directeur de thèse	M. Rabah Boukherroub	Directeur de recherche CNRS, IRI
Co-encadrant	M. Vincent Thomy	Maitre de conférences, Université de Lille 1
Invité	M. Yannick Coffinier	Chargé de recherche CNRS, IRI



*« Et par le pouvoir d'un mot  
Je recommence ma vie  
Je suis né pour te connaître  
Pour te nommer Liberté »  
Paul Eluard*

*« La vraie tragédie de la vie,  
C'est qu'on devient vieux trop tôt et sage trop tard. »  
Benjamin Franklin*

*« On a jamais fait de grande découverte  
Sans hypothèse audacieuse. »  
Isaac Newton*



---

# Remerciements

---

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés aux sein de deux différents instituts : l'institut d'électronique, de microélectronique et de nanotechnologie (IEMN) et l'institut de recherche interdisciplinaire. Je remercie Messieurs *Alain Cappy* et *Lionel Buchailot*, successivement directeurs de l'IEMN et Messieurs *Ralf Blosssey* et *Vincent Villeret*, successivement directeurs de l'IRI de m'avoir accueilli au sein de leurs instituts.

Je tiens aussi à remercier Monsieur *Thierry Livache*, directeur de recherche CEA à l'institut nanoscience et cryogénie à Grenoble et Monsieur *Liviu Nicu*, chargé de recherche CNRS HDR au laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes à Toulouse, de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse.

Je remercie Monsieur *Cyril Delattre*, directeur de la société Advanced Liquid Logic France basée sur le site de Minatec à Grenoble, d'examiner mon travail.

Je tiens aussi à remercier (grandement) Monsieur *Sylvain Gabriele*, tenured assistant professor à l'université de Mons en Belgique, d'avoir réussi à se libérer de ses obligations universitaires afin de participer à ce jury.

Je remercie Monsieur *Bernard Pinchemel*, professeur des universités au laboratoire de physique des lasers, atomes et molécules (PhLAM) de l'université Lille 1 pour sa participation au jury mais aussi pour les nombreuses expériences que j'ai pu réaliser avec son expertise au cours de ses trois années et pour les discussions que nous avons eu (de la nature des liaisons chimiques à la littérature en passant par l'économie et la géographie). Son enthousiasme et son expérience ont contribué pour beaucoup à cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur *Jean-Pierre Vilcot*, directeur de recherche CNRS à l'IEMN, de me faire l'honneur d'examiner mes travaux qui sont une partie des résultats du projet Plasmobio qu'il a coordonné.

Je remercie Monsieur *Rabah Boukherroub*, directeur de recherche CNRS à l'IRI, d'avoir dirigé ma thèse durant ces trois années. J'ai vraiment apprécié sa grande disponibilité et son esprit critique.

Merci beaucoup à Monsieur *Vincent Thomy*, maître de conférence à l'IEMN, d'avoir co-encadré cette thèse. Passer ces trois années de thèse avec Vincent a été réellement un grand plaisir notamment pour sa grande disponibilité, ses idées et son expérience.

Merci à Monsieur **Yannick Coffinier**, chargé de recherche CNRS à l'IRI, d'avoir participé à mon jury de thèse en tant qu'invité et d'avoir officieusement co-encadré ces travaux. Nos nombreuses discussions à propos de résultats d'expériences, sa grande disponibilité et son enthousiasme ont été des éléments clés de la réussite de cette thèse.

Je remercie Monsieur **Vincent Senez**, directeur de recherche CNRS à l'IEMN et responsable du groupe BioMEMS, pour m'avoir au sein du groupe qu'il amène scientifiquement et pour sa bonne humeur.

Merci à Monsieur **Maxime Harnois**, ingénieur de recherche CNRS, d'avoir apporté un support technique (mise en place d'expériences et procédé salle blanche) sans lequel ces travaux n'aurait pas eu autant de réussite.

Je remercie Monsieur **Alexis Vlandas**, chargé de recherche CNRS à l'IEMN, le dernier arrivé dans l'équipe BioMEMS, pour son aide et son expérience précieuse notamment pour la recherche de postdoc. Merci aussi pour toutes les discussions. 'Yatta'

Merci aux membres du groupe BioMEMS (**Philippe, Farida, Thomas, Timothée, Damien, Florian, Romuald, François, Chang, Magalie, Alfred et Sébastien**) et du groupe Nanobiointerface (**Sabine, Lionel, Alexandre, Wang Qi, Fatiha, Nazek, Mouna et Nadia**) pour les moments passés ensemble à discuter et pour leur gentillesse.

Je remercie aussi Monsieur **Bertrand Bocquet**, professeur des universités à l'université Lille1 et Monsieur **Nour-Eddine Bourzgui**, maître de conférence à l'université Lille1, pour m'avoir encadré lors de stage de recherche de master 2 et m'avoir incité à continuer dans le domaine des microsystèmes pour l'analyse biomédicale.

Merci à Monsieur **Anthony Treizebre**, maître de conférence à l'université Lille1, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et son inestimable expérience des procédés technologiques.

Je remercie aussi les différents collaborateurs du projet Plasmobio : **Serge, Cédric, Juriy, Karl et Caroline** de Liège, **Aurore, Olga, Rodica et Pascal** de Mons, **Edy, Sophie, Jérôme et Mohammed** de l'université de Lille 1, **Anne-Sophie et Pierre-Marie** de l'université de Lille 2 et **Léa et Alexandre** de Eurasanté, pour les moments passés lors des réunions techniques et du Workshop à Mons en Mai 2012.

Je remercie tous les personnels de la centrale de technologie de l'IEMN, notamment **André Leroy, Annie Fattorini, Jérôme Lemaître, Marc Dewitte, Christiane Legrand, Pascal Tilman, David Guérin, Dmitri Yareka, Christophe Boyaval, Jean-Louis Codron, Hermance**

*Desré, Nicolas Koslowski, Isabelle Roch-Jeune, Marc François, François Vaurette,...*, pour leur précieuse expérience des procédés technologies.

Voici un premier voyage de trois ans dans le monde de la recherche qui s'achève et qui ne se serait pas passé dans la même ambiance sans *Simon et Renaud*. Merci pour toutes les discussions scientifiques ou non et pour tous les bons moments passés ensemble.

Je remercie *Mes Parents* pour m'avoir soutenu et surtout supporté (!) durant toutes ces années. Merci beaucoup!

Enfin pour finir, je souhaite remercier *Hervé, Mathilde, Bruno et Alice* d'avoir été présents lors des moments difficiles de la vie sans eux je n'en serai pas là aujourd'hui.



## Sommaire

Remerciements .....	5
Introduction Générale.....	13
I. Interaction liquide/surface dans un système d'électromouillage sur diélectrique .....	17
Introduction .....	19
1.1. Le mouillage.....	20
1.1.1. Loi de Young-Dupré .....	20
1.1.2. Hystérésis de l'angle de contact .....	21
1.2. Electromouillage sur diélectrique.....	21
1.2.1. Equation de Lippmann-Young .....	21
1.2.2. Saturation de l'angle de contact .....	25
1.2.3. Système EWOD pour la microfluidique digitale .....	25
1.2.4. Applications .....	27
1.2.5. Principales limitations et solutions développées .....	28
1.2.6. Conclusion.....	30
1.3. Interaction liquide/surface des solutions d'oxyde de graphène avec des protéines ...	30
1.3.1. Propriétés de l'oxyde de graphène .....	31
1.3.2. Tensions de surface des solutions .....	33
1.3.3. Evaporation de gouttes .....	34
1.3.4. Mesure de l'hystérésis de l'angle de contact.....	37
1.3.5. Discussion .....	39
1.3.6. Conclusion.....	41
1.4. EWOD statique des solutions de GO et de BSA.....	41
1.4.1. Etude de la réversibilité du phénomène EWOD statique .....	42
1.4.2. Conclusion.....	45
Conclusion.....	46
Bibliographie .....	48
II. Surfaces superomniphobes à base de nanostructures de ZnO pour systèmes EWOD-SPR	53
Introduction .....	55
2.1. Mouillage sur surfaces rugueuses.....	56
2.1.1. Influence de la rugosité sur le mouillage.....	56
2.1.1.1. Etat de Wenzel.....	56
2.1.1.2. Etat de Cassie-Baxter .....	57
2.1.1.3. Transitions d'états et états intermédiaires .....	57
2.1.2. De superhydrophobe à superomniphobe .....	59
2.1.2.1. Surfaces superomniphobes .....	59
2.1.2.2. Structuration des surfaces.....	60

2.2. Synthèse chimique de nanostructures d'oxyde de zinc .....	63
2.2.1. Protocole expérimental.....	63
2.2.2. Influence du prétraitement.....	64
2.2.3. Dépôt de nanostructures de ZnO sur silicium .....	65
2.2.3.1. Influence de l'anion du sel de zinc .....	65
2.2.3.2. Influence de l'éthanolamine .....	68
2.2.3.3. Influence du temps de dépôt.....	70
2.2.4. Dépôt sur lame de verre.....	70
2.2.4.1. Influence de l'anion du sel de zinc .....	71
2.2.4.2. Influence de l'éthanolamine .....	72
2.2.4.3. Influence du temps de dépôt.....	74
2.2.5. Conclusion.....	74
2.3. Déposition du revêtement hydrophobe sur les nanostructures .....	75
2.3.1. Dépôt de fluoropolymère par plasma .....	76
2.3.2. Couche de perfluorosilane.....	76
2.4. Analyse XPS de la composition chimique des surfaces.....	78
2.4.1. Spectres globaux et composition atomique des surfaces.....	78
2.4.2. Spectre de haute résolution du carbone.....	81
2.4.3. Conclusion.....	83
2.5. Caractérisations des propriétés de mouillage .....	83
2.5.1. Angle de contact statique .....	84
2.5.2. Hystérésis de l'angle de contact .....	86
2.5.3. Discussion .....	87
2.5.4. Caractérisation microscopique de l'interaction liquide/surface .....	89
2.5.4.1. Piégeage de la ligne triple .....	89
2.5.4.2. Evaluation de la fraction de surface .....	90
2.5.5. Conclusion.....	92
Conclusion.....	94
Bibliographie.....	95
III. Applications de la résonance de plasmons de surface pour la biodétection dans un système EWOD .....	101
Introduction .....	103
3.1. Méthode de détection pour la protéomique.....	104
3.1.1. Introduction .....	104
3.1.2. Principe physique du plasmon de surface .....	107
3.1.3. Applications du SPR à la détection biologique.....	111
3.1.4. Conclusion.....	113
3.2. Système de microfluidique digitale par actuation EWOD .....	114

3.2.1. Tests de déplacement de solutions de BSA et de GO .....	114
3.2.2. Préservation de l'activité enzymatique en présence de GO lors du déplacement. ....	115
3.2.3. Conclusion.....	117
3.3. Détection SPR des protéines en présence du GO.....	118
3.3.1. Introduction .....	118
3.3.2. Comment désorber ?.....	118
3.3.3. Validation de la désorption par SPR .....	121
3.3.4. Conclusion.....	123
3.4. Détection SPR sur surfaces superomniphobes .....	124
3.4.1. Réalisation des ouvertures.....	125
3.4.2. Validation des ouvertures au moyen du banc SPR.....	128
3.4.3. Réalisation d'une cinétique .....	130
3.4.4. Conclusion.....	131
Conclusion.....	132
Bibliographie.....	134
Conclusion Générale et Perspectives .....	139
Annexes .....	143
1. Mesures des angles de contact.....	144
2. Synthèse et caractérisation de l'oxyde de graphène.....	145
3. Mesures de la tension de surface .....	146
4. Réalisation des capots EWOD et des capteurs SPR.....	146
5. Réalisation des bases EWOD .....	146
6. Spectroscopie de photoélectron X (XPS).....	148
7. Dispositif pour le déplacement EWOD.....	149
8. Dosage de l'activité enzymatique.....	150
9. Banc pour la résonance plasmonique de surface (SPR).....	150
Publications et Communications .....	152



# Introduction Générale

La santé est un enjeu sociétal majeur du fait de l'augmentation du nombre de cas concernant de nouvelles pathologies comme les cancers, les maladies neurodégénératives et des maladies chroniques nécessitant un suivi médical régulier comme le diabète. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux outils pour :

- Comprendre les mécanismes biologiques à l'origine de ces pathologies.
- Les détecter et diagnostiquer de manière précoce.
- Améliorer les traitements (ciblage des traitements pour limiter les effets secondaires).
- Assurer un suivi régulier du patient de manière délocalisée (point of care analysis).

Les laboratoires sur puce (labopuce, Lab-on-Chip) apparaissent comme une solution pertinente dans le cadre du développement de ces nouveaux outils. L'émergence de ces labopuces, véritables systèmes d'analyse concentrés sur quelques mm<sup>2</sup> a été possible du fait de l'avènement des micro- et nanotechnologies. Ils sont constitués d'une chaîne d'analyse, comme dans un laboratoire classique, obtenue par l'intégration de fonctions permettant :

- L'échantillonnage du prélèvement.
- Le transport des échantillons d'une zone fonctionnelle à une autre.
- La concentration, la séparation de molécules.
- L'analyse, la détection de molécules.

La miniaturisation des systèmes de diagnostic a permis d'envisager des analyses plus performantes, plus rapides, plus efficaces et plus sensibles. L'avènement de ces systèmes a largement été annoncé dès les années 90. Cependant, il existe encore de nombreux obstacles à leur déploiement à grande échelle du fait de l'absence de procédés standardisés au niveau technologique, d'une réponse non unique à l'ensemble des problématiques biologiques, d'une situation de quasi monopole de certaines grandes compagnies largement bénéficiaires sur ce marché, .... Malgré les différentes preuves de concept déjà apportées pour ces applications, la problématique majeure reste due à l'augmentation du ratio surface sur volume (S/V) : à l'échelle microscopique, les effets de surface deviennent prédominants par rapport aux effets de volume. Dans le cas des labopuces, ces effets de surface sont un avantage certain pour la bio détection par exemple (nano capteurs avec surface d'interaction importante). Cependant ils peuvent devenir problématiques : le contact entre le fluide contenant des molécules et la surface favorise une biopollution due à l'adsorption non spécifique ayant pour conséquences :

- La perte de biomolécules

- Pollution croisée
- Modification des propriétés de la surface
- Et même l'obstruction des canaux microfluidiques

Il est donc nécessaire de contrôler l'interface liquide/surface pour pouvoir limiter l'adsorption non contrôlée des biomolécules à la surface hors des zones d'analyse, puis de favoriser cette interaction sur la surface de bio détection.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés dans le cadre du projet européen Interreg IVa FW1.1.9. '*Plasmobio*' dont l'objectif est le développement de biocapteurs innovants basés sur la détection par résonance de plasmons de surface (SPR). Ce projet a réuni différents acteurs de la recherche et de sa valorisation en France et en Belgique selon des compétences spécifiques :

- ◆ Biologique : Centre Hospitalier Régional de Lille avec la plateforme d'interactions moléculaires et nanotechnologies (IFR114)
- ◆ Chimie de surface : Université de Mons, Laboratoire Interfaces et Fluides Complexes (INFLUX) et Université de Lille 1, Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI)
- ◆ Microfluidique digitale : Université de Lille 1, groupe BioMEMS de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN)
- ◆ Capteur optique : Université de Lille 1, Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (PhLAM), groupe Optoélectronique de l'IEMN et Université de Liège, laboratoire HOLOLAB et Centre Spatial de Liège (CSL).
- ◆ Valorisation : Université de Lille 2 ; Eurasanté

Le but de ce projet est de décupler les possibilités des capteurs basés sur la résonance de plasmons de surface ainsi que leur déploiement grâce à l'utilisation combinée de différentes filières microtechnologiques. Cette thèse s'est principalement intéressée à la partie microfluidique du projet : son objectif consiste à réaliser une plateforme microfluidique en goutte permettant le déplacement de protéines d'intérêt biologique choisies par les partenaires biologistes (Transferrine et Glucagon) et leur détection par résonance de plasmons de surface.

Le choix de la microfluidique en goutte se justifie par une diminution des volumes de liquide utilisé ainsi que le coût de l'analyse mais aussi par la possibilité d'avoir une plateforme réalisant des opérations microfluidiques de base et facilement reconfigurable à l'aide d'une interface logicielle. Bien que la microfluidique en goutte possède de nombreux avantages par rapport à la microfluidique continue, le principal obstacle à son développement massif et sa

forte sensibilité à la pollution de surface largement décrit dans la littérature et donc de l'impossibilité de déplacer des biomolécules en concentration importante.

Dès le début de ces travaux, nous nous sommes donc rapidement focalisés sur les problèmes de biopollution due aux interactions liquide/surface dans les systèmes microfluidiques. Ces travaux se sont inscrits dans la continuité de l'expertise sur les systèmes microfluidiques à base d'électromouillage-sur-diélectrique (EWOD) développée au sein du groupe BioMEMS de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) depuis le début des années 2000 avec les thèses successives de François Caron, Nicolas Verplanck et Florian Lapierre, mais aussi de l'expertise développée durant la thèse d'Elisabeth Galopin sur la résonance de plasmons de surface en collaboration avec le laboratoire PhLAM. Ces travaux ont également bénéficié de l'expertise en chimie de surface et en chimie des matériaux du groupe Nanobiointerfaces de l'IRI.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a consisté à :

- Elaborer de nouvelles stratégies afin d'éviter la biopollution des systèmes microfluidiques à base d'EWOD en contrôlant l'interaction surface/liquide, soit en maintenant les biomolécules en suspension dans la goutte à l'aide de nano-cargos (oxyde de graphène) ou en diminuant l'aire de contact entre le liquide et la surface par la réalisation de surfaces superomniphobes.
- Valider la compatibilité de ces solutions avec la résonance de plasmons de surface (SPR) servant à la fois de principe de détection de biomolécules mais aussi de moyen de caractérisation de l'interaction liquide/surface pour vérifier l'adsorption ou non des biomolécules dans la zone de détection.

Dans le premier chapitre, le principe de l'actionnement EWOD sera introduit dans le cas de liquides purs et conducteurs. Afin de dépasser les limitations de ce principe pour les liquides complexes (contenant des biomolécules), nous proposerons une solution originale utilisant des nanofeuillets d'oxyde de graphène absorbant les biomolécules et jouant le rôle de nano-cargos. L'influence de ces nanofeuillets sur les propriétés de mouillage et d'électromouillage de gouttes d'une solution de protéines sera étudiée à l'aide de plusieurs méthodes complémentaires.

Dans le chapitre II, nous présenterons une solution complémentaire développée pour limiter la biopollution par l'utilisation de surfaces superomniphobes. Ces surfaces seront réalisées par un dépôt chimique de nanostructures d'oxyde de zinc (ZnO). Les différents paramètres (composition chimique de la solution de dépôt, temps de dépôt,...) seront étudiés pour

observer leur influence sur les nanostructures. Après le dépôt de différentes couches hydrophobes, ces surfaces ont été caractérisées par une analyse par spectrométrie de photoélectrons X (XPS) et par une étude systématique des propriétés de mouillage (angle de contact et hystérésis de l'angle de contact) en fonction de la tension de surface. Pour conclure ce chapitre, nous observons la résistance de la surface à l'adsorption non-spécifique à l'aide d'une biomolécule fluorescente.

Finalement, dans le troisième et dernier chapitre, nous validerons la compatibilité de ces différentes solutions avec des méthodes de détection principalement basée sur la SPR. Dans un système microfluidique à base d'EWOD, nous montrerons que l'oxyde de graphène permet d'augmenter la concentration déplaçable de protéines tout en conservant son activité biologique. Ces propriétés étant dues au maintien des protéines en suspension par l'oxyde de graphène, la détection par SPR nécessitera la désorption contrôlée des protéines de l'oxyde de graphène. Pour les surfaces superomniphobes, la réalisation d'ouvertures dans les nanostructures sera effectuée afin de pouvoir utiliser la SPR.

# **I. Interaction liquide/surface dans un système d'électromouillage sur diélectrique**



## Introduction

Dans un supplément intitulé « *when microfluidic devices go bad* » paru dans la revue *Analytical Chemistry* en 2005, Rajendrani Mukhodpadhyay aborde la problématique du « *fouling* » ou pollution dans les systèmes microfluidiques [11]. Ce phénomène existant à l'échelle macroscopique devient un problème majeur dans les systèmes miniaturisés. En effet, la miniaturisation a permis de diminuer les volumes de réactifs, les temps de réaction, etc... mais aussi d'augmenter le ratio surface sur volume. Ce dernier est la cause principale de la perte de réactifs qui s'adsorbent sur les surfaces pouvant amener à une baisse de fiabilité au cours de l'utilisation sur de longues périodes, à rendre les systèmes inutilisables ou même à fausser les mesures. Il s'avère donc nécessaire de mettre au point des méthodes pour éviter cette pollution de surface par l'utilisation de protocoles de nettoyage qu'ils soient chimiques ou mécaniques.

Ce premier chapitre traitera donc de cette pollution (dépôt non contrôlé) par les biomolécules dans les systèmes microfluidiques digitaux (gouttes sur surface plane). Pour introduire cette problématique, le phénomène physique à la base du déplacement fluide étudié sera présenté. Il s'agira de développer les concepts de mouillage et d'électromouillage sur diélectrique (EWOD). Le principe de déplacement de goutte par effet EWOD sera présenté ainsi que ses principales limitations et les solutions apportées dans la littérature.

Ensuite, une nouvelle stratégie sera présentée afin de réduire la pollution de surface. Cette approche est basée sur l'utilisation de nano-feuillets d'oxyde de graphène (GO) comme nano-convoyeurs de protéines. L'albumine sérique bovine (Bovine Serum Albumin, BSA) connue pour sa forte adhésion aux surfaces sera utilisée comme biomolécule modèle. L'interaction entre le GO et la BSA sera illustrée au moyen de la caractérisation des propriétés de mouillage. Les mesures de tensions de surface, des hystérésis de l'angle de contact mais aussi des évolutions de l'angle de contact au cours de l'évaporation permettront d'évaluer l'influence du GO sur l'adsorption des biomolécules. Les propriétés de ces solutions seront étudiées sous électromouillage sur diélectrique en mode statique.

## 1.1. Le mouillage

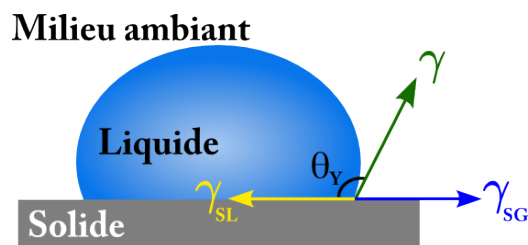
Le mouillage peut être défini comme la capacité d'un liquide à s'étaler sur une surface solide. Selon De Gennes *et al.* [I2], le mouillage est « l'étude de l'étalement d'un liquide déposé sur un substrat solide (ou liquide) ». Trois différentes formes de mouillage existent :

- le mouillage total : la surface est totalement recouverte d'un film liquide.
- le mouillage partiel : le liquide forme une calotte sphérique.
- le non-mouillage : le liquide démouille totalement la surface et forme une sphère parfaite.

Compte tenu des applications envisagées dans le cadre de cette thèse, il sera principalement question de mouillage partiel dans ce chapitre I. Cependant des solutions pour tendre vers des situations de non-mouillage seront présentées dans le chapitre II.

### 1.1.1. Loi de Young-Dupré

L'angle de contact formé par une goutte sur une surface plane est appelé angle de Young  $\theta_Y$ . Cet angle résulte d'un équilibre formé par les forces capillaires agissant à la ligne de contact ou ligne triple (frontière à l'interface solide-liquide-milieu ambiant) représentées sur la Figure 1. Ces forces capillaires, appelées tensions de surface, sont issues d'un équilibre thermodynamique de chaque interface. Elles sont exprimées en  $J.m^{-2}$  ou  $N.m^{-1}$ .



**Figure 1:** Schéma représentant une situation de mouillage partiel

A l'équilibre, l'équation (1) donne la valeur de l'angle d'Young en fonction des tensions de surface  $\gamma_{SG}$  (interface solide-milieu ambiant),  $\gamma_{SL}$  (interface solide-liquide) et  $\gamma$  (interface liquide-milieu ambiant).

$$\cos \theta_Y = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma} \quad (1)$$

Cette équation est obtenue par projection des tensions de surface sur la ligne de base (ligne confondue avec l'interface liquide/solide). L'angle d'Young n'est qu'une valeur idéale de l'angle de contact statique. En effet les surfaces présentent souvent des hétérogénéités soient chimiques ou physiques modifiant cette valeur.

### 1.1.2. Hystérésis de l'angle de contact

Dans le cas de surfaces non parfaites, des défauts d'origine chimique ou physique entrent en jeu. Ces défauts vont avoir pour effet de créer un déséquilibre thermodynamique du liquide et d'accrocher plus fortement la ligne triple à la surface. Cette adhésion peut être évaluée par la mesure de l'hystérésis de l'angle de contact.

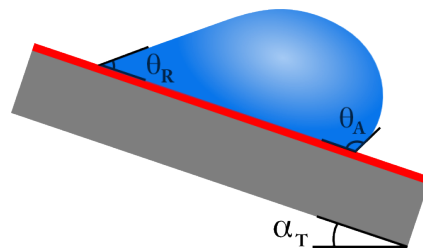


Figure 2: Schéma représentant une goutte sur un plan incliné

L'hystérésis de l'angle de contact  $\Delta\theta$  est définie comme la différence entre l'angle d'avancé  $\theta_A$  et l'angle de recul  $\theta_R$ , définis comme les angles de contact avant le décrochage de la ligne triple. Dans notre cas, ces angles seront déterminés par inclinaison de la surface sur laquelle est déposée une goutte (Figure 2). Dans cette thèse, les mesures des tensions de surface et des angles de contact seront effectuées à l'aide d'un goniomètre DSA100 (Krüss GmbH, Allemagne) dont le principe de fonctionnement est détaillé en Annexe 1.

## 1.2. Electromouillage sur diélectrique

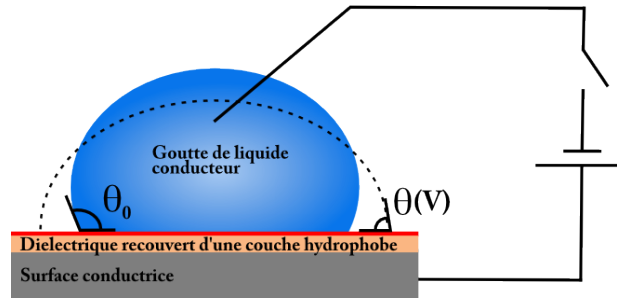
L'électromouillage est un phénomène physique ayant pour effet la diminution de l'angle de contact d'une goutte sur une surface par l'application d'une différence de potentiel entre le liquide et la surface.

### 1.2.1. Equation de Lippmann-Young

Ce phénomène a été observé et étudié par Gabriel Lippmann [13] lors de ses travaux en 1875 sur la relation entre les phénomènes électriques et capillaires. Il a ainsi observé la création d'une force électromotrice à l'interface mercure/électrolyte due à l'application d'un potentiel électrique. En 1993, l'idée introduite par Bruno Berge est de placer une couche diélectrique et hydrophobe à l'aide d'un polymère entre la surface et le liquide conducteur. L'ajout de cette couche présente un double avantage : (i) éliminer l'électrolyse de liquide par l'isolation de l'interface liquide/électrode (aspect diélectrique de la couche), (ii) limiter l'hystérésis de la surface afin de favoriser la réversibilité de la modification de l'angle de contact (aspect hydrophobe de la surface). Ce type de système a été baptisé « Electrowetting-on-dielectric »

(EWOD, électromouillage sur diélectrique) par C.J. Kim de l'université de Californie à Los Angeles (UCLA) [I4, I5].

La Figure 3 illustre un système d'électromouillage sur diélectrique statique. Au départ, la goutte possède un angle de contact  $\theta_0$  avec la surface. Quand une tension est appliquée, la goutte de liquide conducteur est déformée prenant la forme en pointillés et forme un angle de contact  $\theta(V)$  avec la surface.



**Figure 3: Schéma d'un système d'électromouillage sur diélectrique**

Historiquement, différentes approches théoriques ont été développées pour expliquer ce phénomène [I6]. Dans ces approches, le liquide utilisé est considéré comme un conducteur parfait et la couche diélectrique hydrophobe est considérée comme inerte.

Dans l'approche thermodynamique et électrochimique, le phénomène d'EWOD se justifie par une modification de la tension de surface solide/liquide due à l'accumulation de charges électriques (effet capacitif). La tension de surface liquide/solide devient une tension de surface effective qui décroît quand la tension appliquée augmente (Equation 2).

$$\gamma_{SL}^{eff} = \gamma_{SL} - \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{2d} V^2 \quad (2)$$

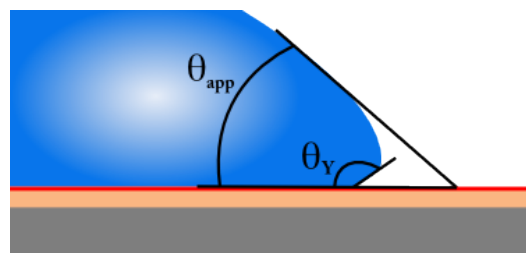
Dans l'équation (2),  $\gamma_{SL}$  est la tension de surface de l'interface solide/liquide,  $\epsilon_0$  la permittivité du vide ( $8,85 \cdot 10^{-12}$  F/m),  $\epsilon_r$  la permittivité relative du diélectrique,  $d$  l'épaisseur du diélectrique et  $V$  la tension efficace appliquée. En intégrant cette tension de surface effective dans l'équation de Young, on obtient :

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} + \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{2d} V^2 = \gamma \cos \theta(V) \quad (3)$$

L'équation (3) réécrite sous la forme suivante est appelée équation de Lippmann-Young :

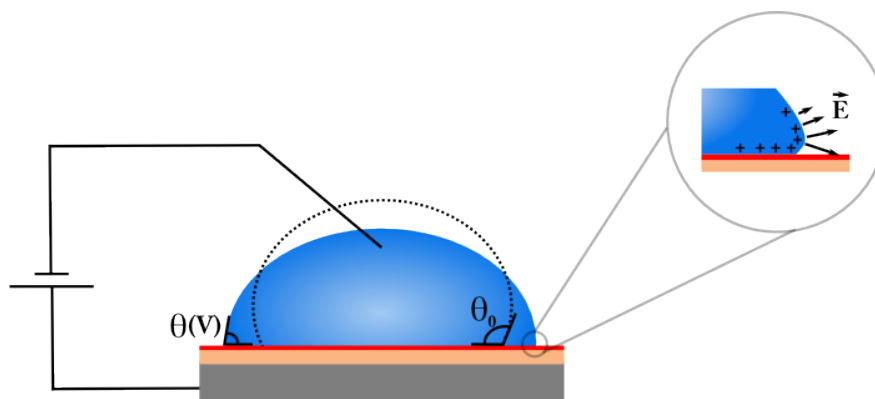
$$\cos \theta(V) = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma} + \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{2d\gamma} V^2 = \cos \theta_Y + \eta \quad (4)$$

Mugele et Baret [I6] introduisent dans l'équation (4) le nombre sans dimension  $\eta$ , appelé nombre d'électromouillage, qui est le rapport entre les forces d'origine électrostatique et les forces d'origine capillaire. Cette approche, basée sur la modification de la tension de surface, permet d'obtenir la valeur de l'angle de contact en fonction de la tension appliquée. Cependant, des observations menées par Mugele et Buerhle [I7] puis par Lapiere *et al.* [I8] contredisent en partie cette approche : seul l'angle apparent (angle macroscopique,  $\theta_{app}$ ) est modifié, l'angle d'Young est constant. Expérimentalement, l'angle microscopique, angle d'Young, reste constant quelque soit la tension appliquée comme cela est illustré par la Figure 4.



**Figure 4:Schéma représentant la ligne triple lors de l'électromouillage**

Or l'approche théorique précédente relie uniquement la variation de l'angle de contact apparent à la tension électrique appliquée mais ne permet pas d'avoir une vision localisée des forces mises en jeu. Les travaux menés par Kang [I9] et Jones [I10] ont décrit les forces s'exerçant sur la goutte par une approche électromécanique du phénomène EWOD. Le liquide étant considéré comme un conducteur parfait et une électrode formant la capacité du système EWOD, le champ électrique est donc nul dans la goutte et les charges électriques s'accumulent aux interfaces. Au niveau de la ligne triple (interfaces liquide/solide et liquide/milieu ambiant), le champ électrique dû aux charges accumulées est intense (voir la Figure 5).



**Figure 5:Schéma d'un dispositif EWOD statique avec un zoom sur la ligne triple (inspiré de [I11])**

De plus, le champ électrique est normal aux interfaces liquide/solide et liquide/milieu ambiant. En intégrant le tenseur des contraintes de Maxwell au niveau de la ligne triple, Kang [19] montre que la force électrique par unité de longueur  $F_e$  possède deux composantes,  $F_{ex}$  (horizontale) et  $F_{ey}$  (verticale), décrites dans l'équation (5).

$$F_{ex} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r V^2}{2d} \text{ et } F_{ey} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r V^2}{2d} \cot \theta \quad (5)$$

Les deux composantes sont inversement proportionnelles à l'épaisseur du diélectrique et proportionnelles à la tension au carré. Néanmoins, seule la composante horizontale est indépendante de l'angle de contact et est responsable de la modification de l'angle de contact apparent. En réécrivant l'équilibre de forces sur l'axe horizontal, on obtient :

$$\gamma_{SL} + \gamma \cos \theta = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r V^2}{2d} + \gamma_{SG} \quad (6)$$

En isolant le terme  $\cos \theta$ , on trouve l'équation de Lippman-Young :

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma} + \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r V^2}{2\gamma d} \quad (7)$$

Bien que Kang ait montré le lien entre distribution des charges et composante horizontale du tenseur de Maxwell par une approche mécanique, ces études n'ont pas permis de décrire le profil de la goutte à l'équilibre entre la pression capillaire (pression de Laplace) et la pression électrostatique. Buehrle *et al.* [112] ont étudié par un calcul numérique, la distribution du champ électrique et le profil de la goutte soumise à l'électromouillage. A l'échelle microscopique, leurs résultats montrent que la déformation de la goutte ne dépend pas de la tension appliquée et que l'angle n'est pas modifié et correspond à l'angle d'Young. Au-delà d'une distance à la surface équivalente à l'épaisseur du diélectrique, la courbure de la goutte est modifiée et l'angle de contact macroscopique est égal à l'angle prédit par l'équation de Lippmann-Young.

Les deux approches présentées précédemment permettent alors de relier la modification de l'angle de contact apparent à la valeur de la tension appliquée grâce à l'équation de Lippmann-Young. Si l'approche énergétique permet d'avoir une vision globale, seule l'approche électromécanique permet d'expliquer les forces à l'origine du phénomène lors de l'application d'une tension et la non modification de l'angle d'Young.

### 1.2.2. Saturation de l'angle de contact

D'après l'équation de Lippmann-Young, l'angle de contact diminue quand la tension augmente, jusqu'à tendre vers  $0^\circ$  *i.e.* quand le liquide mouille totalement la surface. Cependant, ce cas n'est jamais observé expérimentalement car il y a un phénomène de saturation de l'angle de contact qui intervient à partir d'une tension limite. Différentes explications ont été avancées afin de comprendre ce phénomène :

- Piégeage de charges dans ou sur la couche diélectrique [I13],
- Ionisation de l'air au niveau de la ligne triple [I14],
- Instabilité de la ligne de contact [I14],
- Fuites au niveau du diélectrique [I15],
- Annulation de la tension de surface liquide/solide [I16].

A l'heure actuelle, aucune des explications proposées ne semble faire consensus dans la communauté de l'électromouillage. L'explication de la saturation est encore un sujet de débat. Dans le cadre de ce travail, les tensions d'actuation EWOD utilisées sont inférieures à la tension de saturation.

### 1.2.3. Système EWOD pour la microfluidique digitale

L'utilisation du principe d'EWOD dans un dispositif pour la microfluidique en goutte a été proposée par Washizu [I17]. Ce dernier présente un système d'électrodes pour le déplacement et le mélange de gouttes. Parmi les différentes configurations possibles, la majorité des dispositifs développés pour les applications laboratoire-sur-puce peuvent se résumer au schéma du dispositif présenté sur la Figure 6.

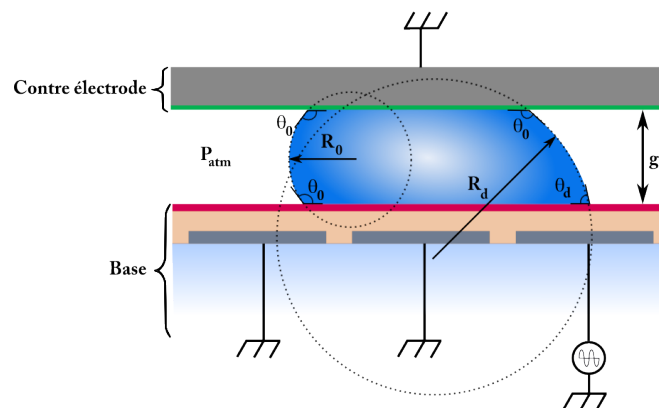
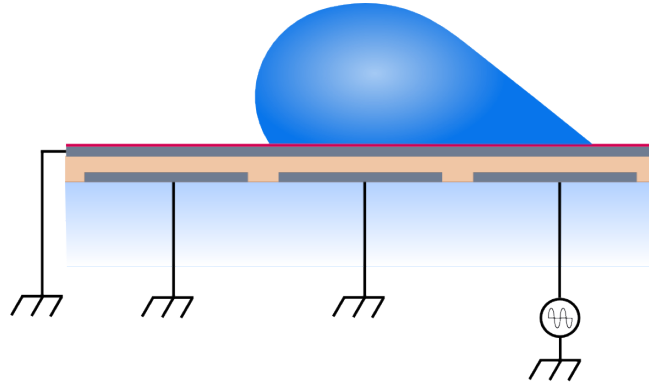


Figure 6: Schéma de principe d'un déplacement de goutte par EWOD

La partie supérieure, appelée contre-électrode, permet d'effectuer la mise à la masse de la goutte. Cet élément n'est pas essentiel car la mise à la masse peut être réalisée au niveau de la

partie inférieure *i.e.* sur la base EWOD [I18] comme cela est montré sur la Figure 7. Cependant, la configuration avec contre-électrode est plus avantageuse car elle permet d'utiliser la surface supérieure comme biocapteur et son utilisation permet de réduire le taux d'évaporation [I19]. Le principe du déplacement est basé sur l'activation localisée de la force  $F_{ex}$  induite par l'application d'une tension sur l'électrode. La réalisation d'un réseau d'électrodes situé sous la couche diélectrique et la couche hydrophobe permet d'activer les électrodes.



**Figure 7:Schéma d'un dispositif EWOD sans contre-électrode**

L'activation d'une électrode située au-dessous de la goutte permet d'appliquer sur la goutte une force dissymétrique d'origine électromécanique. Pour réaliser le déplacement de la goutte, cette force appelé  $F_{ex}$  (Equation 5) doit être supérieure aux forces de rétention s'opposant au mouvement de la goutte dues à l'hystérésis des deux surfaces (base et contre-électrode).

L'expression de ces forces de rétention  $F_r$  est donnée dans l'équation (8).

$$F_r = 2\gamma(\cos\theta_r - \cos\theta_a) \quad (8)$$

La force  $F_{ex}$  devant être supérieure à la force  $F_r$ , on peut isoler la tension  $V$  dans l'inégalité  $F_{ex} > F_r$ .

$$V_{min} = \sqrt{\frac{4\gamma d}{\epsilon_0 \epsilon_r} (\cos\theta_r - \cos\theta_a)} \quad (9)$$

Il existe donc une tension minimale  $V_{min}$  autorisant le déplacement d'une goutte dans un système EWOD avec contre-électrode (Equation 9).

#### 1.2.4. Applications

Le phénomène d'électromouillage sur diélectrique est déjà à l'origine de différents systèmes pour des applications bien distinctes. Historiquement, les premiers systèmes développés concernent les domaines de l'optique et de la microfluidique.

Dans le domaine optique, de nombreuses applications ont été réalisées comme des systèmes d'affichage [I20, I21] mais aussi des microlentilles. Ces applications résultent principalement du changement de la courbure de la goutte par effet EWOD permettant notamment une modification de la distance focale [I22] pour les microlentilles. Ces systèmes optiques, qui ont connu une maturation relativement rapide à travers la création de sociétés comme Varioptic<sup>1</sup> (créée par Bruno Berge) en France ou bien Optilux Inc.<sup>2</sup> aux Etats-Unis, sont déjà commercialisés. Les dispositifs d'affichage (e-paper, papier électronique) ont été réalisés à partir des travaux effectués par Hayes et Feenstra [I20]. Dans ces dispositifs, chaque pixel est constitué d'un élément EWOD. Ces travaux réalisés au sein du centre de recherche de Philips à Eindhoven, ont donné lieu à la création d'une spin-off Liquavista<sup>3</sup> qui a été rachetée en 2010 par Samsung pour développer de nouvelles technologies d'affichage à base d'EWOD.

En microfluidique, les travaux de Washizu ont entraîné de nouvelles perspectives de développement de systèmes en gouttes pour des applications de type laboratoire-sur-puce (labo-puce, Lab-on-Chip en anglais). Plusieurs groupes de recherche dans le monde ont exploré cette voie notamment celui de CJ Kim à l'UCLA [I23], de Fair à l'université de Duke [I24], de Wheeler à l'université de Toronto [I25] mais aussi en France principalement au CEA LETI à Grenoble [I26], au LAAS à Toulouse [I27] et à l'IEMN [I28]. Ces applications, qui ont eu une maturation beaucoup plus lente que les applications optiques, commencent cependant à être commercialisées par la société Advanced Liquid Logic<sup>4</sup> issue des travaux de Fair et Pollack. Néanmoins ces systèmes ne sont commercialisés que pour des applications spécifiques comme la création de bibliothèques d'ADN et l'analyse d'enzyme lysosomale et sont utilisés pour des fins de recherche et non de diagnostique. Il existe encore à ce jour de nombreuses limitations des systèmes EWOD pour les applications de type labopuce que nous détaillerons plus loin.

Ces deux applications du phénomène EWOD ont été les principales voies de recherche. Cependant, Krupenkin et Taylor ont récemment proposé une nouvelle application de l'EWOD pour la récupération d'énergie [I29]. Ces travaux sont basés sur l'effet EWOD inverse. Sous

---

<sup>1</sup> Site web : <http://www.varioptic.com/> consulté le 2/08/12

<sup>2</sup> Site web : <http://optilux.com/> consulté le 2/08/12

<sup>3</sup> Site web : <http://www.liquavista.com/> consulté le 12/09/2012

<sup>4</sup> Site web : <http://www.liquid-logic.com> consulté le 30/07/12

l'effet d'une action mécanique (compression, cisaillement,...), le déplacement d'une goutte de liquide conducteur dans un dispositif EWOD, maintenue sous une tension de polarisation, entraîne un déplacement de charges électriques et donc génère un courant. Les performances annoncées pourraient atteindre des puissances jusqu'à  $10^3 \text{W.m}^{-2}$ .

### 1.2.5. Principales limitations et solutions développées

L'objet de cette thèse étant l'utilisation d'un système EWOD afin de réaliser un labopuce, les principales limitations des systèmes EWOD pour ces applications seront donc ici présentées ainsi que les solutions pour les pallier. Le phénomène physique de l'EWOD est bien décrit dans la littérature pour des fluides purs conducteurs. Cependant, les fluides utilisés dans des laboratoires sur puce sont des fluides complexes notamment à cause de la présence d'ions et de macromolécules (protéines). Il existe deux problèmes majeurs, non-pris en compte dans la théorie de l'électromouillage, limitant les systèmes :

- La présence nécessaire de sels dans les solutions biologiques pouvant entraîner, aux fortes tensions, une migration des ions à travers la couche diélectrique causant ainsi son claquage.
- L'adsorption de biomolécules (comme des protéines) sur la surface hydrophobe entraînant une perte de molécules à analyser et dans le pire des cas, un piégeage irréversible de la ligne triple rendant tout déplacement impossible.

Des solutions ont été développées dans la littérature pour remédier à ces problèmes.

Les propriétés de migration des ions de solutions salées au travers d'une couche diélectrique recouverte d'une couche hydrophobe ont été étudiées par Raj *et al.* [I30]. Une étude du comportement de matériaux diélectriques pour l'électromouillage sur diélectrique a été effectuée par Liu *et al.* [I31]. A l'heure actuelle, deux aspects sont mis en avant pour éviter la problématique de claquage du diélectrique :

- *Aspect matériau* : l'utilisation de Parylène est la principale solution retenue du fait de son faible coût, sa facilité de déposition mais principalement parce qu'il s'agit d'un matériau extrêmement inerte.
- *Aspect tension appliquée* : l'effet EWOD étant dû à une accumulation de charges à une interface type conducteur/diélectrique, l'application d'une tension alternative (AC) plutôt qu'une tension continue (DC) permet d'avoir des cycles de charge et de décharge suffisamment rapides pour éviter une trop forte accumulation. Il est donc nécessaire d'appliquer une fréquence minimale. Cependant, Li et Mugele [I32] ont démontré que les tensions AC permettent de réduire les effets d'hystérésis de l'angle

de contact grâce à des phénomènes d'oscillation basse fréquence de la ligne triple. De plus, la fréquence de travail ne doit pas être trop élevée (<10kHz) afin que la goutte puisse être considérée comme un conducteur parfait. La fréquence de travail doit donc être optimisée selon ces différentes observations. Les travaux de thèse de François Caron (IEMN) ont montré qu'à une fréquence de 1kHz, l'effet d'électromouillage est le plus important et que la goutte reste conductrice. C'est cette fréquence qui sera utilisée pour le signal EWOD dans cette thèse.

Concernant l'adsorption de biomolécules sur les surfaces, il y a dans la littérature, trois principales stratégies pour résoudre ce problème:

- la méthode développée par Fair *et al.* consiste à réaliser un système EWOD dont le milieu ambiant est de l'huile de silicone (système biphasique eau/huile). Elle permet le déplacement de liquides biologiques purs comme du sang, de l'urine, de la salive, etc [I33], évite la contamination des surfaces et limite l'évaporation. La présence d'huile permet aussi une lubrification des surfaces diminuant la tension d'actuation et augmentant la vitesse de déplacement. Cependant, cette technique crée une fine couche d'huile (~10-20nm) entre la surface et la goutte [I34]. Celle-ci ne permet pas alors d'utiliser la surface comme un biocapteur et limite cette méthode aux détections optiques au sein même du liquide. De plus, il peut apparaître des effets de diffusion des biomolécules de la phase aqueuse vers la phase organique (huile).
- une méthode similaire à la précédente a été proposée par Brassard *et al.* [I35]. La goutte d'eau est encapsulée par une fine couche d'huile. Cette méthode permet de diminuer encore la tension d'actuation et d'augmenter la vitesse de déplacement par rapport à un système entièrement dans l'huile. Fan *et al.* [I36] ont repris ces travaux et montré qu'une désencapsulation de ces gouttes est possible. Cette technique réduit la biopollution de surface et permet un déplacement d'albumine sérique bovine (BSA) marquée avec un fluorophore. Dans ce cas, il y a encore un phénomène de lubrification ne permettant pas d'utiliser la surface comme un biocapteur. Elle peut néanmoins être utilisée comme biocapteur après la désencapsulation qui nécessite, cependant, l'utilisation d'hexane pouvant dénaturer les protéines ajoutant une étape supplémentaire dans l'utilisation du système.
- la dernière méthode proposée par Wheeler *et al.* consiste à ajouter un surfactant dans la goutte avec pour milieu ambiant de l'air. Le surfactant utilisé est le Pluronic® qui est un polymère formé de deux blocs de polyéthylène glycol entourant un bloc de polypropylène glycol. Le surfactant possède un aspect amphiphile et vient former une

micelle autour de la goutte évitant ainsi un contact entre les biomolécules et la surface. L'utilisation de Pluronic<sup>®</sup> permet d'augmenter la concentration de protéines déplaçables [I37] mais aussi d'être compatible avec la culture cellulaire [I38]. Cependant, le surfactant diminue la tension de surface de la goutte et son angle de contact statique (80°). Le déplacement des gouttes nécessite donc une plus forte tension d'actuation (épaisseur du diélectrique : 7µm en parylène, signal appliquée : 200V<sub>pp</sub>, 5 kHz). De plus, cette solution n'est pas compatible avec certaines méthodes de détection et d'analyse comme la spectrométrie de masse : le polymère amène à l'apparition des pics parasites, un bruit de fond important et une baisse de la sensibilité entre autre.

### **1.2.6. Conclusion**

Le principe de l'électromouillage-sur-diélectrique permet de moduler l'angle de contact apparent d'une goutte sur une surface. Ce phénomène est déjà utilisé pour diverses applications notamment pour la partie microfluidique en goutte dans les laboratoires sur puce. Cependant, il existe à ce jour de fortes limitations. Chacune des solutions présentées précédemment n'est valable que pour certains types de détection (optique dans le cas des systèmes utilisant de l'huile, pas d'analyse par spectrométrie de masse dans le cas du surfactant). De plus, elles complexifient la technologie à mettre en œuvre pour la réalisation (notamment l'étanchéité des dispositifs doit être assurée pour les systèmes avec huile). Globalement, toutes les méthodes utilisées consistent à venir contrôler l'interface liquide/milieu ambiant.

Dans la suite de ce chapitre, nous présenterons une méthode originale afin de limiter la pollution des surfaces. Nous proposons, pour la première fois, d'utiliser des nanofeuillets d'oxyde de graphène (GO) sur lesquels les protéines vont s'adsorber. Ceci permettra de maintenir les protéines, adsorbées sur le GO, en suspension au sein de la goutte et par conséquent de limiter leur adsorption sur la surface. Cette propriété sera étudiée par l'observation de l'interface liquide/surface des solutions de GO et de protéines, lors de l'évaporation et de l'électromouillage statique pour caractériser la dynamique de la ligne triple.

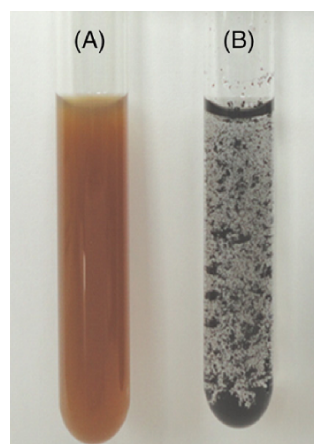
## **1.3. Interaction liquide/surface des solutions d'oxyde de graphène avec des protéines**

Dans cette partie, l'étude de l'interaction entre des solutions contenant de l'oxyde de graphène (GO) et une surface hydrophobe sera présentée. Tout d'abord, les propriétés spécifiques à

l'oxyde de graphène, justifiant son utilisation comme nano-transporteur pour les protéines, seront introduites. Ensuite, des protéines seront mélangées aux solutions de GO. La protéine retenue pour cette étude est l'albumine sérique bovine (Bovine Serum Albumin, BSA). Ce choix est justifié notamment par ses propriétés amphiphiles, à cause de sa forte adhésion sur tous les types de surfaces notamment hydrophobes. Le cas étudié ici est donc un cas extrêmement défavorable. Les différentes solutions de BSA et de BSA/GO sont préparées préalablement dans des microtubes et mélangées au vortex afin d'obtenir une solution homogène. La tension de surface de ces solutions de GO et de BSA sera mesurée pour avoir une première information sur l'interface air/liquide de ces solutions. Ensuite, la dynamique de la ligne triple de gouttes de ces solutions sera étudiée au travers de deux méthodes : l'évaporation et l'hystérésis de l'angle de contact. Une discussion de ces différents résultats sera effectuée pour conclure.

### 1.3.1. Propriétés de l'oxyde de graphène

L'attribution en 2010 du prix Nobel de Physique à Andre Geim et Konstantin Novoselov pour « leurs expériences révolutionnaires sur les matériaux bidimensionnels en graphène »<sup>5</sup>, a été le point d'orgue des travaux de recherche sur le graphène. Ceci est principalement dû à ses remarquables propriétés physiques et chimiques [I39, I40]. Cependant, les feuillets de graphène sont hydrophobes à cause de leur nature entièrement carbonée et ne sont pas solubles dans des solutions aqueuses. Le composant oxydé dérivé du graphène, l'oxyde de graphène (GO) est, contrairement au graphène, dispersable en milieu aqueux [I-41]. Cet effet est représenté sur la Figure 8 avec à droite une solution de GO en milieu aqueux homogène et à gauche une solution de GO réduit à l'hydrazine qui forme des agrégats et précipite.



**Figure 8: Solution de GO en milieu aqueux (A) et de GO réduit dans l'hydrazine 24h à 100°C (B) (tiré de [I42])**

<sup>5</sup> [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/2010/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2010/) consulté le 31/07/12

De plus, l'oxyde de graphène présente la particularité de créer de nombreuses liaisons chimiques grâce à ses groupements oxygénés. Ces liaisons ainsi que leur énergie sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (Tableau 1) tiré de [I43].

Type d'interaction ou de liaison	Energie (kJ.mol <sup>-1</sup> )
Liaison hydrogène	10-65
Interaction dipôle-dipôle	5-50
Interaction $\Pi-\Pi$	0-50
Interaction hydrophobe	<5

**Tableau 1: Types d'interactions ou de liaisons entre molécules et leurs énergies respectives**

D'après ces différentes propriétés, on peut donc constater que l'interaction entre oxyde de graphène et protéine dépendra de différents facteurs:

- du degré d'oxydation du graphène (pour les liaisons hydrogène et dipôle-dipôle).
- du pH de la solution de travail qui permet la protonation et la déprotonation des groupements C-OH en fonction de leur pKa (constante de dissociation acide, perte du proton H<sup>+</sup>), et influe sur les liaisons électrostatiques.
- de l'hydrophobicité de la protéine (acide aminé apolaire) qui influe sur les interactions hydrophobes.
- de la présence de cycles aromatiques (interactions  $\Pi-\Pi$ ).

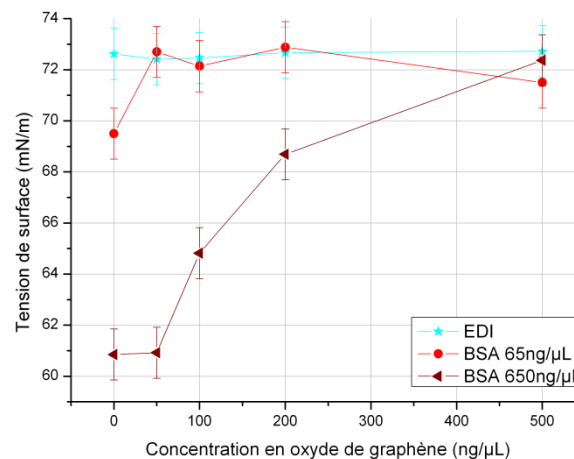
Ces interactions permettent à l'oxyde de graphène d'être un support d'adsorption intéressant pour l'enrichissement et la séparation de protéines comme l'hémoglobine en fonction des interactions GO/protéines [I44], la détection par fluorescence [I45] et l'enrichissement en protéine (Cytochrome C, Cyt C) pour l'analyse en spectrométrie de masse [I46]. Les auteurs de ce dernier article, Tang *et al.* [I46], démontrent, à l'aide d'une spectroscopie par dichroïsme circulaire, que le Cyt C adsorbé sur le GO n'est pas dénaturé. De plus, il quantifie la quantité de Cyt C adsorbé sur le GO à 1,1g pour 1g de GO. Enfin, un autre atout de l'oxyde de graphène est d'améliorer dans certains cas la sensibilité de la technique d'analyse utilisée [I45, I47].

Ces différents exemples montrent l'intérêt d'utiliser du GO pour de l'analyse ou de la détection, du fait de ses fortes propriétés d'adsorption de protéines. Les nanofeuillets d'oxyde de graphène apparaissent donc comme un moyen particulièrement intéressant en microfluidique pour transporter les biomolécules par leur adsorption et ainsi limiter la

pollution des surfaces. Cette application du GO n'a pour l'instant pas été évoquée dans la littérature. Les solutions d'oxyde de graphène utilisées durant cette thèse, sont fournies et synthétisées par Manash R. Das, Chercheur au NEIST CSIR en Inde, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe NanoBioInterfaces de Rabah Boukherroub de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI). La méthode utilisée pour la synthèse de l'oxyde de graphène [I48] est dérivée de la méthode de Hummers [I49] couramment employée. Une caractérisation des nanofeuillets de GO utilisés dans ces travaux a été effectuée par Fellahi *et al.* [I50]. La méthode de synthèse et les caractérisations du GO sont détaillées en Annexe 2.

### 1.3.2. Tensions de surface des solutions

Afin d'avoir une première information sur le mouillage des solutions de GO et de BSA, la tension de surface est mesurée par la méthode de la goutte pendante (détails en Annexe 3) avec le goniomètre DSA100 (Krüss GmbH, Allemagne). Ces résultats présentés sur la Figure 9 montrent l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration en oxyde de graphène pour des solutions d'eau désionisée (EDI) et de BSA à des concentrations de 65ng/μL et 650ng/μL. Dans le cas des solutions contenant uniquement de l'oxyde de graphène, la tension de surface reste constante et ne varie quasiment pas par rapport à celle de l'EDI ( $\sim 72,6 \text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ), quelque soit la concentration en GO.



**Figure 9: Evolution de la tension de surface de solutions aqueuses de BSA en fonction de la concentration en oxyde de graphène**

Pour des solutions de BSA sans GO, la tension de surface diminue fortement quand la concentration en BSA augmente ( $\sim 69 \text{mN}/\text{m}$  pour 65ng/μL et  $\sim 61 \text{mN}/\text{m}$  pour 650ng/μL). Par contre l'introduction de GO influe nettement sur la tension de surface : Pour une concentration de 65ng/μL de BSA, la tension de surface est identique à l'EDI ( $\sim 72 \text{mN}/\text{m}$ ), en présence d'une faible concentration de GO (50ng/μL) puis reste quasiment constante malgré

l'augmentation continue de la concentration de GO. Pour une concentration importante en BSA (650ng/ $\mu$ L), la tension de surface sans GO, est identique à celle obtenue avec 50ng/ $\mu$ L de GO (60,8mN/m). Ensuite, elle n'atteint la tension de surface de l'EDI que pour 500ng/ $\mu$ L de GO.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces constatations :

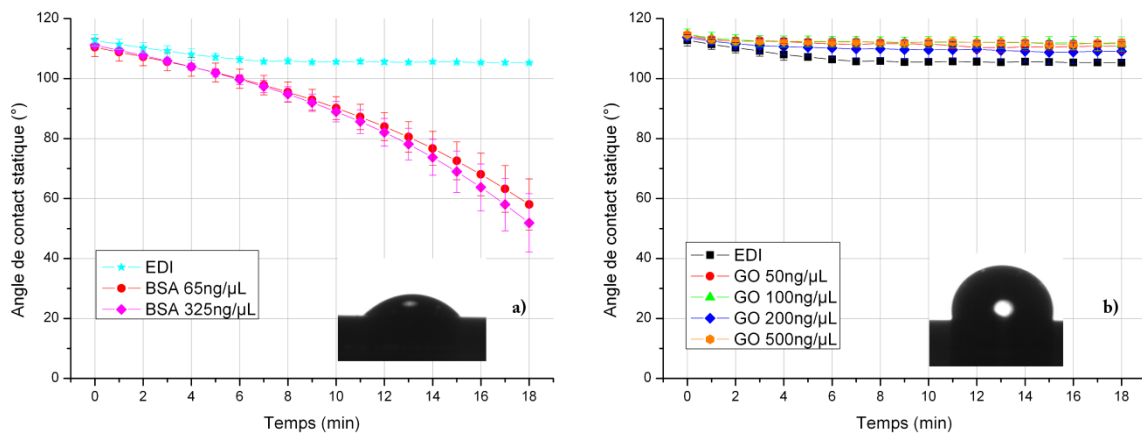
- Comme attendu, la présence de protéines diminue la tension de surface notamment à fortes concentrations. Cela est dû à la conformation des protéines dont les groupements hydrophobes à faible tension de surface viennent à l'interface liquide/air.
- La présence d'oxyde de graphène dans les solutions aqueuses ne vient pas modifier la tension de surface de la solution. Le GO n'agit donc pas comme un surfactant (qui baisse la tension de surface), il reste en suspension au sein de la goutte.
- A partir d'un certain niveau de concentration, l'oxyde de graphène en solution avec la BSA permet d'augmenter la valeur de la tension de surface : la BSA s'adsorbe alors sur le GO et reste en suspension plutôt que migrer de à l'interface liquide/air.

### **1.3.3. Evaporation de gouttes**

Dans ce paragraphe, le comportement de l'angle de contact statique au cours de l'évaporation d'une goutte de différentes solutions de BSA et de GO est étudié. L'angle de contact statique est mesuré toutes les minutes durant 18 minutes à l'aide du goniomètre DSA100 sur une surface de silicium recouverte d'un fluoropolymère hydrophobe, le Cytop® (dont la procédure de dépôt est précisée en Annexe 4), classiquement utilisé dans des dispositifs EWOD. Chaque expérience d'évaporation est effectuée en milieu contrôlé (salle blanche ISO 5/7 avec  $T=20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  et un taux d'humidité de  $45\% \pm 2\%$ ) avec des gouttes d'un volume de  $2\mu\text{L}$ , les mesures sont effectuées trois fois, dont au moins deux fois sur des surfaces différentes.

Dans un premier temps, l'évaporation des solutions contenant uniquement de la BSA (Figure 10a) ou uniquement du GO (Figure 10b) est réalisée. Dans le cas de solutions contenant de la BSA (Figure 10a), l'angle de contact statique diminue continûment pour atteindre environ  $50^{\circ}$  au bout de 18min. Pour ces solutions, le passage d'un état hydrophobe à un état hydrophile (i.e. passage du seuil à  $90^{\circ}$ ) est observé au bout de 8 min. Ces observations permettent d'affirmer qu'il y a adsorption de la BSA sur la surface, notamment à la ligne triple. De ce fait l'évaporation entraîne un piégeage de la ligne triple tout en gardant une longueur de ligne de base constante. Ce phénomène de piégeage de la ligne triple décrit par Deegan [151] est attribué à la migration de protéines à la ligne triple due aux flux internes induits lors de

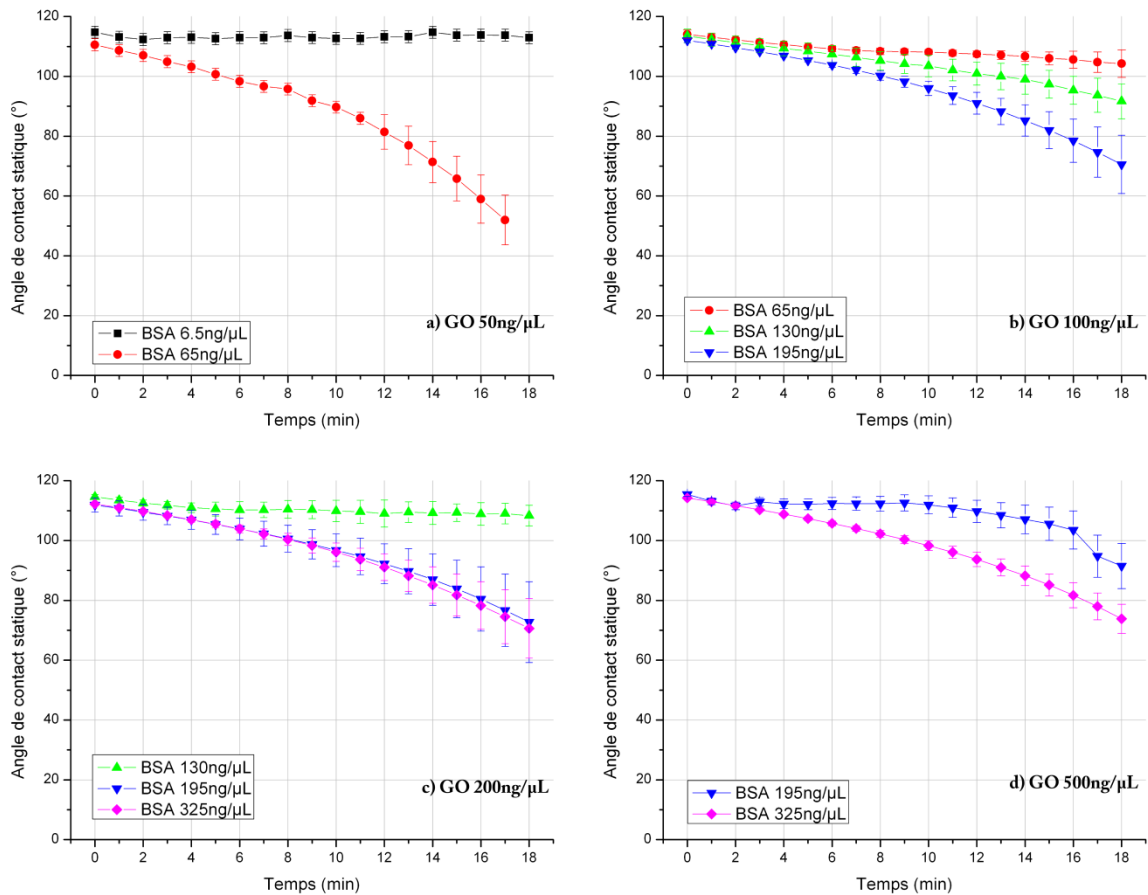
l'évaporation. Cette présence de protéines à l'interface, établie lors des mesures de tensions de surfaces, est confirmée.



**Figure 10: Evolution de l'angle de contact statique au cours de l'évaporation d'une goutte de a) BSA et b) GO avec en insert les photos des gouttes en fin d'évaporation.**

L'évaporation de solutions contenant de l'oxyde de graphène amène à un comportement différent (Figure 10b). La ligne triple n'est pas piégée quand l'angle de contact statique atteint l'angle de reculée. Les nanofeuillets d'oxyde de graphène restent en suspension dans la goutte lors de l'évaporation malgré les flux, ayant tendance à les ramener au voisinage de la ligne triple. Comme dans les mesures de tension de surface, le GO reste en suspension dans le liquide et ne vient pas modifier l'interface.

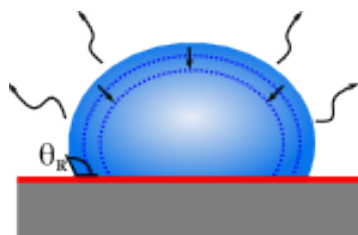
En se basant sur les constatations précédentes, l'idée est donc d'observer les comportements de la ligne triple pour des solutions composées d'un mélange d'oxyde de graphène et de BSA dont les concentrations varient. Les courbes de la Figure 11 montrent l'évolution de l'angle de contact statique de différentes solutions de BSA et de GO au cours du temps. Ces mesures ont été réalisées pour des solutions de 50ng/μL de GO avec 6,5ng/μL ou 65ng/μL de BSA (Figure 11a), de 100ng/μL de GO avec 65ng/μL, 130ng/μL ou 195ng/μL de BSA (Figure 11b), de 200ng/μL de GO avec 130ng/μL, 195ng/μL ou 325ng/μL de BSA (Figure 11c) et de 500ng/μL de GO avec 195ng/μL ou 325ng/μL de BSA (Figure 11d).



**Figure 11: Evolution de l'angle de contact statique au cours de l'évaporation d'une goutte de BSA avec a)GO 50ng/μL, b)GO 100ng/μL, c)GO 200ng/μL et d)GO 500ng/μL**

Ces mesures permettent d'observer deux états différents en fonction du ratio de concentrations [BSA]/[GO].

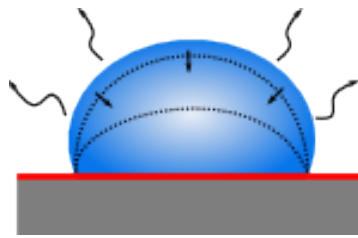
- Pour un ratio  $\leq 0,65$  correspondant aux concentrations de BSA de 6,5, 65, 130 et 195ng/μL avec des concentrations respectives de GO de 50, 100, 200 et 500ng/μL, un angle de contact constant autour de  $110^\circ$  est observé avec un décrochage permanent de la ligne triple quand l'angle de contact atteint l'angle de reculée (illustré par la Figure 12).



**Figure 12: Illustration du décrochage de la ligne triple lors de l'évaporation**

Ce phénomène s'explique par le fait que la BSA s'adsorbe principalement sur les nanofeuillets de GO plutôt que sur la surface. Ce comportement est identique à celui présenté par les solutions contenant uniquement du GO.

- Pour un ratio  $>0,65$  correspondant à tous les autres cas, l'angle de contact décroît de façon monotone avec une ligne de base constante. Cependant, la diminution de l'angle de contact de ces mélanges BSA+GO est moins importante que pour des solutions ne contenant pas de GO. Ce piégeage de la ligne triple est dû à un excès de BSA qui vient s'accumuler à la ligne triple (illustré par la Figure 13).



**Figure 13: Illustration du piégeage de la ligne triple lors de l'évaporation**

Le comportement dû à la BSA est ici prédominant. Pour des solutions contenant uniquement de la BSA, le ratio  $[BSA]/[GO]$  tend vers  $+\infty$ .

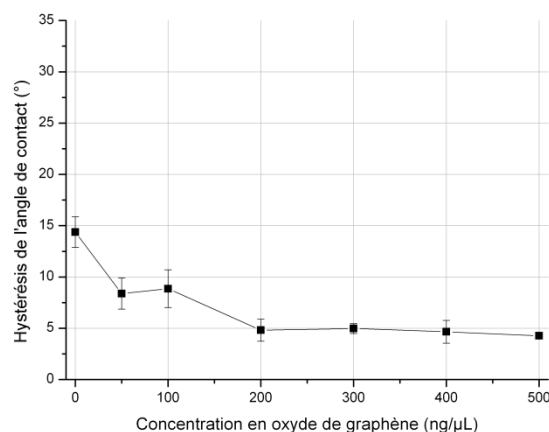
Il faut noter toutefois que ce ratio n'est valable que pour une certaine gamme de concentrations de BSA et de GO. Dans le cas de concentrations de  $325\text{ng}/\mu\text{L}$  en BSA et de  $500\text{ng}/\mu\text{L}$  en GO, ce ratio vaut  $0,65$  et pourtant l'angle de contact statique diminue au cours du temps. Il semble donc y avoir un phénomène de saturation pour les fortes concentrations de BSA.

#### **1.3.4. Mesure de l'hystérésis de l'angle de contact**

Afin de compléter la caractérisation des propriétés de mouillage de solutions de GO et de BSA, les mesures d'hystérésis de l'angle de contact de gouttes de  $6\mu\text{L}$  sont effectuées par la méthode du plan incliné (tilting) sur des surfaces hydrophobes (Cytos<sup>®</sup>) à l'aide du goniomètre DSA100 (mesures détaillées en Annexe 1). Comme précédemment, un premier contrôle est effectué avec des solutions contenant soit de la BSA soit du GO (chaque mesure est réalisée trois fois).

Pour des solutions contenant uniquement de la BSA, seule l'hystérésis de la concentration de BSA la plus faible ( $32,5\text{ng}/\mu\text{L}$ ) a pu être mesurée par la méthode de tilting et vaut en moyenne  $27,5^\circ \pm 3^\circ$ . Pour des concentrations plus élevées en BSA, malgré la déformation de la goutte, l'adsorption des protéines sur la surface entraîne une hystérésis trop élevée pour provoquer un décrochage de la ligne triple.

Pour les différentes solutions de GO, les hystérésis sont présentées dans la Figure 14.



**Figure 14: Valeurs de l'hystérésis de l'angle de contact pour les différentes solutions de GO sur une surface Cytos<sup>®</sup>**

Les mesures d'hystérésis de l'angle de contact des solutions ont mis en évidence un phénomène particulièrement intéressant présenté sur la Figure 14. L'hystérésis qui vaut environ 14,5° pour l'EDI, diminue à 8-9° pour des concentrations en GO de 50-100ng/μL. Ensuite, il diminue autour de 5° pour 200ng/μL de GO et reste constant autour de 4-5° pour des concentrations plus élevées en GO. Ce phénomène est pour le moins inattendu car l'hystérésis de l'angle de contact diminue (division par un facteur 3) quand la concentration en oxyde de graphène dans la goutte augmente.

L'hystérésis de l'angle de contact étant due à la présence d'imperfections physiques ou chimiques de la surface, il est possible que les nanofeuillets de GO viennent atténuer ces imperfections causant ainsi une diminution de l'hystérésis. A l'heure actuelle, ce phénomène n'a pas encore été reporté dans la littérature. Une étude plus poussée sur d'autres surfaces rendues hydrophobes avec un polymère ainsi que des caractérisations de surfaces après le glissement des gouttes seraient nécessaire pour mieux comprendre ce phénomène.

Afin d'observer si ce phénomène se produit également pour des solutions contenant du GO et de la BSA, l'hystérésis de l'angle de contact a été mesurée. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.

Comme nous l'avons expliqué, dans certains cas, l'hystérésis n'a pas pu être mesurée par tilting du fait d'un fort piégeage de la ligne triple par les biomolécules. Le ratio [BSA]/[GO] est, dans ce cas, supérieur à 0,48. La différence minimale entre les deux angles à une inclinaison de 90°, pour ces solutions, est d'environ 30°. Quand le ratio [BSA]/[GO] est inférieur à 0,48, l'hystérésis a été mesurée. A nouveau, la présence d'oxyde de graphène vient diminuer l'hystérésis même avec la BSA.

Concentration en BSA	Concentration en GO	Hystérésis
32,5ng/μL	Sans GO	27,5±3°
	50ng/μL	6,5±1,5°
	100ng/μL	8±2°
65ng/μL	Sans GO	> 30°
	50ng/μL	26±15,5°
	100ng/μL	8±1,5°
	200ng/μL	5±1,5°
130ng/μL	Sans GO	> 30°
	100ng/μL	> 30°
	200ng/μL	> 30°
	300ng/μL	7±1°
195ng/μL	Sans GO	> 30°
	200ng/μL	> 30°
	300ng/μL	> 30°
	400ng/μL	7±0,5°

**Tableau 2: Valeurs de l'hystérésis pour des solutions de BSA/GO**

Ces différentes observations montrent que :

- Les solutions aqueuses de GO présentent des hystérésis de l'angle de contact plus faibles (division par un facteur maximal de 3).
- Dans certains cas, l'hystérésis de l'angle de contact n'a pas pu être mesurée. Ces cas correspondent aux solutions de [BSA] ≥ 65ng/μL sans GO et celle ne contenant pas une quantité importante de GO pour adsorber la BSA. L'excès de BSA qui n'est pas adsorbé sur le GO vient piéger la ligne triple et augmente l'hystérésis.
- La présence d'oxyde de graphène dans les solutions de BSA permet, selon la concentration en BSA et en GO, de diminuer l'hystérésis. Cette diminution est plus marquée en ajoutant une quantité importante (diminution pouvant aller jusqu'à une division par 5 de l'hystérésis de départ).

### 1.3.5. Discussion

Les mesures de tension de surface liquide/milieu ambiant ont montré que la présence de GO permet d'augmenter la tension de surface des solutions de BSA. Cependant, ces mesures ne donnent pas directement des informations sur l'interaction liquide/surface. L'évolution de

l'angle de contact statique, lors de l'évaporation ainsi que la mesure de l'hystérésis de l'angle de contact donnent, quant à elles, des informations sur la dynamique de la ligne triple. En confrontant ces deux méthodes, on constate qu'une corrélation peut être établie. En effet, deux principaux comportements de ligne triple se dégagent.

Le premier comportement est dû à l'adsorption des protéines sur la surface qui entraînent un piégeage de la ligne triple. Ce comportement a pour conséquence une baisse rapide de l'angle de contact statique tout en conservant une ligne de base constante et une forte hystérésis de l'angle contact due au piégeage irréversible de la ligne triple. Ce comportement est observé pour des solutions contenant uniquement de la BSA et pour des solutions fortement concentrées en BSA ( $[BSA] > 195 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) malgré la présence de GO.

Le second comportement montre la mobilité de la ligne triple. Dans ce cas, il n'y a pas de piégeage de la ligne triple donc l'hystérésis de l'angle de contact diminue. Cela est confirmé par les expériences d'évaporation et de mesures d'hystérésis. Ce comportement est constaté pour des solutions contenant uniquement du GO et pour des solutions à faibles concentrations en BSA ( $[BSA] < 195 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ).

Ces expériences ont des aspects différents : aspect statique pour l'évaporation la goutte, seule la ligne triple se déplace et aspect dynamique pour l'hystérésis, le décrochage de la ligne triple entraîne le déplacement de la goutte. Cependant, la limite entre les deux comportements précédemment décrits est quasiment identique pour les expériences d'évaporation et de mesures d'hystérésis. Il est donc aussi nécessaire de considérer la concentration en BSA. En effet, pour de faibles concentrations en BSA sans GO, la quantité de protéines présente n'est pas suffisante pour causer le piégeage irréversible de la ligne triple. Alors que dans le cas de plus fortes concentrations en BSA, celle-ci vient s'adsorber sur la surface et piéger la ligne triple même en présence d'oxyde de graphène. Il y a un phénomène de saturation des nanofeuillets de GO et la BSA libre vient s'adsorber sur la surface.

Les expériences d'évaporation peuvent être comparées à celles effectuées par Au *et al.* [I38], en notant cependant que leurs gouttes contiennent du milieu de culture cellulaire, 10% de sérum fœtal de veau et différents surfactants de type Pluronic<sup>®</sup>. Ces surfactants sont constitués de trois chaînes de polymère (polyéthylène glycol PEO, polypropylène glycol PPO et polyéthylène glycol). La différence entre chaque surfactant est liée à la longueur des différences chaînes et à l'équilibre hydrophile/hydrophobe. Ils observent aussi deux types de comportements : (i) pour la solution sans et avec certains types de Pluronic<sup>®</sup> (avec une longueur moyenne  $n$  de la chaîne PPO inférieure à 30 fois le monomère), l'angle de contact statique décroît fortement, comme nous l'avons observé pour le cas des solutions de BSA sans

et à faibles concentrations en GO et (ii) un angle de contact restant relativement constant avec d'autres types de Pluronic<sup>®</sup> (avec  $n \geq 30$  fois le monomère), équivalent aux cas des solutions de BSA contenant de fortes concentrations de GO avec néanmoins un angle de contact statique plus important.

### 1.3.6. Conclusion

Cette étude des propriétés de mouillages des solutions de BSA et de GO a permis de mettre en évidence certains phénomènes originaux. Les caractérisations de ces propriétés ont été effectuées par trois différentes méthodes :

- *Mesure de la tension de surface.* Il s'agissait dans un premier temps d'observer la modification de l'interface liquide/air due à la présence de BSA et à la présence de GO. Ces mesures ont permis de montrer que l'oxyde de graphène n'avait aucune influence sur la tension de surface dans les solutions d'EDI et qu'il augmentait celle des solutions de BSA.
- *Mesure de l'évolution de l'angle de contact statique au cours de l'évaporation.* Dans ce cas, le but était de caractériser principalement le comportement de la ligne triple lors de l'évaporation mais aussi d'évaluer par voie de conséquence l'adsorption des protéines sur la surface causant le piégeage de la ligne triple. Deux comportements ont été identifiés : (i) un décrochage de la ligne triple pour des solutions de GO et des solutions de ratio  $[BSA]/[GO] \leq 0,65$  et (ii) un piégeage irréversible de la ligne triple pour les solutions de BSA et les solutions de ratio  $[BSA]/[GO] > 0,65$ .
- *Mesure de l'hystérésis de l'angle de contact par tilting.* Cette mesure est un autre moyen pour évaluer la dynamique de la ligne triple à travers son décrochage. Deux comportements ont été observés : (i) une diminution de l'hystérésis pour des solutions de GO et celles dont le ratio  $[BSA]/[GO]$  est inférieur ou égal à 0,48 et (ii) une forte hystérésis pour des solutions de BSA et celles dont le ratio  $[BSA]/[GO]$  est supérieur à 0,48.

Les résultats de ces différentes caractérisations montrent que l'utilisation de nanofeuillets d'oxyde de graphène pour prévenir l'adsorption de protéines est une alternative prometteuse aux autres méthodes utilisées jusqu'à présent.

## 1.4. EWOD statique des solutions de GO et de BSA

Après avoir étudié le mouillage des solutions de GO et BSA, les propriétés de ces solutions sous électromouillage statique sont étudiées. Dans un premier temps, la réversibilité du

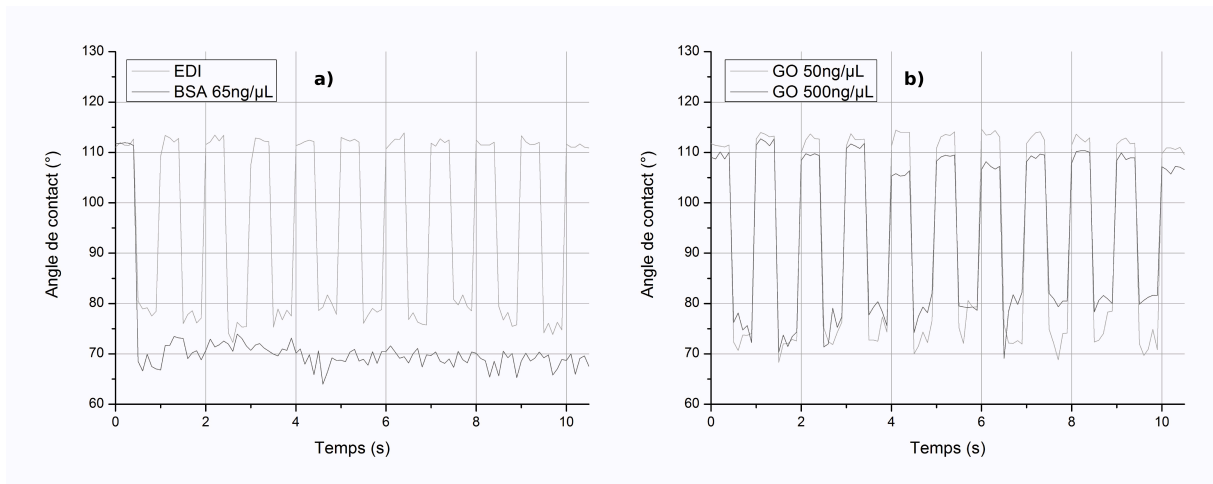
phénomène EWOD statique est examinée. Pour réaliser ces expériences, un banc de caractérisation d'électromouillage composé d'un GBF (Tektronic Inc., AFG3021B, Etats-Unis) et d'un amplificateur haute-tension (Tegam Inc., Model 2340, Etats-Unis), a été mis en œuvre et placé à proximité du goniomètre Krüss DSA 100. Les surfaces EWOD utilisées dans cette partie sont réalisées sur des wafers de silicium fortement dopés ( $0,009-0,01\Omega/\text{cm}$ , Siltronic, France) sur lesquels une couche diélectrique de SU-8 ( $e=2\mu\text{m}$ ,  $\epsilon_r=3,2$ ) et une couche hydrophobe Cytop<sup>®</sup> ( $e\sim 30\text{nm}$ ) ont été déposées (procédé de fabrication détaillé en Annexe 5). Une goutte de  $6\mu\text{L}$  est déposée sur la surface EWOD dont l'électrode est connectée à la masse. Le potentiel est appliqué sur la goutte à l'aide d'une aiguille métallique recouverte de Téflon<sup>®</sup> sur l'extrémité. Le goniomètre mesure et enregistre les variations de l'angle de contact 10 fois par seconde durant l'expérience.

#### **1.4.1. Etude de la réversibilité du phénomène EWOD statique**

Afin d'évaluer la réversibilité du phénomène EWOD pour les différentes solutions, les expériences sont réalisées selon le protocole suivant :

- Une goutte de  $6\pm 0,1\mu\text{L}$  est déposée sur la surface à l'aide d'une micropipette et l'aiguille est ensuite placée au milieu de la goutte. L'aiguille doit suffisamment pénétrer dans la goutte pour rester en contact lors de son étalement.
- Un signal carré de fréquence 1kHz et d'amplitude  $100V_{\text{eff}}$  est appliqué entre la goutte et l'électrode pendant 0,5s (début du 1<sup>er</sup> cycle).
- Une différence de potentiel nulle est ensuite appliquée durant 0,5s (fin du 1<sup>er</sup> cycle).
- Les deux précédentes étapes sont répétées 10 fois avec la même tension.

Ces mesures permettront de connaître l'angle de contact avant la mise sous tension  $\theta_0$ , l'angle de contact lors de la mise sous tension  $\theta_1$  et l'angle de contact lors de la mise hors tension  $\theta_2$ . La différence entre ces deux angles  $\theta_0-\theta_2$  sera appelée hystérésis d'électromouillage  $H_{\text{EW}}$  et permettra de définir la réversibilité du phénomène EWOD. Le nombre d'électromouillage pourra également être calculé (différence des cosinus des angles sous et hors tension) afin de quantifier la force développée par ce phénomène. Plusieurs expériences ont été effectuées pour vérifier la reproductibilité des mesures, seuls les résultats les plus pertinents sont présentés par la suite.



**Figure 15: Variation de l'angle de contact au cours du temps avec l'application de cycles de tension pour (a) l'EDI et la BSA à 65ng/μL et (b) des solutions de GO**

Dans un premier temps, un contrôle est effectué avec de l'EDI, des solutions contenant uniquement de la BSA (Figure 15a) et celles contenant uniquement du GO (Figure 15b). Dans le cas de l'EDI, l'effet EWOD est bien réversible avec un angle  $\theta_0$  de 112°. L'angle de mise sous tension  $\theta_1$  est relativement constant autour de 77° et l'angle de mise hors tension  $\theta_2$  revient à l'angle de départ. Pour l'EDI,  $H_{EW}$  est d'environ 0°. Le nombre d'électromouillage  $\eta$  est égal à environ 0,57. Dans le cas de la solution de BSA à 65ng/μL (Figure 15a), l'angle de contact  $\theta_0$  est de 112°. L'application d'une tension diminue fortement l'angle de contact jusque 70° avec  $\eta$  de 0,76. Mais lors de la mise hors tension l'angle ne revient pas à son état initial signifiant donc que l'effet EWOD est irréversible, la chute de l'angle de contact est d'environ 40° et  $\eta$  devient nul. Ce phénomène est dû à l'adsorption de protéines sur la surface, entraînant un piégeage irréversible de la ligne triple. La goutte ne peut donc pas revenir à son état initial.

Dans le cas des solutions de GO uniquement, les angles de contact  $\theta_0$  sont de 109° et 112° pour 50ng/μL et 500ng/μL de GO respectivement. Pour les deux concentrations de GO, un phénomène EWOD réversible est observé ( $H_{EW}$  respectifs de 0 et 5°). Alors que l'angle de contact sous tension  $\theta_1$  pour 50ng/μL de GO reste constant autour de 72°, il augmente légèrement pour 500ng/μL de GO de 75° à 81°. Le  $\eta$  du 1<sup>er</sup> cycle est 0,65 et 0,63 pour 50 et 500ng/μL respectivement. L'angle de contact  $\theta_2$  revient toujours à une valeur supérieure à 112° et 110° pour 50 et 500ng/μL de GO respectivement. Par contre, à la fin de 10<sup>ème</sup> cycle,  $\eta$  est de 0,7 et 0,46 pour 50 et 500ng/μL de GO respectivement. La baisse de  $\eta$  pour la forte concentration en GO (500ng/μL) montre que l'effet EWOD diminue dans le temps pouvant indiquer une accumulation de GO à la ligne triple.

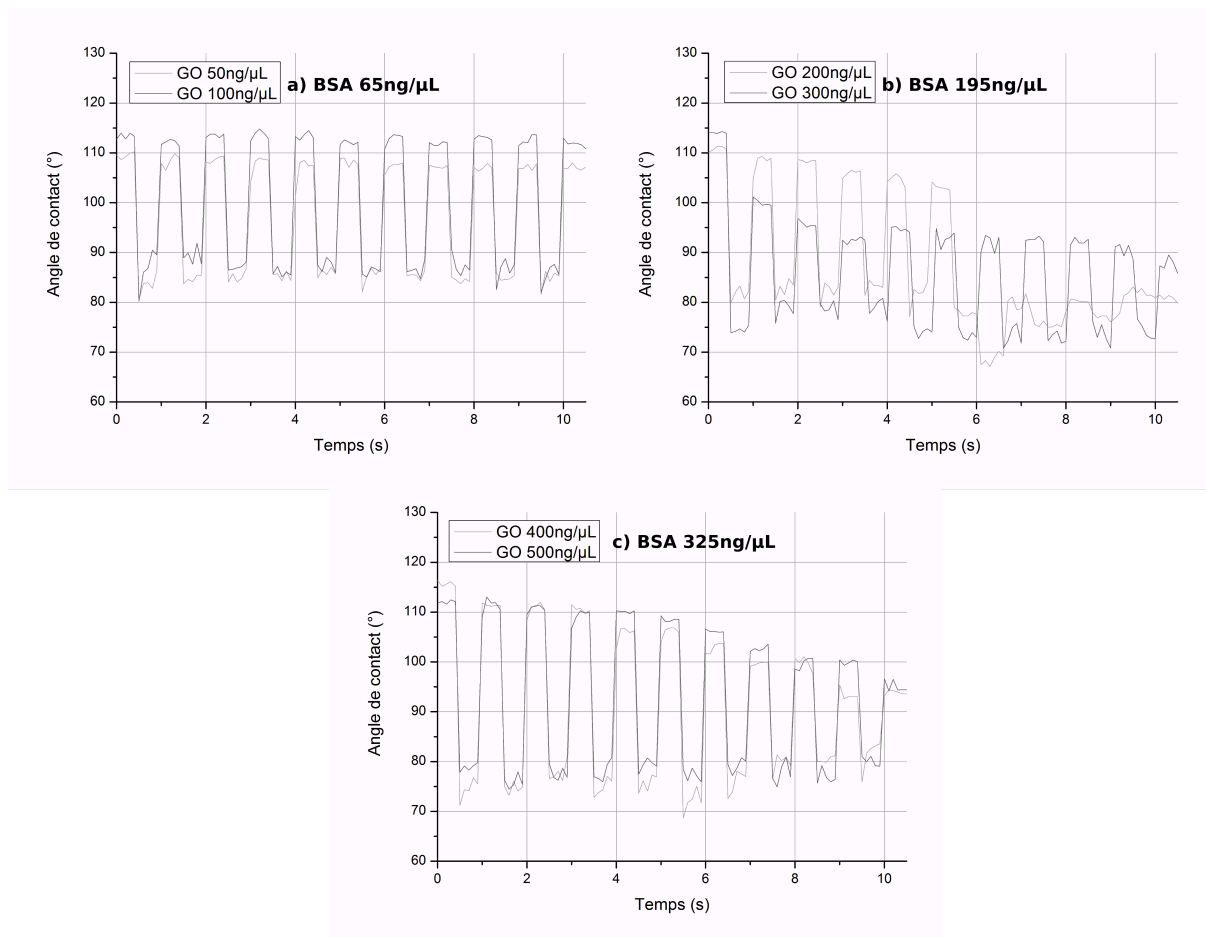
Il y a de nouveau deux comportements différents qui peuvent être distingués : (i) le comportement de la BSA qui s'adsorbe sur la surface et rend le phénomène EWOD irréversible et (ii) le comportement du GO qui reste en suspension et présente une réversibilité à l'effet EWOD.

Les résultats de l'étude de réversibilité du phénomène pour des solutions de GO et de BSA sont présentés sur la Figure 16.

Pour une concentration en BSA de 65ng/μL (Figure 16a), l'effet est bien réversible pour les deux concentrations de GO (50 et 100ng/μL) avec une  $H_{EW}$  quasi nulle. Dans ces deux cas, les angles de contact  $\theta_1$  et  $\theta_2$  restent constants au cours des 10 cycles avec une légère baisse de l'angle de mise hors tension  $\theta_2$  pour 50ng/μL de GO avec  $\eta$  constant autour de 0,4.

Pour la solution de BSA de 195ng/μL (Figure 16b), avec 200ng/μL de GO, le phénomène EWOD est réversible avec  $H_{EW} \sim 5^\circ$  pendant 5 cycles puis est irréversible  $H_{EW} = 30^\circ$ . L'angle de départ  $\theta_0$  est de  $110^\circ$  et l'angle  $\theta_2$  décroît jusqu'à être identique à  $\theta_1$  ( $\sim 80^\circ$ ). Le nombre d'électromouillage qui est stable autour de 0,4 pour les 5 premiers cycles, devient nul ensuite. Avec 300ng/μL de GO, le phénomène EWOD est réversible sur les 10 cycles mais l'angle de mise hors tension du 1<sup>er</sup> cycle a baissé d'environ  $10^\circ$  par rapport à l'angle de départ  $\theta_0 = 115^\circ$ . L'hystérésis d'électromouillage reste à peu près constante autour de  $5^\circ$  après le premier cycle EWOD avec un  $\eta$  d'environ 0,4.

Pour des solutions de 365ng/μL de BSA (Figure 16c), le phénomène EWOD est bien réversible pour les deux concentrations de GO. L'hystérésis d'électromouillage est quasi-nulle pour les cinq premiers cycles puis diminue à  $10^\circ$  pour 400ng/μL de GO et  $15^\circ$  pour 500ng/μL de GO. La diminution de  $H_{EW}$  est plus forte pour la concentration de GO la plus faible. Cela est aussi observé sur le nombre d'électromouillage qui est constant autour de 0,55 pour les deux concentrations de GO durant les 5 premiers cycles puis qui diminue à 0,2 et 0,4 pour respectivement 400 et 500ng/μL de GO.



**Figure 16: Variation de l'angle de contact au cours du temps avec l'application de cycles de tension pour (a) des solutions de GO avec 65ng/μL de BSA, (b) des solutions de GO avec 195ng/μL de BSA et (c) des solutions de GO avec 325ng/μL de BSA**

#### 1.4.2. Conclusion

L'étude de la variation de l'angle de contact dans le temps a permis de montrer qu'il y a deux comportements principaux. Dans le cas de solutions BSA, l'effet EWOD est irréversible. Il y a un piégeage de la ligne triple dû à l'adsorption de protéines sur la surface. L'angle de contact après l'application d'une tension reste stable pour des solutions de BSA seule même après la mise hors tension. Les solutions de GO présentent une réversibilité à l'effet EWOD avec une hystérésis d'électromouillage un peu plus forte pour des fortes concentrations en GO que pour des faibles concentrations. Pour les mélanges de BSA et de GO, il y a clairement un effet dû à l'oxyde de graphène car une réversibilité du phénomène EWOD est observée même pour des fortes concentrations en BSA (325ng/μL). Cette étude d'EWOD statique avec les solutions de GO et de BSA permet de venir compléter les expériences précédentes sur les propriétés de mouillage. Dans tous les cas, la présence de GO avec la BSA entraîne un comportement différent et de meilleures propriétés de mouillage et d'électromouillage par rapport aux solutions contenant uniquement de la BSA. Il faut noter toutefois que les

différentes expériences réalisées dans ce chapitre correspondent à des situations de biopollution plus défavorables que le déplacement EWOD (développé dans le chapitre III) car dans ce cas, l'adsorption des biomolécules sur la surface s'effectue toujours au même endroit (pas de déplacement de la goutte).

## Conclusion

Dans ce chapitre, une nouvelle méthode permettant de limiter la pollution des surfaces par les liquides biologiques a été présentée. Cette méthode propose de maintenir des protéines en suspension dans le liquide par l'intermédiaire de leur adsorption sur des nanofeuillets d'oxyde de graphène. Afin de justifier la pertinence de ce choix, plusieurs caractérisations portant sur les propriétés de mouillage et d'électromouillage des solutions d'oxyde de graphène avec de la BSA, protéine connue pour sa forte adhésion, ont été effectuées. Celles-ci ont permis de mettre en évidence les deux principaux comportements attendus :

- Adsorption de la BSA sur la surface entraînant un piégeage de la ligne triple.
- Adsorption de la BSA sur les nanofeuillets de GO permettant le décrochage de la ligne triple.

Tout d'abord, différents aspects du mouillage ont été investigués. Les mesures de tension de surface ont montré que les solutions de BSA ont une tension de surface plus faible que l'EDI et que celui-ci diminue quand la concentration de BSA augmente. Cependant l'ajout de GO dans ces solutions permet d'augmenter la tension de surface jusqu'à atteindre celle de l'EDI (en fonction de la concentration respective de GO et de BSA). Dans ce cas, c'est l'interface liquide/air qui a été étudiée. L'interface liquide/surface a été caractérisée par deux méthodes afin de déterminer la dynamique de la ligne triple. La mesure de l'hystérésis de l'angle de contact des mélanges BSA/GO a montré que l'ajout de GO permet d'obtenir une hystérésis inférieure à celle de l'EDI (jusque 5°) quand le ratio [BSA]/(GO) est inférieur à 0,48. Pour des ratios supérieurs à 0,48, l'hystérésis est plus importante que celle de l'EDI (jusque 30°). L'évolution de l'angle de contact par évaporation a permis d'établir les mêmes conclusions mais pour un ratio limite de 0,65.

Ensuite, les expériences d'électromouillage sur diélectrique en statique ont montré que l'effet EWOD est irréversible pour les solutions de BSA seule. Au contraire, des solutions de GO et des mélanges BSA/GO présentent un caractère réversible à l'effet EWOD avec toutefois une baisse de la réversibilité (hystérésis d'électromouillage) et une diminution de la force EWOD au cours des cycles EWOD pour des solutions de BSA/GO.

L'utilisation de nanofeuillets d'oxyde de graphène pour limiter la pollution des surfaces par des biomolécules semble être une stratégie prometteuse. De plus, elle est complémentaire aux autres méthodes proposées dans la littérature dont les principales propriétés sont présentées sur le Tableau 3.

Méthode de limitation de la biopollution	Système biphasique dans l'huile	Gouttes encapsulées dans une fine couche d'huile	Ajout de Pluronic® dans la goutte	Ajout d'oxyde de graphène dans la goutte
Tension d'actuation (fréquence)	52V (10Hz)	67,7V <sub>eff</sub> (1kHz)	200V <sub>pp</sub> (5kHz)	100V <sub>eff</sub> (1kHz)
Type d'analyse réalisable	Sans contact avec l'analyte uniquement	Sans contact avec l'analyte uniquement	Sans contact avec l'analyte uniquement	Quasiment toutes
Liquides biologiques déplacés	Sang, urine, sueur, etc...	BSA tagué (5ng/μL)	Milieu de culture cellulaire avec 10% de sérum fœtal de veau	BSA (195ng/μL) et HRP (50ng/μL)
Angle de contact avec la méthode	160°	~167°	80-90°	110-120°
Observations particulières	Système commercialisé	Les gouttes peuvent être extraites de la couche d'huile	Possibilité de faire de la culture cellulaire	Le GO peut être fonctionnalisé pour la capture spécifique
Références	[I33]	[I36]	[I38]	[I52]

**Tableau 3: Comparaison entre les différentes méthodes de prévention de la pollution des surfaces**

L'utilisation du GO permet de travailler dans l'air ce qui simplifie la réalisation technologique des dispositifs par rapport à ceux utilisant de l'huile mais également de pouvoir utiliser une plus large gamme de méthodes d'analyse. Dans le dernier chapitre, la compatibilité de cette méthode avec le déplacement par EWOD et la détection SPR sera étudiée.

## Bibliographie

- [I1] R. Mukhopadhyay. When microfluidic devices go bad - how does fouling occur in microfluidic devices, and what can be done about it? *Analytical Chemistry*, 77(21):429A–432A, 2005.
- [I2] P-G. De Gennes, F. Brochard-Wyart, and D. Quéré. *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Belin, 2005.
- [I3] G. Lippmann. Relations entre les phénomènes électriques et capillaires. *Annales de Chimie et de Physique*, 5:494, 1875.
- [I4] J. Lee, H. Moon, J. Fowler, T. Schoellhammer, and C. J. Kim. Electrowetting and electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling. *Sensors and Actuators A-Physical*, 95(2-3):259–268, 2002.
- [I5] H. Moon, S. K. Cho, R. L. Garrell, and C. J. Kim. Low voltage electrowetting-on-dielectric. *Journal of Applied Physics*, 92(7):4080–4087, 2002.
- [I6] F. Mugele and J. C. Baret. Electrowetting: From basics to applications. *Journal of Physics-condensed Matter*, 17(28):R705–R774, 2005.
- [I7] F. Mugele and J. Buehrle. Equilibrium drop surface profiles in electric fields. *Journal of Physics-condensed Matter*, 19(37):375112, 2007.
- [I8] F. Lapierre, P. Brunet, Y. Coffinier, V. Thomy, R. Blossey, and R. Boukherroub. Electrowetting and droplet impalement experiments on superhydrophobic multiscale structures. *Faraday Discussions*, 146:125–139, 2010.
- [I9] K. H. Kang. How electrostatic fields change contact angle in electrowetting. *Langmuir*, 18(26):10318–10322, 2002.
- [I10] T. B. Jones. An electromechanical interpretation of electrowetting. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 15(6):1184–1187, 2005.
- [I11] F. Mugele. Fundamental challenges in electrowetting: from equilibrium shapes to contact angle saturation and drop dynamics. *Soft Matter*, 5(18):3377–3384, 2009.
- [I12] J. Buehrle, S. Herminghaus, and F. Mugele. Interface profiles near three-phase contact lines in electric fields. *Physical Review Letters*, 91(8):6101, 2003.
- [I13] H. J. J. Verheijen and M. W. J. Prins. Reversible electrowetting and trapping of charge: Model and experiments. *Langmuir*, 15(20):6616–6620, 1999.
- [I14] M. Vallet, M. Vallade, and B. Berge. Limiting phenomena for the spreading of water on polymer films by electrowetting. *European Physical Journal B*, 11(4):583–591, 1999.
- [I15] B. Shapiro, H. Moon, R. L. Garrell, and C. J. Kim. Equilibrium behavior of sessile drops under surface tension, applied external fields, and material variations. *Journal of Applied Physics*, 93(9):5794–5811, 2003.
- [I16] A. Quinn, R. Sedev, and J. Ralston. Contact angle saturation in electrowetting. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(13):6268–6275, 2005.

- [I17] M. Washizu. Electrostatic actuation of liquid droplets for microreactor applications. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 34(4):732–737, 1998.
- [I18] M. Abdelgawad and A. R. Wheeler. The digital revolution: A new paradigm for microfluidics. *Advanced Materials*, 21(8):920–925, 2009.
- [I19] F. Caron. *Développement de microsystèmes fluidiques à électromouillage pour l'analyse des protéines par spectrométrie de masse MALDI*. Thèse de doctorat, Université de Lille 1, 2007.
- [I20] R. A. Hayes and B. J. Feenstra. Video-speed electronic paper based on electrowetting. *Nature*, 425(6956):383–385, 2003.
- [I21] R. Shamai, D. Andelman, B. Berge, and R. Hayes. Water, electricity, and between ... on electrowetting and its applications. *Soft Matter*, 4(1):38–45, 2008.
- [I22] B. Berge and J. Peseux. Variable focal lens controlled by an external voltage: An application of electrowetting. *European Physical Journal E*, 3(2):159–163, 2000.
- [I23] S. K. Cho, H. J. Moon, and C. J. Kim. Creating, transporting, cutting, and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 12(1):70–80, 2003.
- [I24] R. B. Fair. Digital microfluidics: is a true lab-on-a-chip possible? *Microfluidics and Nanofluidics*, 3(3):245–281, 2007.
- [I25] D. Bogojevic, M. D. Chamberlain, I. Barbulovic-Nad, and A. R. Wheeler. A digital microfluidic method for multiplexed cell-based apoptosis assays. *Lab on a Chip*, 12(3):627–634, 2012.
- [I26] Y. Fouillet and J. L. Achard. Digital microfluidic and biotechnology. *Comptes Rendus Physique*, 5(5):577–588, 2004.
- [I27] L. Tanguy. *Actionnements électriques de fluides dédiés aux microsystèmes*. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III, 2009.
- [I28] F. Lapiere, G. Piret, H. Drobecq, O. Melnyk, Y. Coffinier, V. Thomy, and R. Boukherroub. High sensitive matrix-free mass spectrometry analysis of peptides using silicon nanowires-based digital microfluidic device. *Lab on a Chip*, 11(9):1620–1628, 2011.
- [I29] T. Krupenkin and J. A. Taylor. Reverse electrowetting as a new approach to high-power energy harvesting. *Nature communications*, 2:448, 2011.
- [I30] B. Raj, M. Dhindsa, N. R. Smith, R. Laughlin, and J. Heikenfeld. Ion and liquid dependent dielectric failure in electrowetting systems. *Langmuir*, 25(20):12387–12392, 2009.
- [I31] H. Liu, S. Dharmatilleke, D. K. Maurya, and A. A. O. Tay. Dielectric materials for electrowetting-on-dielectric actuation. *Microsystem Technologies*, 16(3):449–460, 2010.
- [I32] F. Li and F. Mugele. How to make sticky surfaces slippery: Contact angle hysteresis in electrowetting with alternating voltage. *Applied Physics Letters*, 92(24):4108, 2008.
- [I33] V. Srinivasan, V. K. Pamula, and R. B. Fair. An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids. *Lab on a Chip*, 4(4):310–315, 2004.

- [I34] C. Quilliet and B. Berge. Investigation of effective interface potentials by electrowetting. *Europhysics Letters*, 60(1):99–105, 2002.
- [I35] D. Brassard, L. Malic, F. Normandin, M. Tabrizian, and T. Veres. Water-oil core-shell droplets for electrowetting-based digital microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 8(8):1342–1349, 2008.
- [I36] S. K. Fan, Y. W. Hsu, and C. H. Chen. Encapsulated droplets with metered and removable oil shells by electrowetting and dielectrophoresis. *Lab on a Chip*, 11:2500–2508, 2011.
- [I37] V. N. Luk, G. C. H. Mo, and A. R. Wheeler. Pluronic additives: A solution to sticky problems in digital microfluidics. *Langmuir*, 24(12):6382–6389, 2008.
- [I38] S. H. Au, P. Kumar, and A. R. Wheeler. A new angle on pluronic additives: Advancing droplets and understanding in digital microfluidics. *Langmuir*, 27(13):8586–8594, 2011.
- [I39] C. N. R. Rao, A. K. Sood, K. S. Subrahmanyam, and A. Govindaraj. Graphene: The new two-dimensional nanomaterial. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(42):7752–7777, 2009.
- [I40] M. J. Allen, V. C. Tung, and R. B. Kaner. Honeycomb carbon: A review of graphene. *Chemical Reviews*, 110(1):132–145, 2010.
- [I-41] D. Li, M. B. Muller, S. Gilje, R. B. Kaner, and G. G. Wallace. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nature Nanotechnology*, 3(2):101–105, 2008.
- [I42] Q. Wang, M. R. Das, M. Li, R. Boukherroub, and S. Szunerits. Voltammetric detection of l-dopa and carbidopa on graphene modified glassy carbon interfaces. *Bioelectrochemistry*, in press, 2012.
- [I43] F. J. M. Hoeben, P. Jonkheijm, E. W. Meijer, and A. P. H. J. Schenning. About supramolecular assemblies of pi-conjugated systems. *Chemical Reviews*, 105(4):1491–1546, 2005.
- [I44] J. W. Liu, Q. Zhang, X. W. Chen, and J. H. Wang. Surface assembly of graphene oxide nanosheets on SiO<sub>2</sub> particles for the selective isolation of hemoglobin. *Chemistry-a European Journal*, 17(17):4864–4870, 2011.
- [I45] C. H. Lu, H. H. Yang, C. L. Zhu, X. Chen, and G. N. Chen. A graphene platform for sensing biomolecules. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(26):4785–4787, 2009.
- [I46] L. A. L. Tang, J. Z. Wang, and K. P. Loh. Graphene-based SELDI probe with ultrahigh extraction and sensitivity for DNA oligomer. *Journal of the American Chemical Society*, 132(32):10976–10977, 2010.
- [I47] J. Lee, Y. K. Kim, and D. H. Min. Laser desorption/ionization mass spectrometric assay for phospholipase activity based on graphene oxide/carbon nanotube double-layer films. *Journal of the American Chemical Society*, 132(42):14714–14717, 2010.
- [I48] M. R. Das, R. K. Sarma, R. Saikia, V. S. Kale, M. V. Shelke, and P. Sengupta. Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide sheets and its antimicrobial activity. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 83(1):16–22, 2011.

[I49] W. S. Hummers and R. E. Offeman. Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(6):1339–1339, 1958.

[I50] O. Fellahi, M. R. Das, Y. Coffinier, S. Szunerits, T. Hadjersi, M. Maamache, and R. Boukherroub. Silicon nanowire arrays-induced graphene oxide reduction under UV irradiation. *Nanoscale*, 3(11):4662–4669, 2011.

[I51] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Hubert, S. R. Nagel and T. A. Whitten. Capillary flow as the cause of ring strains from dried liquid drops. *Nature*, 389(6653):827–829, 1997.

[I52] G. Perry, V. Thomy, M. R. Das, Y. Coffinier, and R. Boukherroub. Inhibiting protein biofouling using graphene oxide in droplet-based microfluidic microsystems. *Lab on a Chip*, 12:1601–1604, 2012.



## **II. Surfaces superomniphobes à base de nanostructures de ZnO pour systèmes EWOD-SPR**



## Introduction

Dans ce chapitre, la réalisation de surfaces structurées sera présentée afin de contrôler l'interaction liquide/surface pour limiter la biopollution. Tout d'abord, nous étendrons les propriétés de mouillage d'un liquide sur surface plane présentées dans le premier chapitre, au cas d'une surface rugueuse. La compréhension des phénomènes mis en jeu est une étape indispensable pour la réalisation de surfaces superhydrophobes. Les différents états caractéristiques du mouillage de liquides aqueux sur des surfaces micro-/nanostructurées seront abordés. La principale différence entre ces états est fortement liée à la valeur de l'hystérésis de l'angle de contact. Ces notions de superhydrophobicité seront ensuite étendues aux liquides à basse tension de surface (typiquement huile ou alcool) avec l'introduction de la superomniphobicité. Nous verrons que la fabrication de ces surfaces nécessite deux étapes : (i) structuration à l'échelle micro et/ou nanométrique des surfaces et (ii) dépôt d'une couche hydrophobe.

Ensuite, le choix de structurations à base de particules d'oxyde de zinc sera posé pour assurer la compatibilité avec la résonance plasmonique de surface (SPR). Le but ici est de réaliser des capteurs SPR superomniphobes pouvant être utilisés comme contre-électrode des systèmes d'électromouillage sur diélectrique présentés dans le chapitre I. Cet objectif a un double intérêt en permettant à la fois le déplacement par EWOD de liquide mouillant (huile, alcool) mais aussi de limiter l'adsorption non spécifique (biopollution) par la réduction de la zone de contact entre le liquide et la surface [1].

Ces structures étant synthétisées chimiquement, une étude des principaux paramètres sera effectuée avec une caractérisation visuelle au microscope électronique à balayage. Comme nous le verrons, les dimensions de ces structures vont de la dizaine de nanomètres jusqu'à la dizaine de micromètres. Dans la suite de ce manuscrit le préfixe nano sera utilisé pour caractériser les différentes structures obtenues. Trois types de nanostructures synthétisées seront retenus pour la suite de l'étude. Le dépôt de trois différents revêtements non mouillant sera effectué sur les nanostructures pour obtenir des propriétés de superhydro-/superomniphobicité. Les surfaces seront ensuite caractérisées par plusieurs méthodes complémentaires :

- une analyse par spectrométrie photoélectronique X (XPS) de surface permettant d'obtenir une information sur les espèces atomiques présentes en surface et sur leurs liaisons.
- une caractérisation des propriétés de mouillage à la fois de l'angle de contact statique et de l'hystérésis de l'angle de contact.

- une analyse *a posteriori* de la fraction de surface de ces nanotexturations à l'aide d'une molécule fluorescente et d'un logiciel de traitement d'images. Cette analyse permettra aussi d'évaluer l'adsorption non spécifique sur les surfaces et par conséquent leur efficacité à limiter la biopollution.

Enfin, une confrontation des résultats de ces analyses sera effectuée afin de vérifier leur cohérence et de réaliser une comparaison avec les différents travaux présentés dans la littérature.

## **2.1. Mouillage sur surfaces rugueuses**

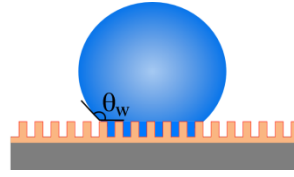
### **2.1.1. Influence de la rugosité sur le mouillage**

Il existe un angle de contact limite (dans un environnement d'air) sur surface plane d'environ  $120^\circ$  au-delà duquel il n'est pas physiquement possible d'aller car l'énergie de la surface ne peut plus être d'avantage diminuée. Pour dépasser cette limite, afin de diminuer la zone de contact entre le liquide et la surface, il est nécessaire d'introduire une rugosité via une structuration de celle-ci. Les premières expériences sur des surfaces rugueuses ont été menées par Dettre et Johnson en 1964 [II2] et ont montré la relation entre la rugosité et l'hystérésis de l'angle de contact d'une goutte d'eau: une faible rugosité entraînant une forte hystérésis et une forte rugosité, une faible hystérésis. Ces expériences ont été remises à l'ordre du jour suite aux observations faites en 1997 par Barthlott et Neinhuis [II3] sur des feuilles de lotus. Une première explication théorique a été introduite en 1999 par Bico *et al.* [II4] à partir de deux modèles simples (Wenzel et Cassie-Baxter) ayant déjà été développés pour le mouillage [II5, II6].

#### **2.1.1.1. Etat de Wenzel**

Dans le modèle de Wenzel, le mouillage sur une faible rugosité est considéré. D'après les observations de Dettre et Johnson, l'hystérésis y est très importante. Il y a donc une imprégnation totale du liquide au sein de la rugosité induite par les structures. L'angle de contact apparent statique est supérieur à  $150^\circ$  reflétant bien le caractère superhydrophobe mais avec une imprégnation du liquide au sein de cette rugosité présente en dessous de la goutte (Figure 17). Cette imprégnation entraîne une forte accroche de la ligne triple sur les structures donnant une hystérésis très importante. Dans ce cas, l'angle de contact apparent sur ces surfaces est donné par la relation (1). Le facteur de rugosité  $r$  est introduit comme étant le rapport entre la surface totale en contact avec le liquide sur la surface équivalente sans rugosité. Ce facteur est toujours supérieur ou égal à 1.

$$\cos \theta_W = r \cos \theta_Y \quad (1)$$

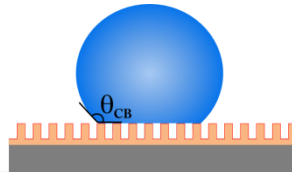


**Figure 17:Schéma représentant une goutte dans l'état de Wenzel**

### 2.1.1.2. Etat de Cassie-Baxter

L'état de Cassie-Baxter est, quant à lui, à l'origine de l'effet déperlant des surfaces appelé « effet lotus ou effet rolling-ball ». Cet état est dû à la forte rugosité de la surface. Dans ce cas, l'angle de contact statique apparent est supérieur à  $150^\circ$  mais l'hystérésis de ces surfaces est quasiment nulle. En effet, la goutte reste en suspension au dessus de la rugosité dans laquelle de l'air se trouve emprisonné (Figure 18). L'équation (2) donne la relation entre l'angle d'Young et l'angle de contact apparent avec l'introduction de la fraction de surface  $\Phi_s$  définie comme étant le rapport de la surface en contact avec le liquide (ici le haut de la rugosité) sur la surface sans rugosité. Cette fraction de surface est toujours inférieure ou égale à 1.

$$\cos \theta_{CB} = \Phi_s \cos \theta_Y + (\Phi_s - 1) \quad (2)$$



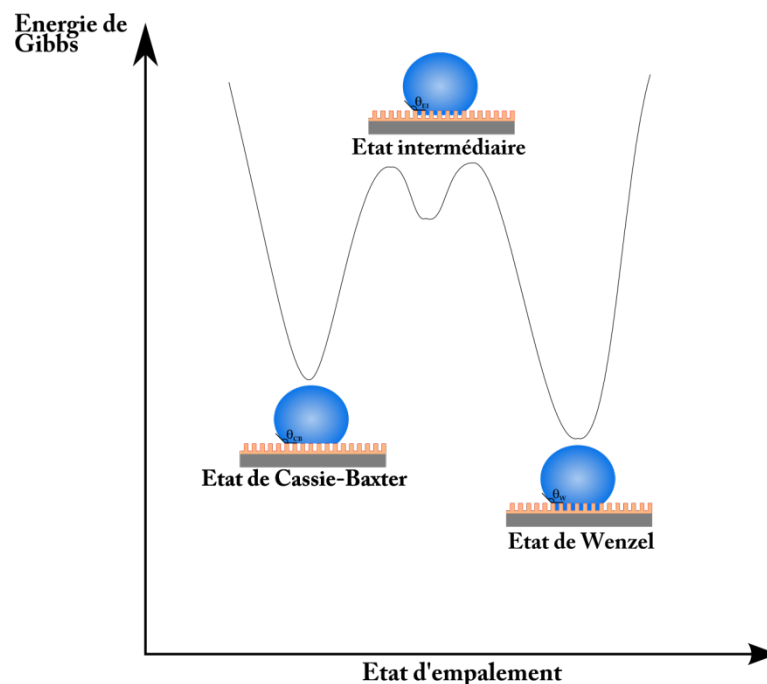
**Figure 18:Schéma représentant une goutte dans l'état de Cassie-Baxter**

### 2.1.1.3. Transitions d'états et états intermédiaires

Les états de Cassie-Baxter et de Wenzel sont deux états extrêmes et aux conséquences sur le mouillage très différentes : le premier présente une faible hystérésis alors qu'elle est très importante pour le second. L'état énergétiquement le plus stable peut être obtenu en égalisant les niveaux d'énergies correspondant aux deux états [II7]. Cette approche introduit un angle critique  $\theta_c$  (Equation 3) pour lequel les deux états sont possibles.

$$\cos \theta_c = \frac{1 - \Phi_s}{r + \Phi_s} \quad (3)$$

Avec cet angle critique, on peut déterminer quel état est le plus stable. Si l'angle d'Young est inférieur à l'angle critique, l'état de Wenzel est le plus stable. Par contre si l'angle d'Young est supérieur à l'angle critique, l'état de Cassie-Baxter est le plus stable. L'état stable dépend donc à la fois du revêtement hydrophobe mais aussi des caractéristiques géométriques de la structuration. Néanmoins, il est possible d'effectuer une transition entre ces deux états par un apport d'une énergie extérieure (thermique [II8], mécanique [II9], excitation électrique [II10]). En pratique, on cherche à privilégier l'état de Cassie-Baxter comme état stable afin d'assurer une grande mobilité à la goutte. Il est donc nécessaire de réaliser des surfaces résistant à l'empalement *i.e.* des surfaces pour lesquelles l'énergie de passage de l'état Cassie-Baxter à l'état Wenzel est très importante. De plus comme le montre la Figure 19, il peut apparaître des états métastables de mouillage intermédiaire. Dans ces états, le liquide imprègne partiellement la rugosité. Les énergies, correspondant aux différents états, sont définies par les énergies de Gibbs, utilisées pour les fonctions d'entropie dans l'étude de systèmes thermodynamiques.



**Figure 19: Vue schématique des niveaux d'énergie en fonction de l'état d'empalement**

Il est aussi possible d'effectuer des transitions entre les différents états d'empalement par franchissement des barrières énergétiques les séparant. Ces barrières dépendent de l'état d'empalement dans lequel la goutte se trouve. Un faible apport d'énergie permettra de quitter les états intermédiaires. Il faudra d'avantage d'énergie pour quitter un état de Wenzel afin d'aller dans un état de Cassie-Baxter car il y aura un coût énergétique nécessaire au désempalement de la goutte.

### 2.1.2. De superhydrophobe à superomniphobe

Des surfaces sur lesquelles des liquides aqueux ou à tensions de surface  $\gamma \geq 72,6 \text{ mN/m}$  ont des angles de contact apparents importants sont appelées surface superhydrophobes. Cependant ces surfaces, dans le cas des liquides présentant une faible tension de surface  $\gamma \leq 50 \text{ mN/m}$  ne permettent pas d'obtenir des angles de contact apparents importants. Le mouillage sur ces surfaces amène à des angles de contact inférieurs à  $90^\circ$ , il peut même y avoir une situation de mouillage total. Nous allons dans cette partie introduire les différentes conditions pour réaliser des surfaces superomniphobes (omni faisant référence à l'ensemble des liquides), qui présentent, pour des liquides à faible tension de surface, un angle de contact apparent supérieur à  $150^\circ$  et une hystérésis faible.

#### 2.1.2.1. Surfaces superomniphobes

D'un point de vue théorique, réaliser des surfaces superomniphobes consiste, à partir d'une surface plane mouillante (angle d'Young inférieur à  $90^\circ$ ), à obtenir une surface structurée présentant un angle de contact apparent supérieur à  $150^\circ$ . Cette condition, par rapport à l'angle d'Young, nécessite l'introduction d'une structuration avec une géométrie bien définie. Nosonovsky a étudié théoriquement des surfaces d'une rugosité multi-échelle composées de piliers avec des parties concaves et convexes [II11].

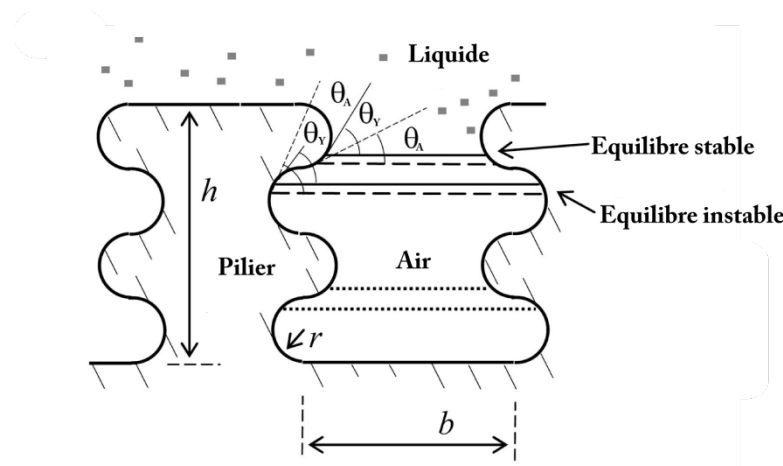
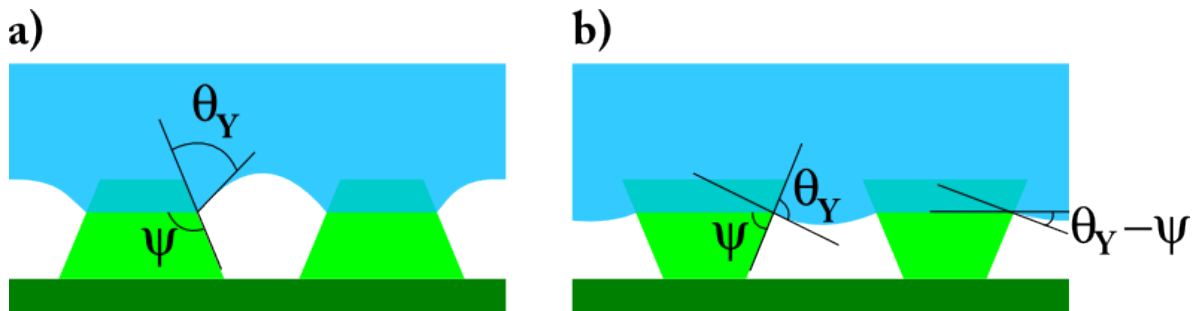


Figure 20: Illustration schématique de l'étude de Nosonovsky [II11]

Son modèle représenté sur la Figure 20 donne plusieurs informations quant à l'équilibre de la ligne de contact selon la courbure du pilier. Les parties convexes permettent un piégeage de la ligne triple car l'avancée de l'interface liquide/air entraîne une diminution de l'angle de contact ( $\theta_A < \theta_Y$ ) et rend l'équilibre stable. Par contre les parties concaves, bien qu'elles permettent des positions d'équilibre correspondant à l'équation d'Young, sont des positions d'équilibre instable car l'avancée de l'interface liquide/air augmente l'angle de contact

( $\theta_A > \theta_Y$ ). Ces observations ont été reprises par Tuteja *et al.* [II12] pour introduire le critère de structure ré-entrante afin de réaliser des surfaces superomniphobes. Cette même démarche a été utilisée par Liu *et al.* [II13] pour réaliser des surfaces superhydrophobes en structurant des surfaces hydrophiles. De plus, Tuteja *et al.* [II14] suggèrent une relation entre l'angle local de la structure  $\psi$  et l'angle d'Young pour expliquer l'importance de l'aspect ré-entrant dans le cadre d'un non-mouillage.

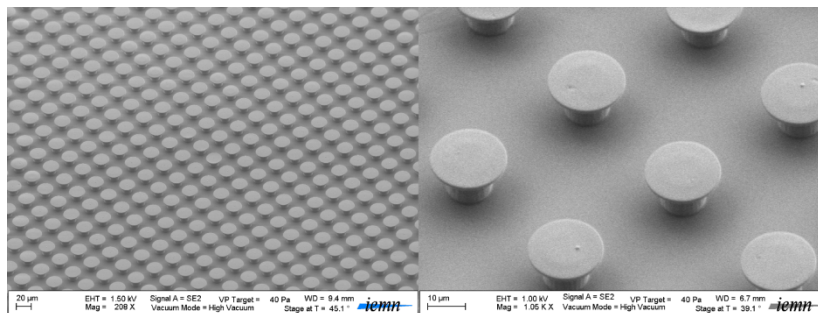


**Figure 21: Vue schématique de l'interface liquide/air dans les cas étudiés par Tuteja *et al.* [II12, II14]**

La Figure 21a illustre le cas où  $\psi > \theta_Y$ . Dans ce cas, la force, due aux tensions de surface s'exerçant sur l'interface liquide-air, est dirigée vers la surface facilitant donc l'imprégnation du liquide dans la structuration et donc le mouillage totale. Par contre dans le cas où  $\psi < \theta_Y$  (Figure 21b), la force à la ligne triple s'exerce vers le haut et empêche le mouillage de la surface. Ces différentes approches permettent d'avoir des critères pour la structuration des surfaces afin d'obtenir la superomniphobicité, à savoir réaliser une structuration ré-entrante.

### 2.1.2.2. Structuration des surfaces

Les premières surfaces superomniphobes ont été réalisées par Tuteja *et al.* [II12] au moyen de piliers en silicium sous-gravés. D'autres surfaces en PDMS utilisant le même critère géométrique ont été réalisées [II15], notamment au sein du groupe BioMEMS de l'IEMN [II16, II17].



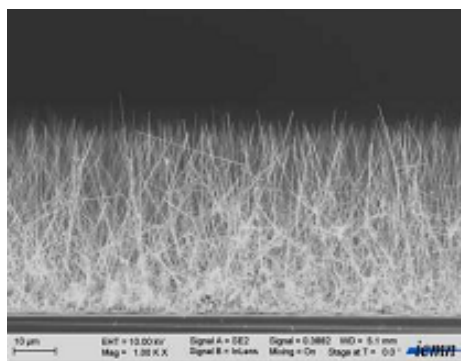
**Figure 22: Exemple de surfaces superomniphobes PDMS réalisées dans le cadre de la thèse de Renaud Dufour [II16]**

Ces surfaces, dont les dimensions caractéristiques sont de l'ordre de la dizaine de micromètres, sont réalisées par photolithographie et recouvertes ensuite d'un revêtement hydrophobe (Figure 22). Elles présentent, pour des états de Cassie, des angles de contact statiques élevés ( $\sim 150^\circ$ ) et des hystérésis d'environ  $40^\circ$  pour une large gamme de tension de surface (27-72mN/m).

D'autres travaux ont été effectués en réalisant des surfaces nanostructurées présentant une propriété omniphobe. Ces surfaces peuvent être fabriquées de différentes manières :

- par une méthode de croissance CVD (Chemical Vapor Deposition) *via* un mécanisme Vapeur-Liquide-Solide (VLS) conduisant à la formation de nanofils de Si [II18] (dépôt à  $500^\circ\text{C}$ ) représentés sur la Figure 23.
- par assemblage de nanoparticules de silice et de polystyrène poreux [II19] (calcination du mélange à  $550^\circ\text{C}$ ).
- par microstructuration de surfaces de Ti couverte de nanotubes de  $\text{TiO}_2$  [II20] (utilisation d'acide fluorhydrique et de fluorure d'ammonium pour la structuration).
- par structuration de surfaces de Si et de nanocristaux de cellulose [II21] (gravure du Si par procédé Bosch).

Dans tous ces cas, l'aspect superomniphobe est obtenu à partir d'un caractère localement réentrant des nanostructures et l'hystérésis pour les liquides mouillants est faible. Dans le meilleur des cas, l'hystérésis de l'angle de contact est de quelques degrés pour  $\gamma=25,6\text{mN/m}$  [II18].



**Figure 23: Exemple de surfaces superomniphobes nanofils Si réalisées dans le cadre de la thèse de TPN Nguyen [II22]**

### 2.1.2.3. Couches à faible tension de surface

Pour obtenir une meilleure robustesse de surface (Etat de Cassie-Baxter), il est nécessaire de recouvrir les structures par un matériau à faible énergie de surface à l'aide d'un traitement de surface. Ces faibles couches sont obtenues par dépôt de molécules fluorées. En fait les tensions de surface obtenues par des groupements  $\text{CF}_3$  et  $\text{CF}_2$  sont beaucoup plus faibles que

celle obtenues par des groupements hydrogénés  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}_2$  [II23]. Ce revêtement de surface peut être réalisé de diverses manières :

- Fonctionnalisation à l'aide d'une couche d'organosilanes ou de thiols, ...  
Avantages : dépôt de faible épaisseur ( $\sim 1\text{-}3\text{nm}$ ) conforme, possibilité d'avoir des groupements  $\text{CF}_3$  selon la molécule utilisée.  
Inconvénients : utilisation de solvants, molécule dépendante du matériau en surface, nécessite une atmosphère inerte dans certain cas.
- Dépôt d'un polymère par spin-coating (Teflon<sup>®</sup>, Cytop<sup>®</sup>, ou autres types)  
Avantages : simplicité et rapidité de dépôt.  
Inconvénients : dépôt épais ( $\sim 10\text{nm}$ ) non conforme si texturation de surface, peu ou pas de liaisons  $\text{CF}_3$ , nécessite un recuit ( $\sim 200\text{-}300^\circ\text{C}$ ) et une tournette.
- Dépôt d'un film par polymérisation plasma d'un gaz fluoré ( $\text{C}_4\text{F}_8, \dots$ )  
Avantages : rapidité de dépôt conforme  
Inconvénients : dépôt épais ( $\sim 10\text{nm}$ ), peu ou pas de liaisons  $\text{CF}_3$ , nécessite un équipement lourd.

Il est important de noter que la couche d'organosilanes nécessite une réactivité de la surface pour la création de liaisons chimiques. De plus, on peut considérer que la fonctionnalisation ne change pas la morphologie de la surface. Le dépôt par spin-coating ou par polymérisation plasma peut, par son épaisseur importante, entraîner une modification de la morphologie.

#### **2.1.2.4. Conclusion**

Il existe différentes contraintes dans notre cahier des charges du système EWOD-SPR qui ne sont pas compatibles avec certaines structurations. En effet nous devons assurer une faible hystérésis pour assurer le déplacement par EWOD et la présence d'une couche d'or au contact du liquide pour assurer une détection par résonance de plasmon de surface. Les surfaces microstructurées réalisées avec le critère de Tuteja ont un grand rapport d'aspect ne permettant pas d'interactions entre le plasmon et le liquide, de plus leur forte hystérésis n'est pas compatible avec un dispositif EWOD. Les surfaces nanostructurées présentent de faibles valeurs d'hystérésis, les rendant compatibles avec l'actuation EWOD. Cependant, certaines de ces nanostructures nécessitent un catalyseur métallique (souvent l'or) pour croître à haute température et donc, ne sont pas utilisables dans un système EWOD-SPR. En effet, cela entraînerait une dégradation de la couche d'or. Ces raisons nous ont fait choisir une méthode de dépôt de nanostructures d'oxyde de zinc par bain chimique à basse température.

## 2.2. Synthèse chimique de nanostructures d'oxyde de zinc

Pour la réalisation de nanostructures sur lames de verre revêtues d'une couche d'or, une méthode de dépôt chimique en bain a été adoptée. La méthode utilisée dans ce travail de thèse est celle proposée par Kokotov et Hodes [II24] qui permet la croissance de nanostructures d'oxyde de zinc (ZnO) sur une large gamme de surface grâce à l'étape de prétraitement des surfaces. De plus, ce dépôt réalisé avec une solution aqueuse d'ammoniaque et d'éthanolamine diffère de nombreuses méthodes décrites dans la littérature [II25-II28] basées sur des solutions d'hydroxyde de sodium, de méthénamine ou d'éthylènediamine. La synthèse étant influencée par un grand nombre de paramètres, l'étude effectuée lors de ce travail ne retiendra que les plus pertinents. Tout d'abord, le protocole expérimental, permettant l'obtention des nanostructures d'oxyde de zinc (NS ZnO), sera détaillé. Une première étude sur l'effet du prétraitement sera faite. Ensuite une observation de l'effet du sel de zinc, de l'éthanolamine et du temps de dépôt sera présentée sur silicium et ensuite sur les lames de verre recouvertes d'une couche mince d'or pour l'application SPR, afin d'observer l'influence éventuelle du substrat.

### 2.2.1. Protocole expérimental

La première étape consiste à nettoyer les échantillons. Ils sont successivement placés dans des bains d'acétone et d'isopropanol avec sonication durant 5min. Les échantillons sont ensuite rincés à l'eau désionisée (EDI) et séchés sous flux d'azote. Afin d'enlever tout résidu organique de la surface, les échantillons sont placés dans un mélange d'acide sulfurique et d'eau oxygénée appelé piranha ( $H_2SO_4/H_2O_2$  1/1 v:v) pendant 15min puis sont rincés à l'EDI et séchés sous azote. Le silicium utilisé est d'orientation <100>, dopé n, résistivité :  $5-10\Omega.cm^{-1}$  Siltronix, France. Les nanostructures seront dans un premier temps directement réalisées sur le silicium, sans ajout d'une couche d'or car le silicium ne peut pas servir de capteur SPR. Cela permettra d'étudier leur morphologie en clivant les substrats. Pour le cas de lames de verre (lame porte-objet, épaisseur=1mm, Gerhard Menzel GmbH, Allemagne), un dépôt métallique de titane/or (5/50nm) est ensuite effectué par évaporation, le titane étant utilisé ici comme couche d'accroche.

Les étapes suivantes correspondent au dépôt de ZnO. Elles sont réalisées dans un bécher en téflon fermé durant la réaction, qui sera placé dans un bain d'huile de silicone chauffé. Tout d'abord, il est nécessaire d'effectuer une étape qui consiste au prétraitement des surfaces. Les paramètres sont donnés dans le Tableau 4.

$KMnO_4$ (mM)	<i>Tert</i> -butanol ( $\mu$ L)	EDI (mL)	Température ( $^{\circ}$ C)	Temps (min)
12,7	50	20	84	20

**Tableau 4: Paramètres optimisés du prétraitement des surfaces**

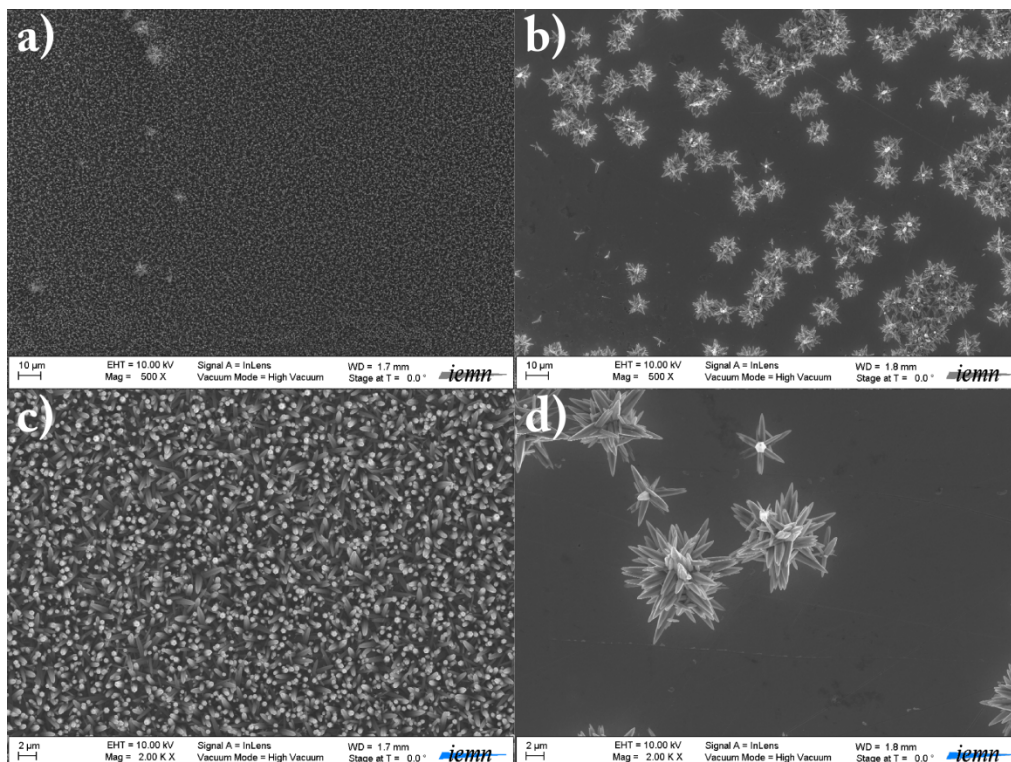
Ensuite les échantillons sont abondamment rincés à l'EDI et placés dans un bain à ultra-sons pendant 10min afin d'enlever toute trace de permanganate de potassium ( $KMnO_4$ ) issue du prétraitement et pouvant entraîner une contamination durant le dépôt des nanostructures. L'étape finale est le dépôt des NS ZnO. Les différents réactifs utilisés sont présentés dans le Tableau 5.

Sel de Zinc (mM)	Ammoniaque ( $\mu$ L)	Ethanolamine (mL)	EDI (mL)	Température ( $^{\circ}$ C)	Temps (min)
34	500	2	17,5	96	40-80

**Tableau 5: Paramètres optimisés de déposition chimique des nanostructures de ZnO**

L'influence des différents types de sels de zinc et du type d'éthanolamine utilisés sera détaillée ultérieurement. Ce dépôt s'effectue dans un bain basique ( $pH \approx 11$ ) dû à la présence d'ammoniaque et d'éthanolamine. Après cette étape de dépôt, les échantillons sont ensuite rincés abondamment à l'EDI et séchés dans une étuve à  $100^{\circ}C$  pendant 1h.

### 2.2.2. Influence du prétraitement



**Figure 24: Photos MEB des nanostructures de ZnO sur silicium avec prétraitement (a et c) et sans prétraitement (b et d)**

L'étape de prétraitement des surfaces consiste en l'activation des surfaces. Cette activation à l'aide de  $\text{KMnO}_4$  a été proposée par Kokotov et Hodes [IIII24] afin de favoriser le dépôt d'un film uniforme de nanostructures de ZnO. En milieu aqueux, le manganèse Mn à l'état d'oxydation +VII du  $\text{KMnO}_4$  est lentement réduit en  $\text{Mn}^{2+}$  sous forme de  $\text{MnO}_2$  (sous forme hydroxylée  $\text{MnO-OH}$  [II24]). L'ajout d'un alcool (ici le *tert*-butanol) permet aussi cette réduction. Le  $\text{MnO}_2$  ainsi formé est adsorbé sur la surface formant des sites de nucléation sous sa forme  $\text{MnO-OH}$  permettant alors la croissance des nanostructures. Les images MEB, présentées sur la Figure 24, montrent bien l'effet du prétraitement sur la surface.

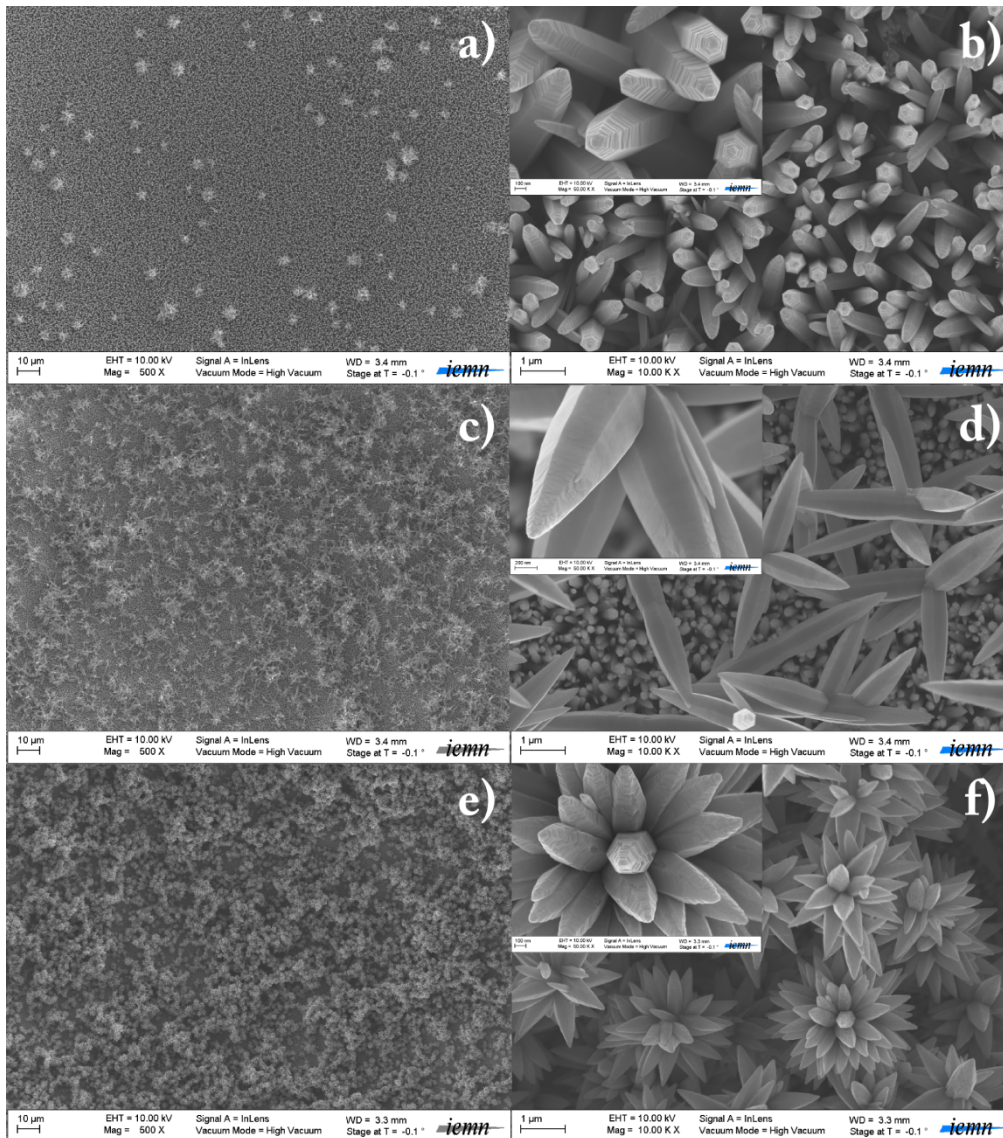
L'activation de la surface de silicium (Figure 24a et c) permet le dépôt d'un tapis de nanostructures homogène tandis que son absence (Figure 24b et c) entraîne la formation de quelques nanostructures éparses (que nous détaillerons plus loin). L'effet de ce prétraitement de la surface a été observé aussi bien sur silicium que sur des lames de verre recouvertes d'une couche mince d'or. Les sites de nucléation étant à l'échelle atomique, ils n'ont pu être imagés par MEB.

### **2.2.3. Dépôt de nanostructures de ZnO sur silicium**

L'objectif de notre étude est de réaliser des nanostructures ZnO sur des lames de verre dorées pour la résonance plasmonique de surface. Néanmoins, dans ce paragraphe, le dépôt de nanostructures de ZnO sera effectué sur du silicium afin d'obtenir une information sur l'épaisseur des films de nanostructures. L'influence du sel de zinc, de l'éthanolamine et du temps de dépôt sera étudiée.

#### **2.2.3.1. Influence de l'anion du sel de zinc**

La nature du sel de zinc utilisé a une grande importance dans le dépôt, notamment sur la morphologie des nanostructures et leurs dimensions, mais aussi sur la cinétique de la réaction. Selon la littérature [II24, II29], cette influence est due à l'anion (contre-ion) associé au zinc dans le sel. Dans cette étude, l'effet sur le dépôt des différents sels de zinc (nitrate de zinc hexahydraté :  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , sulfate de zinc heptahydraté :  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et chlorure de zinc :  $\text{ZnCl}_2$ ) a été étudié. Le choix de ces sels est motivé par la nature atomique des anions ainsi qu'à leur différent degré d'hydratation. Les dépôts sont effectués à concentration en sel de zinc identique, avec la monoéthanolamine et un temps de dépôt de 40 min. Quelque soit le type de sel de zinc, la même structure est observée : présence de nanotexturations, appelées nanorods, recouvertes par un tapis de nanofleurs plus ou moins dense (Figure 25).



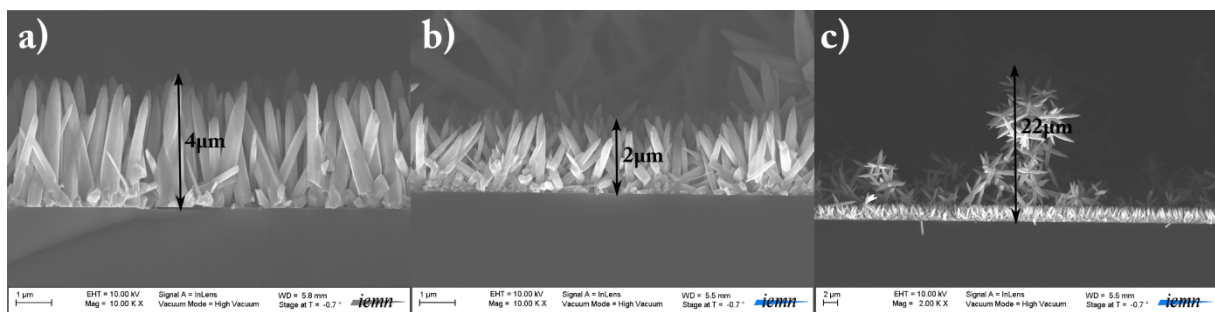
**Figure 25: Photos MEB des nanostructures de ZnO réalisées sur silicium avec a,b)  $Zn(NO_3)_2$ , c,d)  $ZnSO_4$ , et e,f)  $ZnCl_2$**

Les dimensions des nanostructures et la densité du tapis de nanofleurs dépendent du sel de zinc utilisé. Quelque soit le sel, l'aspect général de nanorods est le même. Il s'agit d'une structure de section hexagonale dont la largeur décroît quand on s'éloigne de la base, avec un aspect pyramidal au sommet. Dans chaque cas, la présence d'un tapis de nanorods en surface recouvert d'un tapis de nanofleurs est observée. La nature du sel de zinc utilisé influe sur les dimensions des nanorods (diamètre, apex au sommet des nanorods) qui composent le film sur la surface, mais aussi sur celles qui composent les nanofleurs. La densité et la composition en nanorods, dont sont composées les nanofleurs, dépendent aussi de l'anion associé au zinc dans le sel.

La présence d'atome d'oxygène dans l'anion du sel semble être un facteur important. Quand l'oxygène est absent de l'anion, les nanorods ont un diamètre faible mais il y a présence d'un

tapis de nanofleurs relativement important. Inversement, quand l'anion comporte un nombre important d'oxygène (6 atomes d'oxygène pour 1 atome de zinc pour le nitrate de zinc), le diamètre de nanorods est plus important mais la présence de nanofleurs est faible. Néanmoins la nature du sel de zinc ne semble pas avoir d'influence sur la dimension des nanofleurs qui varie de 1 à 10µm. Globalement, moins il y a d'oxygène dans le contre-ion, plus les structures ont des diamètres faibles et plus le tapis formé par les nanofleurs au-dessus des nanorods est dense.

Le dépôt sur silicium permet de cliver les échantillons afin d'évaluer l'épaisseur du dépôt. La Figure 26 illustre des vues MEB en coupe des échantillons avec des nanostructures de ZnO. Une épaisseur de nanorods importante (4µm) avec le nitrate (Figure 26a) est observée alors qu'avec le sulfate (Figure 26b et c), l'épaisseur est de seulement 2µm. Néanmoins, les agrégats de nanofleurs présents avec le sulfate ont une hauteur de plusieurs dizaines de micromètres (22µm dans le cas présenté sur la Figure 26c).



**Figure 26: Photos MEB de vue en coupe des nanostructures de ZnO sur silicium avec (a)  $Zn(NO_3)_2$  et (b-c)  $ZnSO_4$**

Le Tableau 6 résume les caractéristiques morphologiques des nanostructures de ZnO obtenues sur le Si. Afin de vérifier la reproductibilité, les dépôts ont été réalisés plusieurs fois. Des dépôts identiques ont été obtenus avec le nitrate de zinc et le sulfate de zinc au contraire du chlorure de zinc.

Sel de Zinc	Diamètre des nanorods (nm)	Densité des nanofleurs	Hauteur des nanorods (nm)	Taille des nanorods des nanofleurs (nm)	Images sur Figure 25
$Zn(NO_3)_2$	100-500	Peu dense	4000	200-1000	a) b)
$ZnSO_4$	50-200	Dense	2000	100-1000	c) d)
$ZnCl_2$	-	Très dense	-	-	e) f)

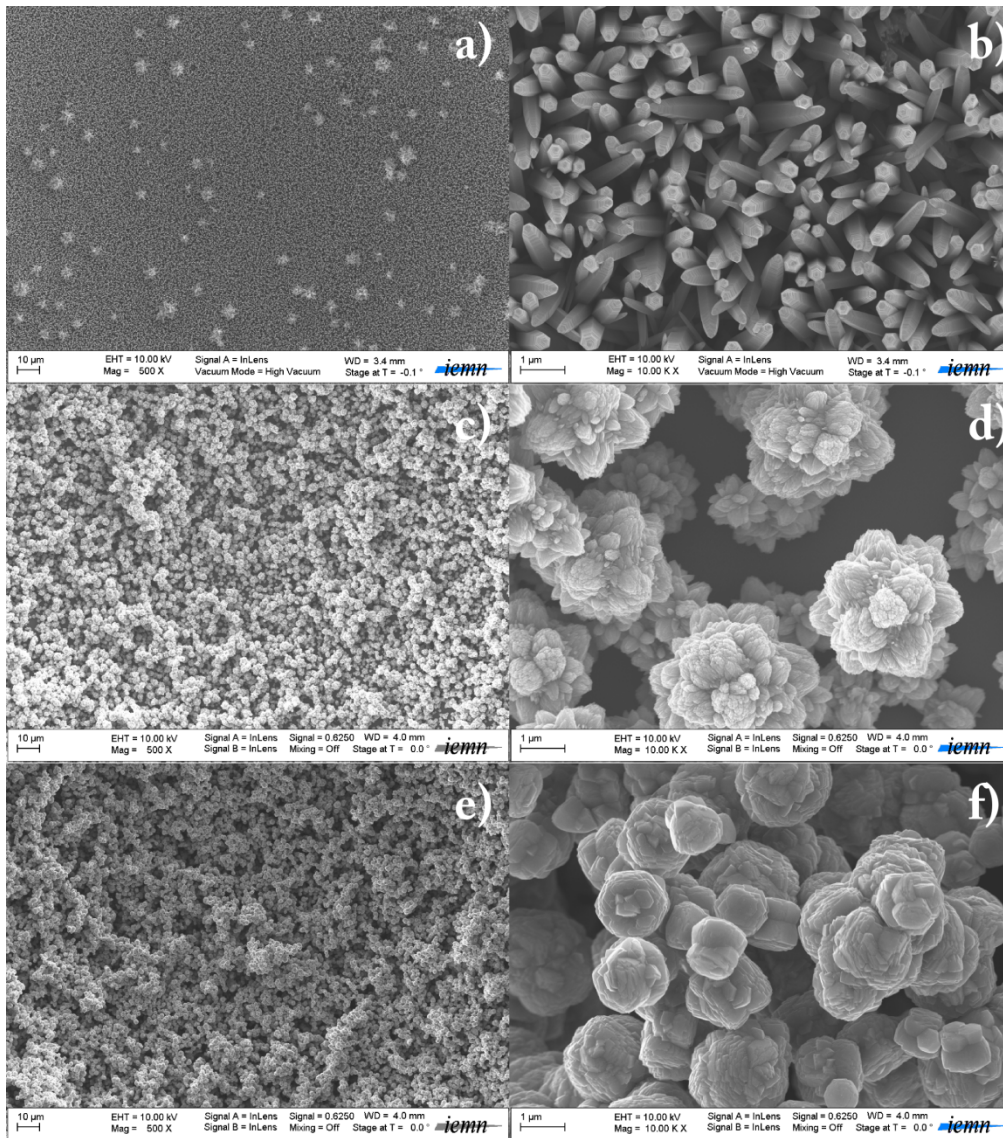
**Tableau 6: Caractéristiques morphologiques des nanostructures de ZnO obtenues sur une surface de silicium en fonction de la nature des sels de zinc**

### 2.2.3.2. Influence de l'éthanolamine

Le type d'éthanolamine est d'une grande importance dans la réaction de dépôt. Les trois différentes éthanolamines utilisées dans cette étude sont la monoéthanolamine (MEA, amine primaire), la diéthanolamine (DEA, amine secondaire) et la triéthanolamine (TEA, amine tertiaire) qui ont chacune des comportements différents du fait de leur degré de substitution (amine primaire, secondaire et tertiaire) et du nombre de groupements hydroxyles. Grâce à ces groupements, ces molécules sont nucléophiles à différents degrés (doublets non-liants sur l'azote et l'oxygène). Les éthanolamines permettent donc la création de complexes avec les ions  $Zn^{2+}$ , qui eux, sont électrophiles. Cette complexation est d'autant plus favorisée que le milieu est basique [II29], ce qui est le cas ici avec l'ammoniaque. Le zinc complexé sous forme  $Zn(OH)_2$  réagit alors avec les sites de nucléation de MnO-OH présents sur la surface pour ensuite former des nanostructures de ZnO. L'influence du type d'éthanolamine sur la forme des nanostructures obtenues est étudiée. Dans le cas du MEA (Figure 27a-b), un tapis de nanorods recouvert de quelques nanofleurs est bien obtenu. Pour la DEA (Figure 27c-d), un tapis formé par des nanofleurs de morphologie différente de celle avec la MEA est observé. Des nanoparticules sont obtenues avec la TEA (Figure 27e-f). Les principales caractéristiques des nanostructures sont récapitulées dans le Tableau 7. Le sel de zinc utilisé pour ces dépôts est le nitrate de zinc et le temps du dépôt est de 40min.

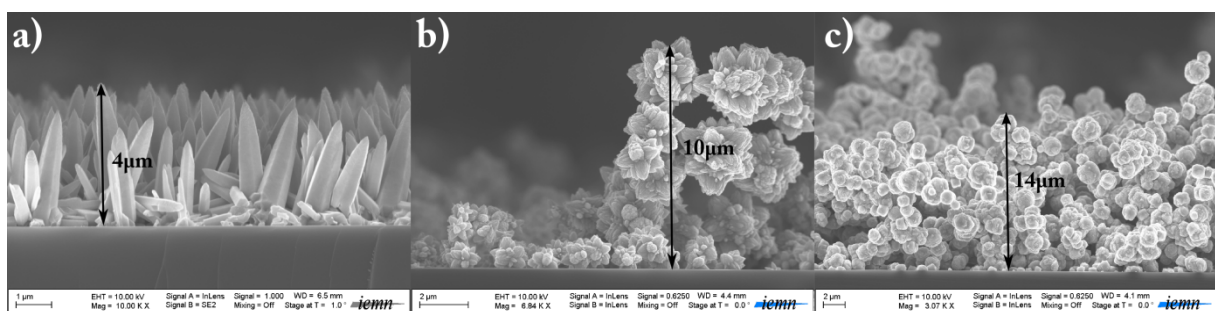
Ethanolamine	Forme des structures	Densité des nanostructures	Diamètre des structures (nm)	Hauteur des nanostructures ( $\mu m$ )	Images sur la Figure 27
MEA	Nanorods	Homogène	100-500	4	a) b)
DEA	Nanofleurs	Hétérogène	1000-4000	1-10	c) d)
TEA	Nanoparticules	Hétérogène	700-3000	10-30	e) f)

**Tableau 7: Propriétés des nanostructures de ZnO déposées sur silicium en fonction de l'éthanolamine utilisée**



**Figure 27: Photos MEB des nanostructures de ZnO réalisées sur silicium avec a,b) MEA, c,d) DEA et e,f) TEA**

Une vue en coupe des échantillons a été effectuée afin d'avoir un ordre de grandeur de l'épaisseur du dépôt pour chaque type d'éthanolamine (Figure 28).

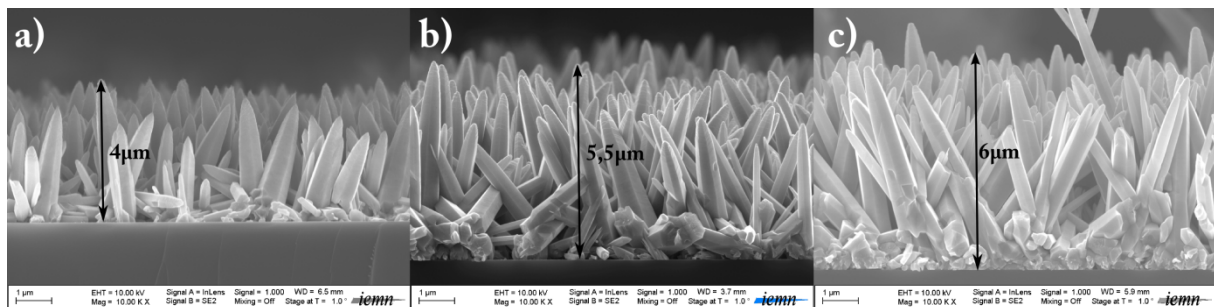


**Figure 28: Photos MEB de vue en coupe sur silicium des nanostructures de ZnO avec a) MEA, b) DEA et c) TEA**

L'absence d'un film de nanorods de ZnO sous des nanostructures est relevée. Une observation de l'épaisseur des films de nanostructures permet de remarquer que plus il y a de groupements –OH dans l'éthanolamine, plus ce film est épais avec toutefois de fortes hétérogénéités pour la DEA et la TEA.

### 2.2.3.3. Influence du temps de dépôt

Afin d'évaluer l'influence du temps de dépôt sur l'épaisseur du film de nanorods formé, trois échantillons de Si ont été placés dans le même bain de dépôt avec MEA et  $Zn(NO_3)_2$  puis retirés un à un successivement après 40, 60 et 80 minutes. Les échantillons sont ensuite clivés afin de réaliser une vue en coupe au MEB. Dans le cas d'un dépôt de 40 min (Figure 29a), le dépôt formé a une épaisseur d'environ  $4\mu m$ . Pour un dépôt de 60 min (Figure 29b), l'épaisseur est d'environ  $5,5\mu m$  et pour 80 min (Figure 29c), elle est d'environ  $6\mu m$ . Au bout de 40 minutes, le dépôt s'effectue à une vitesse d'environ  $100\text{ nm/min}$ . Dans les 20 minutes suivantes (40-60), cette vitesse ralentit à environ  $75\text{ nm/min}$  puis ralentit très fortement pour les 20 dernières minutes (60-80) à environ  $25\text{ nm/min}$ . Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'au début de la réaction, la formation des complexes de zinc est rapide et donc la concentration de nuclei (germes), dans le milieu réactionnel, augmente fortement jusqu'à un maximum. Ensuite la réaction est alimentée jusqu'à une diminution de la formation de ces complexes qui traduit l'épuisement d'un des réactifs.



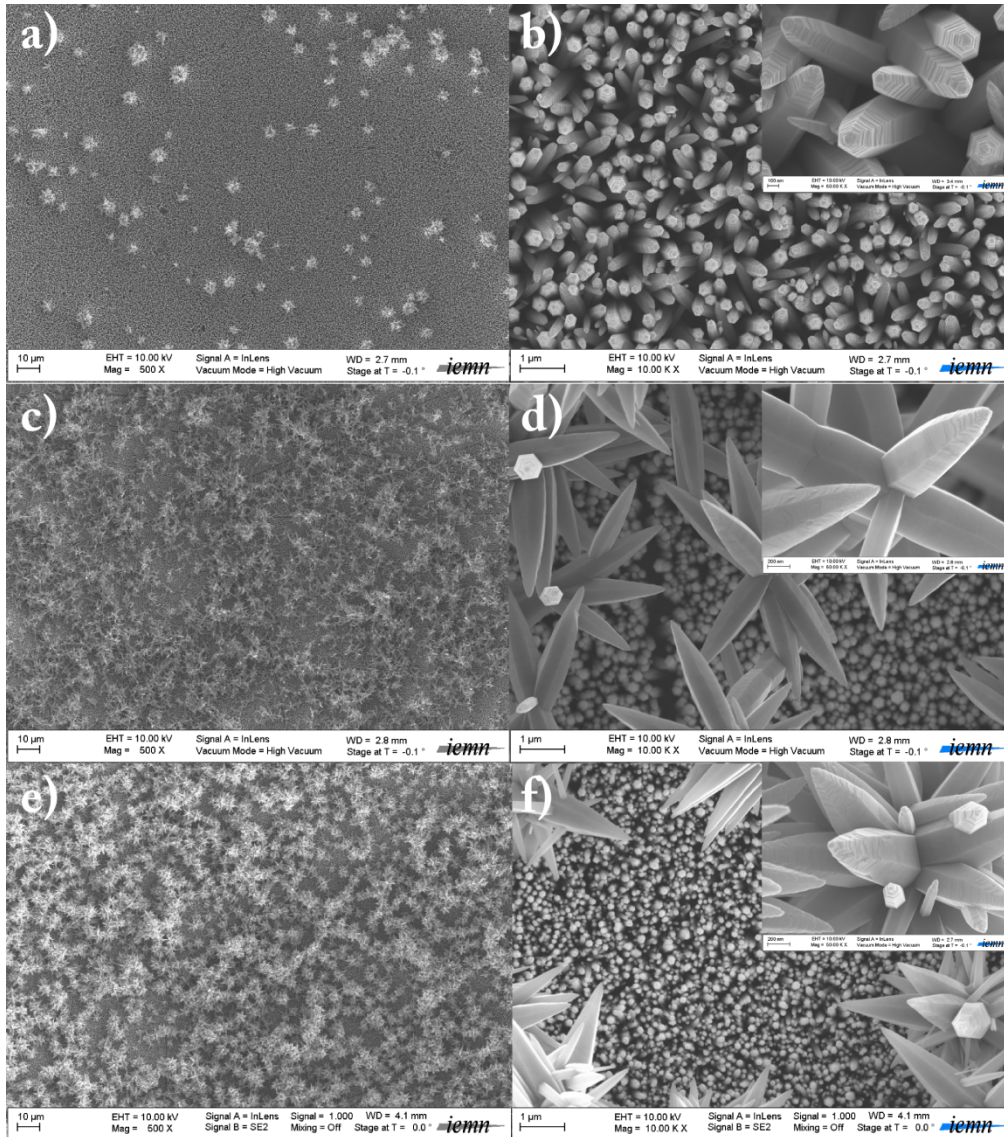
**Figure 29: Photos MEB de vue en coupe de silicium pour différents temps de déposition de ZnO a) 40min, b) 60min et c) 80min**

### 2.2.4. Dépôt sur lame de verre

Après cette première étude de dépôt sur silicium, les dépôts seront effectués à partir de maintenant sur des lames de verre recouvertes d'une couche mince d'or (Ti/Au 5/50nm), compte tenu du contexte applicatif à la détection SPR de ce travail de thèse.

### 2.2.4.1. Influence de l'anion du sel de zinc

L'influence de différents sels de zinc a été aussi étudiée pour le dépôt sur lames de verre/Au. Le dépôt a été réalisé avec des concentrations en sels de zinc identiques, la monoéthanolamine et un temps de dépôt de 40 min. Le résultat est présenté sur la Figure 30.



**Figure 30: Photos MEB des nanostructures de ZnO réalisées sur lame de verre/Au avec a,b) Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, c,d) ZnSO<sub>4</sub>, et e,f) ZnCl<sub>2</sub>**

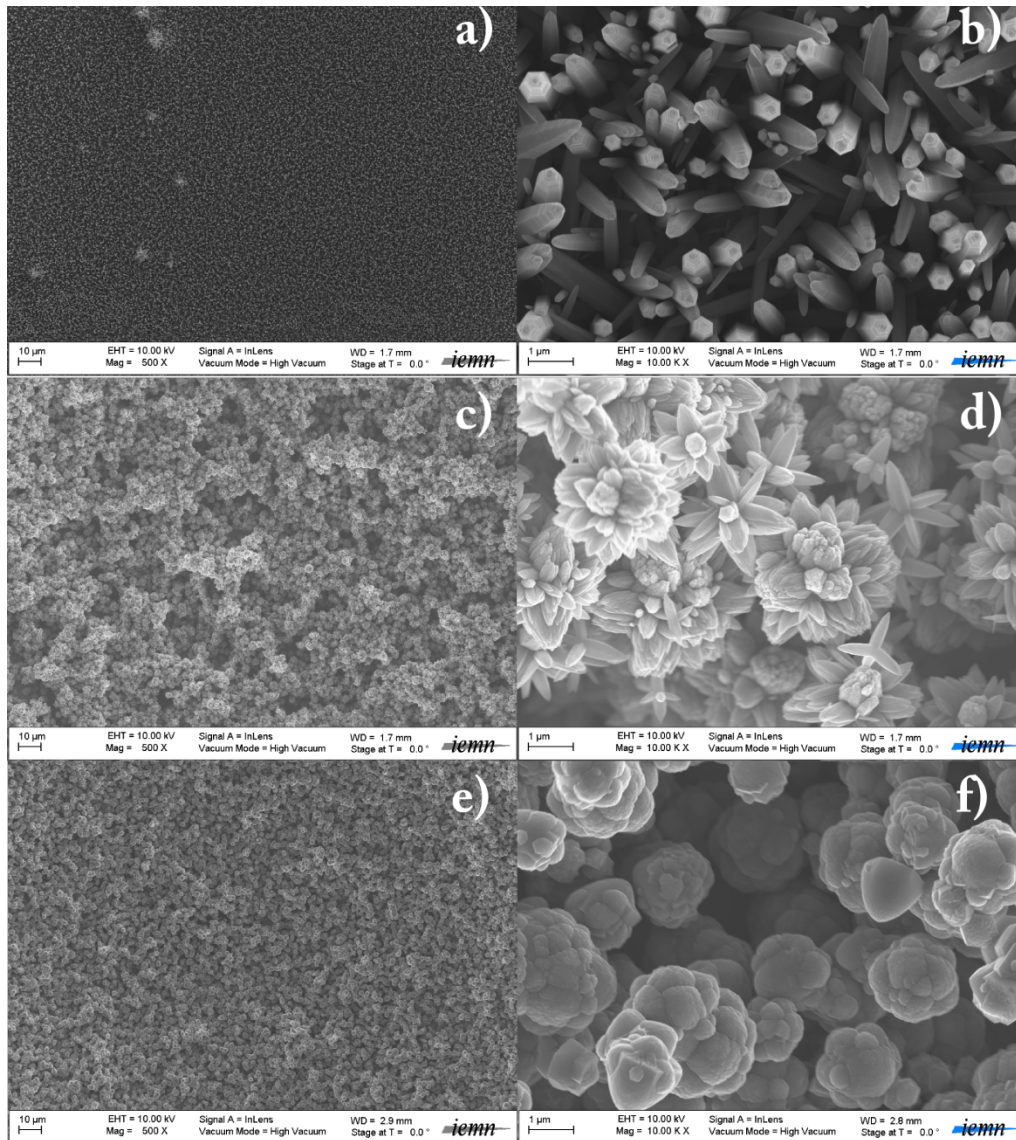
Les principales caractéristiques des nanostructures obtenues avec les différents sels de zinc sont présentées dans le Tableau 8. Les structures obtenues sont identiques à celles obtenues sur le silicium. Les dépôts ont pu être reproduits pour les trois différents sels.

Sel de Zinc	Diamètre des nanorods (nm)	Densité des nanofleurs	Taille des nanorods des nanofleurs (nm)	Images sur Figure 30
<b>Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	100-500	Peu dense	200-1000	a) b)
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	50-200	Dense	100-1000	c) d)
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	20-200	Très dense	200-500	e) f)

**Tableau 8: Propriétés des nanostructures de ZnO pour les différents types de sels de zinc**

#### 2.2.4.2. Influence de l'éthanolamine

Les structures obtenues avec les différentes éthanolamines sont présentées dans la Figure 31. Le sel de zinc utilisé lors de ces dépôts est le nitrate de zinc et le temps de dépôt est de 40min. Les changements de structures sont principalement d'ordre morphologique. La MEA (Figure 31a-b) donne un tapis de nanorods relativement peu dense puis un tapis de nanofleurs. La DEA (Figure 31c-d) permet d'obtenir des nanofleurs de morphologie différente de celle obtenue avec la MEA. En fait, les nanorods de ces fleurs s'agrègent facilement entre eux. Avec la TEA (Figure 31e-f), une autre forme est relevée avec la présence de nanoparticules quasi sphériques dont le diamètre varie de 700 à 4000nm.



**Figure 31: Photos MEB des nanostructures de ZnO réalisées sur verre/Au avec a,b) monoéthanolamine (MEA), c,d) diéthanolamine (DEA) et e,f) triéthanolamine (TEA)**

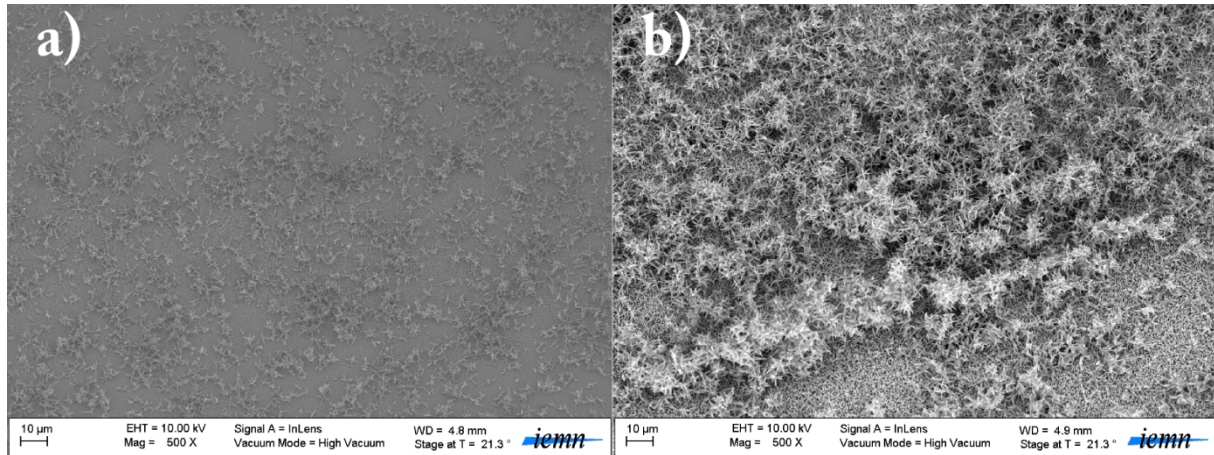
Le Tableau 9 résume les différentes propriétés des différentes éthanolamines utilisées ainsi que le type et la dimension principale de nanostructures obtenues.

Ethanolamine	Forme des structures	Diamètre des structures (nm)	Rugosité de la couche	Images sur Figure 31
<b>MEA</b>	Nanorods	100-500	Film d'épaisseur uniforme	a) b)
<b>DEA</b>	Nanofleurs	1000-4000	Film d'épaisseur variable avec des angles saillants	c) d)
<b>TEA</b>	Nanoparticules	700-4000	Film d'épaisseur variable avec des aspects réentrants	e) f)

**Tableau 9: Propriétés des nanostructures de ZnO sur verre/Au en fonction des différentes éthanolamines**

### 2.2.4.3. Influence du temps de dépôt

Le temps de dépôt n'influe que sur l'épaisseur du tapis formé par les nanostructures. La Figure 32 permet d'observer que, tout d'abord, il y a formation et croissance des nanorods avec la présence de quelques nanofleurs (a) et ensuite formation d'un tapis de nanofleurs (b).



**Figure 32: Photos MEB des nanostructures lame de verre/Au pour différents temps de déposition de ZnO a) 40min et b) 80min**

Pour le dépôt de 40 min (Figure 32a), la densité de nanofleurs est faible bien que quelques amas soient observés. *A contrario*, le dépôt de 80 min (Figure 32b) montre un dépôt extrêmement dense de nanofleurs de dimensions hétérogènes.

### 2.2.5. Conclusion

Pour conclure sur cette partie concernant la synthèse chimique par voie hydrothermale de nanostructures d'oxyde de zinc, nous avons obtenu plusieurs types de structures en faisant varier les différents paramètres intervenant dans la réaction. Tout d'abord, l'importance de la réalisation d'un traitement de surface (pré-dépôt de  $\text{KMnO}_4$ ) a été mise en évidence afin d'obtenir un dépôt sur les surfaces. Kokotov et Hodes [II24] avait déjà observé cet effet du prétraitement. L'étude menée sur des lames de verre/Au a montré :

- La dépendance, selon la nature du sel de zinc, des dimensions et de la morphologie des nanostructures.
- L'influence sur la morphologie des nanostructures du type d'éthanolamine

La morphologie des nanostructures dépend principalement du germe. De nombreux articles ont étudié l'influence des différents paramètres du bain chimique sur le germe et la morphologie en résultant [II25, II29, II30]. Dans le cas de notre étude, les effets du sel de zinc, de la triéthanolamine et de la surface sur la morphologie sont comparables à ce qui est observé dans la littérature [II24, II25, II29, II31]. Il est toutefois difficile d'établir une règle

quant à la morphologie résultant d'un bain spécifique : plusieurs morphologies différentes peuvent être présentes sur une même surface (nanorods et nanofleurs). On peut noter que peu d'études se sont intéressées à l'effet de la diéthanolamine et à l'effet de la surface. Dans notre cas, l'étude sur silicium a montré de grandes similitudes avec les résultats obtenus sur les lames de verre/Au. De plus elles nous ont permis d'avoir une estimation de l'ordre de grandeur de l'épaisseur du dépôt.

De ces différents dépôts, trois principaux types de structures sont obtenus :

- Nanorods : structure hexagonale, obtenus avec des temps de dépôt courts et/ou de faibles concentrations en sel de zinc, d'un diamètre de 20 à 500nm et d'une épaisseur de l'ordre du micromètre.
- Nanofleurs : assemblage de nanorods d'un diamètre de 100 à 1000nm, obtenues au-dessus de la couche de nanorods avec des temps de dépôt longs et/ou de fortes concentrations en sel de zinc, épaisseur de l'ordre de la dizaine de micromètres.
- Nanoparticules : structure d'apparence ronde mais avec des facettes cristallines, d'un diamètre de 700 à 3000nm, obtenues uniquement avec l'utilisation de triéthanolamine et du nitrate de zinc, épaisseur de l'ordre de la dizaine de micromètres.

Dans la suite de ce chapitre, ces trois structures seront étudiées avec les dépôts suivants pour chacune : nanorods ( $\text{ZnSO}_4$ , 40min, MEA), nanofleurs ( $\text{ZnSO}_4$ , 80min, MEA) et nanoparticules ( $\text{Zn(NO}_3)_2$ , 40min, TEA).

### **2.3. Dépôt du revêtement hydrophobe sur les nanostructures**

Comme cela a été décrit dans le paragraphe sur le mouillage, il est nécessaire de recouvrir les nanostructures d'oxyde de zinc d'une couche hydrophobe afin de rendre les surfaces superhydro-/superomniphobes car le ZnO est de nature hydrophile. Dans ce travail de thèse, trois différents dépôts seront étudiés :

- Dépôt par plasma de polymère octafluorocyclobutane ( $\text{C}_4\text{F}_8$ )
- Dépôt en phase vapeur de *1H-,1H-,2H-,2H-*perfluorodecyltrichlorosilane
- Dépôt en phase liquide de *1H-,1H-,2H-,2H-*perfluorodecyltrichlorosilane

Ce choix se justifie par : (i) le fait que ces revêtements contiennent du fluor, les groupements fluorés présentant des tensions de surface plus faibles que les groupements hydrogénés [II23] et (ii) les différentes méthodes de dépôt pouvant avoir une conséquence sur la conformation de surfaces nanotexturées. Ces dépôts sur les différents types de morphologies de ZnO seront,

dans un premier temps, caractérisés par analyse par spectrométrie photoélectronique X (XPS) et dans un deuxième temps nous évaluerons les propriétés de mouillage des surfaces obtenues.

### 2.3.1. Dépôt de fluoropolymère par plasma

Le dépôt de fluoropolymère s'effectue par polymérisation de l'octocyclofluorobutane  $C_4F_8$  à l'aide d'un plasma. Ce procédé est classiquement utilisé comme étape de passivation lors de gravure profonde sur silicium par procédé Bosch. Ce dépôt s'effectue donc dans un bâti de gravure profonde STS (*Surface Technology System, Royaume-Uni*) selon les paramètres présentés dans le Tableau 10.

Gaz	Pression Chambre	Puissance Passivation	Débit du gaz	Temps
$C_4F_8$	949mTorr	1000W	20sccm	10s

Tableau 10: Paramètres de dépôt du  $C_4F_8$  sur les nanostructures de ZnO

### 2.3.2. Couche de perfluorosilane

Ces modifications chimiques de surface consistent en un greffage d'une molécule de *1H-,1H-,2H-,2H-*perfluorodecyltrichlorosilane (PFTS). Cette molécule est un organosilane de la forme  $R-Si-(\Sigma)_3$  et on parlera ici de réaction de silanisation [II32-II34]. La Figure 33 montre le schéma de principe d'une silanisation.

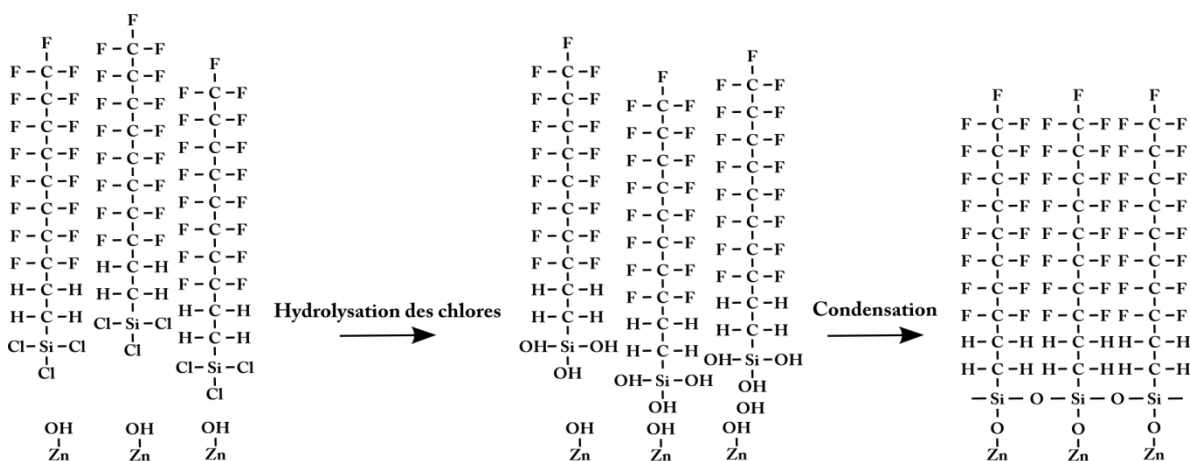


Figure 33: Schéma de principe d'une silanisation

Cette réaction peut être décrite en trois étapes : adsorption sur la surface hydratée du ZnO des molécules de silane, hydrolyse des chlorures et formation des silanols (Si-OH). Les groupes hydroxyles du silane et de la surface ZnO se rapprochent, formant des liaisons hydrogènes, pour donner après condensation, un réseau tridimensionnel lié à la surface du ZnO par l'intermédiaire de liaisons Zn-O-Si.

Afin de réaliser une silanisation des NS de ZnO, ces surfaces sont, tout d'abord, nettoyées de tout résidus organiques puis oxydées par ozonolyse à l'aide d'un appareil UV-Ozone (UVO Cleaner, Jelight Company Inc., Etats-Unis) pendant 30min. Cette étape permet également d'activer la surface, c'est à dire de créer des groupements hydroxyles réactifs sur la surface de ZnO. Ces groupements hydroxyles vont venir réagir avec les groupements hydroxyles du silane après hydrolyse des chlorures avec l'eau physisorbée dans le cas d'utilisation de solvants anhydres [II35]. La teneur en eau apparaît donc comme un paramètre essentiel dans la réaction de greffage [II36]. Ainsi, il est important de conserver une certaine quantité d'eau à la surface du ZnO. Par contre, au cours de la silanisation, les liaisons de type Zn-O-Si peuvent être formées entre les silanols du silane et les hydroxyles de la surface, et/ou entre les silanols de deux groupes voisins du silane. Dans ce dernier cas, la condensation conduit à la formation d'une couche hétérogène d'épaisseur non contrôlée [II37]. Ce type de réaction est peu reproductible et dépend du silane utilisé. Afin de résoudre ce problème, Hair et Tripp [II38] ont mis en évidence la possibilité de faire la réaction de silanisation en milieu anhydre en présence d'une base comme catalyseur. La triéthylamine est souvent utilisée. De plus, les solvants et les réactifs utilisés peuvent être distillés afin de limiter l'apport d'eau et d'impuretés.

Dans notre étude le greffage chimique du PFTS a été réalisé au moyen de deux méthodes différentes :

- En milieu liquide : un mélange d'hexane (50mL) et de PFTS (5 $\mu$ L) est réalisé en boîte à gants sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>) dans un bécher en téflon avec un couvercle. Le mélange est ensuite placé dans un réfrigérateur à -10°C dans lequel sont ensuite placées les surfaces. Cette fonctionnalisation est réalisée à -10°C car Brzoska *et al.* [II39] ont montré qu'il existe une température de transition en-dessous de laquelle le greffage de la molécule se fait de façon optimale pour obtenir une surface à basse tension de surface. Les surfaces sont immergées dans ce mélange durant 4h. Les surfaces sont ensuite rincées successivement trois fois dans des bains de dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) de 3 min, sous agitation orbitale.
- En phase vapeur : Un volume de 50 $\mu$ L est versé dans une petite fiole et placé dans un dessiccateur dans lequel se trouvent les surfaces. Après des purges à l'azote afin de retirer tout l'air, le dessiccateur est laissé sous vide (statique, P<sub>vide</sub>~0,1mbar) à température ambiante durant 4h. Dans cette dernière méthode, l'apport d'eau est dû à l'eau physisorbée. L'absence de solvant va éviter l'apport d'eau supplémentaire et d'impuretés et permettra de limiter les phénomènes de polymérisation mentionnés plus haut.

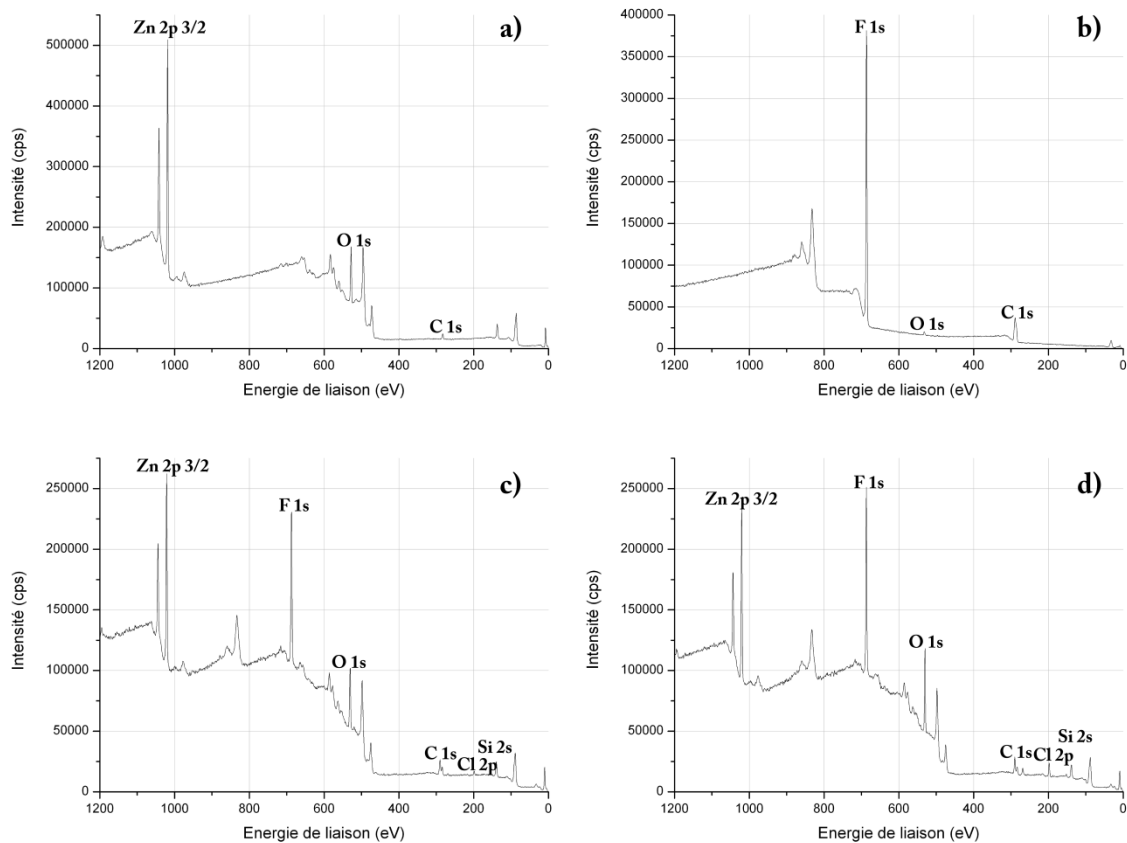
## **2.4. Analyse XPS de la composition chimique des surfaces**

Afin d'analyser la composition élémentaire des surfaces, une caractérisation par XPS est réalisée sur les nanostructures de ZnO recouvertes de perfluorosilane ou de fluoropolymère. Cette analyse, qui sonde le matériau sur une épaisseur de quelques nanomètres, permettra d'obtenir des informations qualitatives de la surface, autrement dit, nous renseignera sur les espèces atomiques présentes à la surface ainsi que sur leur environnement, c'est à dire leurs liaisons avec d'autres atomes (ex : degré d'oxydation...)( voir Annexe 6 pour plus de détails). Ces informations, nous permettront d'estimer la qualité des couches formées ou déposées sur les structures de ZnO. Il est nécessaire de noter ici que l'aspect nanostructuré de nos surfaces va limiter l'interprétation de l'analyse car le volume sondé par le faisceau de rayons X est hétérogène (vide/matériau). Les résultats présentés, dans cette partie, ne permettront qu'une étude qualitative des différentes couches. Néanmoins ces estimations par rapport à la qualité des couches pourront être confrontées aux propriétés de mouillage de la surface.

Les analyses XPS de ce travail de thèse ont été réalisées par la Plateforme régionale d'analyse de surface (Université de Lille 1).

### **2.4.1. Spectres globaux et composition atomique des surfaces**

Tout d'abord, un spectre global de l'échantillon est effectué afin de déterminer, en première approche, quelles sont les espèces atomiques présentes en surface et leur pourcentage respectif. Le spectre global est réalisé de 0 à 1200eV avec un pas de 1eV. La Figure 34 présente les spectres globaux pour des surfaces de NP ZnO non fonctionnalisées et celles modifiées avec les différents revêtements hydrophobes. Les pics correspondant aux éléments atomiques d'intérêt (Zn, F, C, O, Si et Cl), sont indiqués. Les autres raies correspondent à des pics Auger ou des raies XPS d'autres orbitales atomiques.



**Figure 34: Spectres XPS de survol sur des surfaces de NP : (a) non modifiées, (b) avec dépôt de C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, (c) modifiées avec PFTS en phase vapeur V, (d) et en phase liquide L**

Le Tableau 11 indique la concentration atomique, en %, des éléments présents en surface. Sur les surfaces nanostructurées non modifiées (Figure 34a), la présence de zinc et d'oxygène est observée avec toutefois deux fois plus d'oxygène que de zinc. De plus, une relativement forte concentration en carbone (~19% des atomes sondés) est relevée dénotant une probable contamination de la surface malgré le traitement UV-Ozone réalisé sur la surface avant l'analyse XPS. Concernant l'analyse de la surface après dépôt de C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, le film formé lors de la polymérisation (~ 30 nm) est plus épais que la profondeur sondée par les rayons X (de quelques nm). Dans ce cas, le signal du zinc a disparu et l'oxygène est présent en faible quantité.

Revêtement	Nanostructures	F 1s	Zn 2p 3/2	O 1s	C 1s	Cl 2p	Si 2s
<b>Non modifié</b>	Moyenne de toutes	n.d.	27±0,5	54 ±1,5	19 ±1,5	n.d.	n.d.
<b>C<sub>4</sub>F<sub>8</sub></b>	Nanorods	57	n.d.	1	42	n.d.	n.d.
	Nanofleurs	57,5	n.d.	0,5	42	n.d.	n.d.
	Nanoparticules	59,5	n.d.	1	39,5	n.d.	n.d.
<b>PFTS L</b>	Nanorods	51	3,5	11,5	30	1,5	2,5
	Nanofleurs	50	4	12	30	1,5	2,5
	Nanoparticules	40	8	21	29	1	1
<b>PFTS V</b>	Nanorods	35,5	7	23	27,5	5	2
	Nanofleurs	40	5,5	20	27,5	5	2
	Nanoparticules	38,5	6	22,5	25,5	5	2,5

**Tableau 11: Concentration atomique en % des éléments présents sur la surface**

Afin d'estimer la qualité du dépôt sur les différentes surfaces, plusieurs ratios seront calculés et comparés avec la valeur théorique. Tout d'abord, le ratio C/F (nombre d'atomes de carbone/nombre d'atomes de fluor) permettra d'évaluer pour chaque revêtement s'il y a une autre source de carbone que le revêtement. Ceci entraînera donc majoritairement la présence de groupements CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub> plutôt que des groupements CF<sub>3</sub> ou CF<sub>2</sub>. Dans le cas du PFTS L et V, les ratios F/Si (nombre d'atomes de fluor/nombre d'atomes de silicium) et C/Si (nombre d'atomes de carbone/nombre d'atomes de silicium) permettront d'avoir une information sur la qualité de la couche organique.

Dans le cas du C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, le ratio théorique C/F est de 0,5 (4/8). Sur les nanorods, les nanofleurs et les nanoparticules, ce ratio est respectivement de 0,73; 0,72 et 0,66. Le dépôt sur les nanoparticules possède le ratio le plus proche de la valeur théorique alors que les ratios sur les nanorods et les nanofleurs sont à peu près égaux et plus éloignés de la valeur théorique. Globalement, les couches sont de bonne qualité.

Pour le PFTS L ou V (C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>F<sub>14</sub>SiCl<sub>3</sub>), les ratios théoriques C/F, F/Si et C/Si sont respectivement de 0,588 (10/17); 17 (17/1) et 10 (10/1). Pour le PFTS L, la fonctionnalisation sur les nanorods est celle qui présente les ratios expérimentaux (0,587; 20,245; 11,889) les plus proches des valeurs théoriques. Les ratios expérimentaux pour les nanofleurs (0,595; 22; 13,088) sont plus éloignés des valeurs théoriques. Pour les nanoparticules, les ratios

expérimentaux (0,724; 38,413; 27,798) sont très éloignés des valeurs théoriques notamment pour les ratios F/Si et C/Si. A part pour les NP où les écarts importants semblent révéler une polymérisation de la couche de PFTS L, les couches semblent être de bonne qualité. Cette surface (NP PFTS L) analysée par XPS est différente des surfaces (NP PFTS L) qui ont été utilisées pour caractériser les propriétés de mouillage.

Pour la fonctionnalisation au PFTS V, ce sont les nanoparticules qui présentent les ratios expérimentaux (0,667; 15,884; 10,599) les plus proches des ratios théoriques, ensuite ce sont les nanofleurs (0,69; 15,861; 10,944) puis les nanorods (0,783; 17,194; 13,466).

Pour conclure sur les analyses XPS des fonctionnalisations avec le PFTS, la qualité de la couche dépend à la fois du mode de dépôt mais aussi du type de structures. Globalement le dépôt semble satisfaisant dans tous les cas sauf pour le PFTS L sur NP où il y a *a priori* une polymérisation du PFTS.

#### 2.4.2. Spectre de haute résolution du carbone

Afin d'obtenir une information plus précise sur la nature de liaisons présentes en surface, des spectres de haute résolution sont réalisés pour des espèces atomiques d'intérêt. Pour des raisons pratiques et d'intérêt scientifique, nous avons choisi de ne présenter ici que les spectres de haute résolution du C1s.

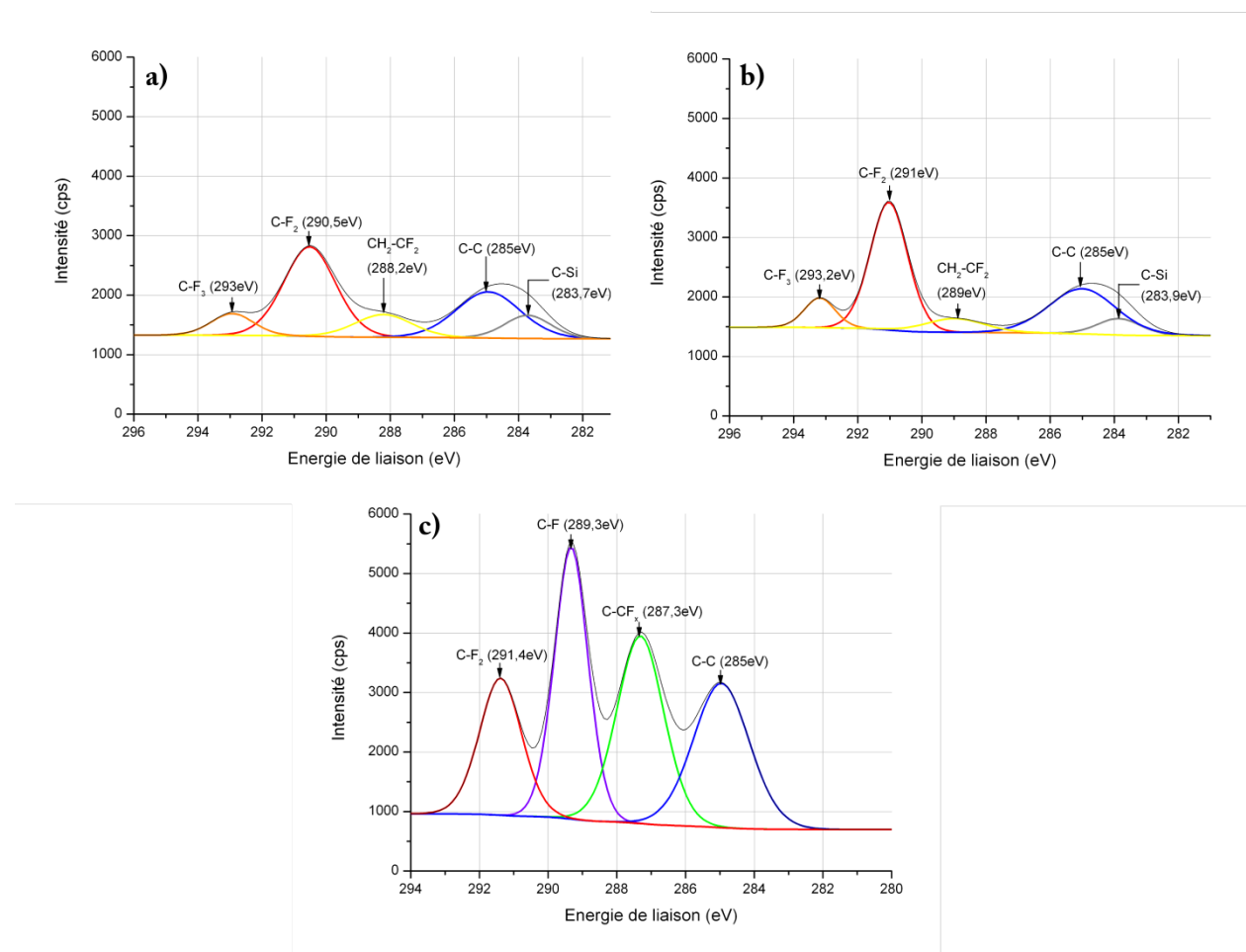
Revêtement	Nanostructures	C-F <sub>3</sub>	C-F <sub>2</sub>	C-F	CH <sub>2</sub> -CF <sub>2</sub>	C-CF <sub>x</sub>	C-C	C-Si
<b>C<sub>4</sub>F<sub>8</sub></b>	Nanorods	-	291,4	289,4	-	287,3	285	-
	Nanofleurs	-	291,4	289,3	-	287,3	285	-
	Nanoparticules	-	291,4	289,3	-	287,3	285	-
<b>PFTS L</b>	Nanorods	292,9	290,7	-	288,8	-	285	284,1
	Nanofleurs	293,3	291,1	-	288,9	-	285	284,1
	Nanoparticules	293	290,5	-	288,2	-	285	283,7
<b>PFTS V</b>	Nanorods	293,2	291	-	288,6	-	285	284,1
	Nanofleurs	293,2	291	-	288,3	-	285	283,9
	Nanoparticules	293,2	291	-	289	-	285	283,9

**Tableau 12: Position des pics en eV des chaque composante des spectres de haute résolution du carbone pour les différentes nanostructures et les différents revêtements**

Les spectres sont calibrés par rapport à la composante de la liaison C-C à 285 eV. Le Tableau 12 récapitule la position des pics et la liaison chimique associée pour les spectres de haute résolution du carbone. Un exemple de spectre de haute résolution est représenté sur la Figure 35.

Dans le cas du dépôt de  $C_4F_8$ , la position des pics est identique pour chacune des composantes.

Pour le PFTS L et V, les différents pics sont quasiment à la même position. Pour le pic  $C-F_3$ , la position est autour de 293eV. Avec la liaison  $C-F_2$ , le pic se situe autour de 291eV. Le pic de la liaison  $CH_2-CF_2$  est autour de 288,5eV. Le pic C-C qui sert de référence est à 285eV. Le dernier pic dont l'énergie est inférieure à celle du pic C-C, signifie que le carbone est lié à un élément moins électronégatif que le carbone, il s'agit donc de la liaison C-Si à environ 284eV. La position de ces différents pics est comparable à ce qui est trouvé dans la littérature [II40, II41] et indique qu'il y a eu un greffage de la molécule sur la surface.



**Figure 35: Spectres de haute résolution du carbone sur nanoparticules avec a) PFTS L, b) PFTS V et c)  $C_4F_8$**

### 2.4.3. Conclusion

L'analyse XPS des différents revêtements sur les différentes nanostructurations a permis dans un premier temps, à l'aide des concentrations atomiques en C, F et Si, de définir quelles couches étaient globalement de bonne qualité par confrontation des valeurs théoriques aux valeurs expérimentales en calculant les ratios C/F, C/Si et F/Si. Ces ratios ont montré que les nanoparticules présentent la meilleure couche pour le PFTS V et le C<sub>4</sub>F<sub>8</sub> et semble-t-il une polymérisation du PFTS L. C'est l'inverse pour les nanorods qui présentent la meilleure couche pour le PFTS L et la plus mauvaise couche pour le PFTS V et le C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>. Les nanofleurs sont le cas intermédiaire en étant des fois proche de la meilleure couche (PFTS V) ou proche de la plus mauvaise couche pour le C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>. Pour les couches de PFTS, les spectres de haute résolution du carbone ont bien prouvé la fonctionnalisation de la surface par le PFTS. Cependant, la densité de cette fonctionnalisation n'a pas pu être déterminée du fait de la nanostructuration de la surface.

### 2.5. Caractérisations des propriétés de mouillage

Comme cela a été développé dans le premier paragraphe, les propriétés de mouillage d'une surface sont définies par deux paramètres : l'angle de contact statique et l'hystérésis de l'angle de contact. Dans ce paragraphe, les propriétés de mouillage des différentes nanostructures de ZnO (ZnO NS) que sont les nanorods (ZnO NR), les nanofleurs (ZnO NF) et les nanoparticules (ZnO NP), chacune avec trois revêtements différents, seront caractérisées à l'aide d'un goniomètre (*DSA100, Krüss GmbH, Allemagne*) et son logiciel d'analyse DSA3. La précision de la mesure est de  $\pm 2^\circ$ . Les mesures d'hystérésis de l'angle de contact seront réalisées par inclinaison de la surface (tilting, Annexe 1). Des mélanges d'eau désionisée (EDI) et d'éthanol (EtOH) seront utilisés pour obtenir une gamme de tension de surface  $\gamma$  allant de 35 mN/m à 72,6 mN/m (Tableau 13) avec une viscosité restant quasiment constante (de  $1 \cdot 10^{-3}$  à  $1,2 \cdot 10^{-3}$  kg.(m.s)<sup>-1</sup> pour l'EDI et l'éthanol pur respectivement à 20°C et 1atm). Les tensions de surface des différents mélanges sont mesurées par méthode de la goutte pendante sur le goniomètre. Les mesures sont effectuées juste après le dépôt de goutte pour éviter l'évaporation de l'éthanol. La variation de la tension de surface du liquide permettra dans un premier temps de connaître le caractère superhydro-/superomniphobe des surfaces et ensuite de connaître leurs propriétés de déperlance. Chaque mesure est réalisée sur trois surfaces différentes avec des gouttes de  $8 \pm 0,1 \mu\text{L}$ , la valeur donnée correspond alors à la moyenne, les barres d'erreur représentent les écarts-types.

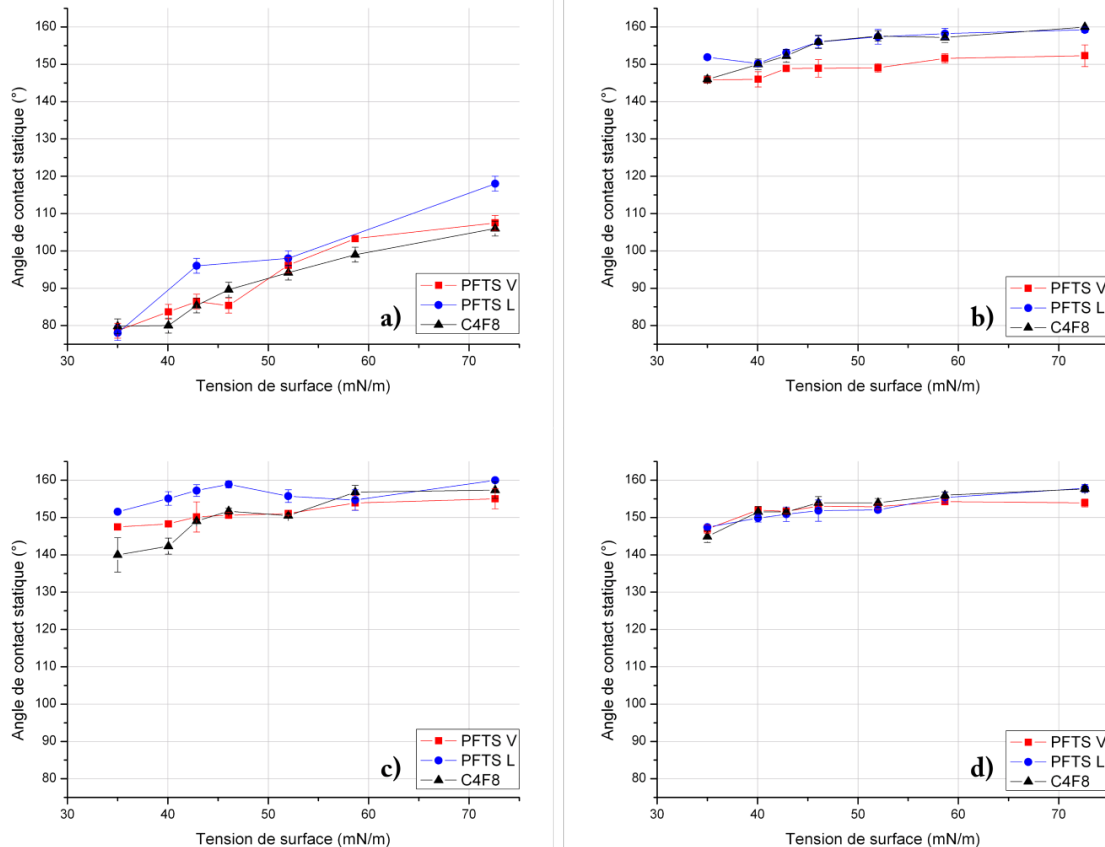
Liquide	$\gamma$ (mN/m)
EDI 100 (%)	72,6
EDI + EtOH 95/5 (%)	58,7
EDI + EtOH 90/10 (%)	52,0
EDI + EtOH 85/15 (%)	46,0
EDI + EtOH 80/20 (%)	42,9
EDI + EtOH 75/25 (%)	40,0
EDI + EtOH 70/30 (%)	35,0

**Tableau 13: Valeurs des tensions de surface pour chaque mélange EDI/EtOH**

### 2.5.1. Angle de contact statique

L'étude de l'angle de contact statique  $\theta_s$  permet de définir le caractère hydro/omniphobe des surfaces. La Figure 36 illustre l'évolution de  $\theta_s$  en fonction de la tension de surface  $\gamma$  sur a) surface plane, b) nanorods de ZnO, c) nanofleurs de ZnO et d) nanoparticules de ZnO recouvertes de différents revêtements hydrophobes.

Tout d'abord, pour le cas de la surface plane (Figure 36a), le comportement des différents revêtements est quasi-similaire. L'angle de contact décroît quand la tension de surface décroît. Les courbes correspondant au PFTS V et au  $C_4F_8$  décroissent d'un angle de contact de  $105^\circ$  pour  $\gamma=72,6$  mN/m (eau) à  $75^\circ$  pour  $\gamma=35$  mN/m (mélange eau/éthanol). Celle du PFTS L décroît d'un angle de contact de  $120^\circ$  à  $75^\circ$ . Ces courbes permettent aussi de déterminer, pour chaque revêtement, la tension de surface critique  $\gamma_C$  engendrant la transition d'un état non-mouillant ( $\theta_s=\theta_Y>90^\circ$ ) à un état mouillant ( $\theta_s=\theta_Y<90^\circ$ ).  $\gamma_C$  semble différer selon le revêtement utilisé car elle est comprise entre 35-43 mN/m pour le PFTS L et entre 46-52mN/m pour le PFTS V et le  $C_4F_8$ . D'après ces constatations, le revêtement PFTS L semble avoir les meilleures propriétés omniphobes car son  $\gamma_C$  est plus faible que les autres.



**Figure 36: Evolution de l'angle de contact statique en fonction de la tension de surface pour différents revêtements omniphobes sur a) surface plane, b) nanorods de ZnO, c) nanofleurs de ZnO et d) nanoparticules de ZnO**

D'un point de vue global,  $\theta_s$  sur les différentes nanostructures (Figure 36b-d), est compris entre 140 et 160° et décroît avec  $\gamma$ . L'effet du revêtement sera d'abord observé sur chaque nanostructure.

Pour les nanorods, la variation de  $\theta_s$  avec le PFTS L et C<sub>4</sub>F<sub>8</sub> est quasiment identique pour  $\gamma > 40$  mN/m et  $\theta_s$  est compris entre 150-160°. La seule différence demeure pour  $\gamma = 35$  mN/m, pour lequel  $\theta_s$  est d'environ 152° pour le PFTS L et d'environ 145° pour le C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>. L'angle de contact statique est légèrement plus faible pour le PFTS V (moins de 10° d'écart). Il varie entre environ 152° pour  $\gamma = 72,6$  mN/m et 145° pour  $\gamma = 35$  mN/m. La fonctionnalisation de surface avec le PFTS L permet donc d'obtenir des angles statiques les plus importants sur nanorods.

Sur les nanofleurs, il y a de fortes disparités selon le revêtement.  $\theta_s$  est compris entre 150-160° pour le PFTS L alors que le PFTS V et le C<sub>4</sub>F<sub>8</sub> présentent des  $\theta_s$  inférieurs de 5° à 10° à ces valeurs pour  $\gamma \leq 52$  mN/m.

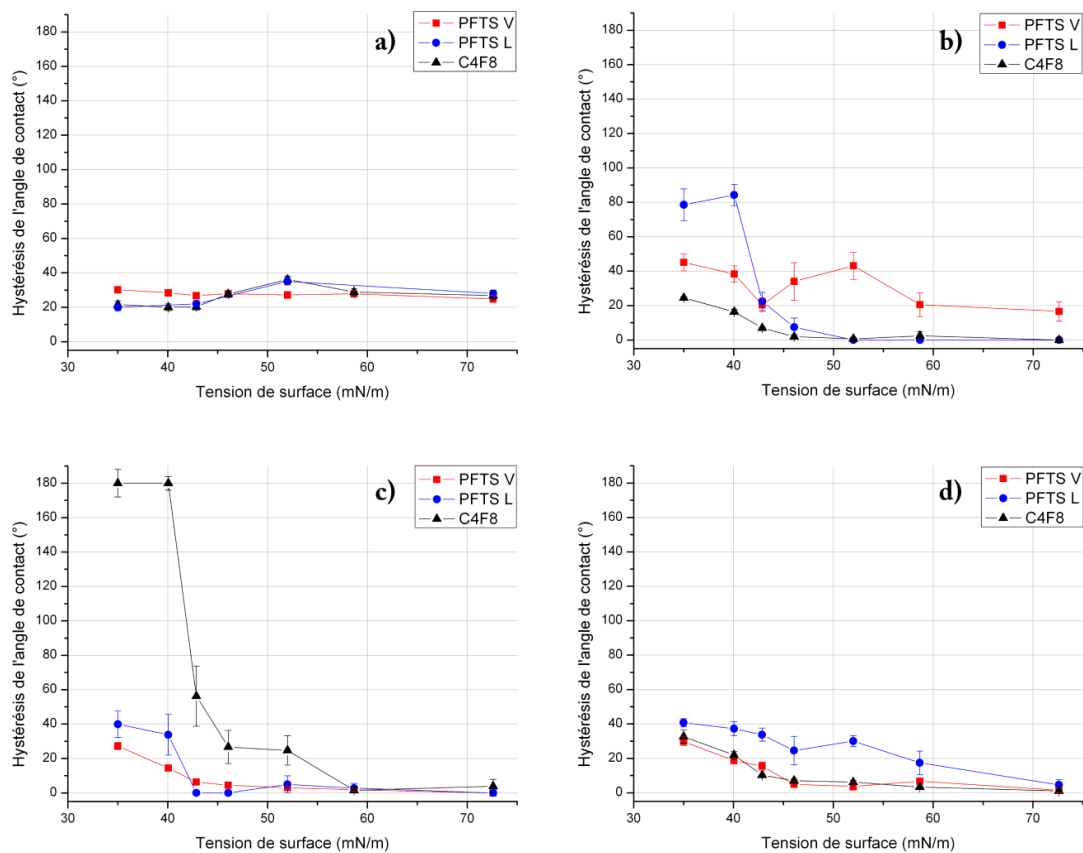
Sur les nanoparticules, une diminution monotone de  $\theta_s$  de 157° à 145° est observée pour les trois revêtements avec des tensions de surface allant de 72,6 à 35 mN/m.

Considérons maintenant un même revêtement, pour analyser l'effet de la nanostructuration. Dans le cas du  $C_4F_8$ , une décroissance linéaire de  $\theta_S$  de  $160^\circ$  à  $145^\circ$  est observée sur la gamme de tension de surface allant de 72,6 à 35 mN/m. Avec cependant une exception pour les nanofleurs aux faibles  $\gamma$  (40 et 35 mN/m), l'aspect très aigu de cette texturation entraîne une baisse de  $\theta_S$  de 5-10° par rapport aux autres nanostructures.

Concernant les dépôts de PFTS (silanisation en phase vapeur et liquide) sur les nanorods et les nanofleurs, les courbes de  $\theta_S$  suivent la même tendance : une décroissance linéaire, le PFTS en phase liquide présentant toutefois des  $\theta_S$  de 5-10° supérieurs à ceux du PFTS V. Sur les nanoparticules, cet écart de  $\theta_S$  entre les deux PFTS disparaît et  $\theta_S$  est quasiment identique pour chaque revêtement.

### 2.5.2. Hystérésis de l'angle de contact

L'étude de l'hystérésis de l'angle de contact ( $\Delta\theta$ ) permet de caractériser les propriétés de déperlage et aussi l'imprégnation du liquide dans les nanostructures. L'évolution de  $\Delta\theta$  pour chaque surface nanostructurée avec les trois revêtements est représentée sur la Figure 37.



**Figure 37: Evolution de l'hystérésis de l'angle de contact en fonction de la tension de surface pour différents revêtements omniphobes sur a) surface plane, b) nanorods de ZnO, c) nanofleurs de ZnO et d) nanoparticules de ZnO**

Sur la surface plane (Figure 37a),  $\Delta\theta$  est supérieur à  $20^\circ$  quelque soit le revêtement et la tension de surface du liquide utilisé.

Dans le cas des nanorods (Figure 37b), l'hystérésis est quasiment nulle sur le  $C_4F_8$  et le PFTS L pour des liquides à  $\gamma \geq 46$  mN/m. Celle-ci reste inférieure à  $30^\circ$  à  $\gamma = 35$  mN/m pour le  $C_4F_8$  mais augmente de façon importante jusqu'à  $80^\circ$  pour le PFTS L. Le revêtement de PFTS V donne  $\Delta\theta$  compris entre  $20$ - $40^\circ$  pour toute la gamme de tension de surface.

Sur les nanofleurs (Figure 37c) modifiées par le PFTS quelque soit la méthode utilisée,  $\Delta\theta$  est quasiment nul pour les liquides dont la tension de surface est supérieure ou égale à  $42,9$  mN/m, une augmentation jusqu'à  $30^\circ$  et  $40^\circ$  pour le PFTS V et le PFTS L respectivement est observée pour les liquides à plus basse tension de surface. Concernant le  $C_4F_8$ , son  $\Delta\theta$  est quasi-nul pour des liquides à  $\gamma \geq 59$  mN/m et ensuite une rapide augmentation pour les liquides à plus faible  $\gamma$ . Dans le cas du dépôt de  $C_4F_8$  sur les nanofleurs, il n'a pas été possible de décrocher la ligne triple de gouttes pour les liquides à tension de surface égale à  $35$  et  $40$  mN/m avec un angle d'inclinaison de  $90^\circ$ . Cette observation démontre la pénétration du liquide au sein des nanostructures caractéristique du modèle de Wenzel. Ces deux cas correspondent aux plus fortes valeurs et nous avons considéré arbitrairement que l'hystérésis était de  $180^\circ$  (valeur la plus importante).

Sur les nanoparticules (Figure 37d), des valeurs de  $\Delta\theta$  quasi-nulles sont obtenues pour le  $C_4F_8$  et le PFTS V pour les liquides dont  $\gamma \geq 46$  mN/m. Avec des liquides à  $\gamma \leq 42,9$  mN/m,  $\Delta\theta$  augmente jusqu'à  $30^\circ$ . Le comportement du PFTS L est différent, une augmentation linéaire de  $\Delta\theta$  d'environ  $0^\circ$  à  $\gamma = 72,6$  mN/m jusqu'à  $40^\circ$  à  $\gamma = 35$  mN/m.

Pour le  $C_4F_8$ , une hystérésis comparable est observée sur les surfaces de nanorods et de nanoparticules. Dans le cas du PFTS V, il s'agit des surfaces de nanofleurs et de nanoparticules qui présentent une hystérésis similaire.

### 2.5.3. Discussion

Tout d'abord, observons l'influence de la structuration et du revêtement sur l'angle de contact statique. Plusieurs conclusions peuvent être tirées :

- Bien que l'angle de Young  $\theta_Y$  soit inférieur à  $90^\circ$  sur surface plane pour des liquides à  $\gamma < \gamma_C$ , l'angle de contact apparent de ces liquides sur les surfaces nanostructurées reste supérieur à  $140^\circ$ . Cette observation est en contradiction avec les modèles théoriques classique du mouillage. L'aspect localement ré-entrant des nanostructures peut expliquer ce phénomène déjà décrit dans la littérature [II18].

- Les différentes fonctionnalisations avec le PFTS en phase vapeur et liquide présentent de fortes disparités de mouillage sur les nanorods et les nanofleurs comme sur la surface plane. La qualité du PFTS L semble être meilleure que celle du PFTS V en termes d'angle de contact apparent statique sur chaque nanostructure. Cette dernière remarque est confirmée par les spectres XPS haute résolution du carbone car dans tout les cas, le PFTS L semble meilleur que le PFTS V.
- Le dépôt de  $C_4F_8$  sur les nanostructures entraîne une variation de  $\theta_S$  en fonction de  $\gamma$  quasiment identique pour chaque nanostructure; à l'exception de  $\gamma=35-40\text{mN/m}$  pour les nanofleurs où une baisse de  $\theta_S$  de  $5-10^\circ$  par rapport aux autres nanostructures est observée.

Les mesures d'angle de contact statique permettent de conclure que le revêtement ne semble pas avoir un effet important sur  $\theta_S$ . Par contre, la rugosité induite par la nanostructuration semble avoir un effet direct. Les nanofleurs induisant une rugosité très important entraînent une dispersion des mesures en fonction du revêtement. Cette dispersion est moins importante pour une rugosité moyenne comme les nanorods et nulle pour les nanoparticules qui ont une rugosité faible.

Concernant les mesures de l'hystérésis de l'angle de contact, il est nécessaire d'identifier les différentes surfaces qui présentent les hystérésis les plus faibles. Cette identification est importante car elle permettra de définir quelle surface pourra être utilisée comme capot EWOD/SPR. Pour pouvoir comparer ces différentes surfaces, nous prendrons comme référence la surface plane d'une hystérésis de  $15-20^\circ$ , utilisée classiquement pour effectuer des déplacements de gouttes d'EDI à 100V.

D'après les mesures d'hystérésis, il est possible de différencier qualitativement trois types :

- Des hystérésis inférieures à  $20^\circ$ , pour les liquides à  $\gamma \geq 42,9 \text{ mN/m}$ . Dans ces cas, l'hystérésis sur les surfaces nanostructures avec le ZnO est inférieure à l'hystérésis sur les surfaces planes. Ces surfaces présentent donc un intérêt pour leur utilisation comme capot EWOD/SPR.
- Des hystérésis supérieures à  $40^\circ$  remarquées dans le cas des liquides à faibles tensions de surface. Dans ces cas, les surfaces ne peuvent pas être utilisées pour le déplacement EWOD à cause de l'hystérésis trop important.
- Des hystérésis comprises entre  $20-40^\circ$ . Cet état n'est pas parfaitement défini car il reflète un état instable dans lequel repose la goutte. Selon la manière dont la goutte a été déposée, le liquide peut reposer localement sur le dessus de nanostructures et

imprégner partiellement à d'autres endroits. Le déplacement EWOD sur ces surfaces n'est pas assuré.

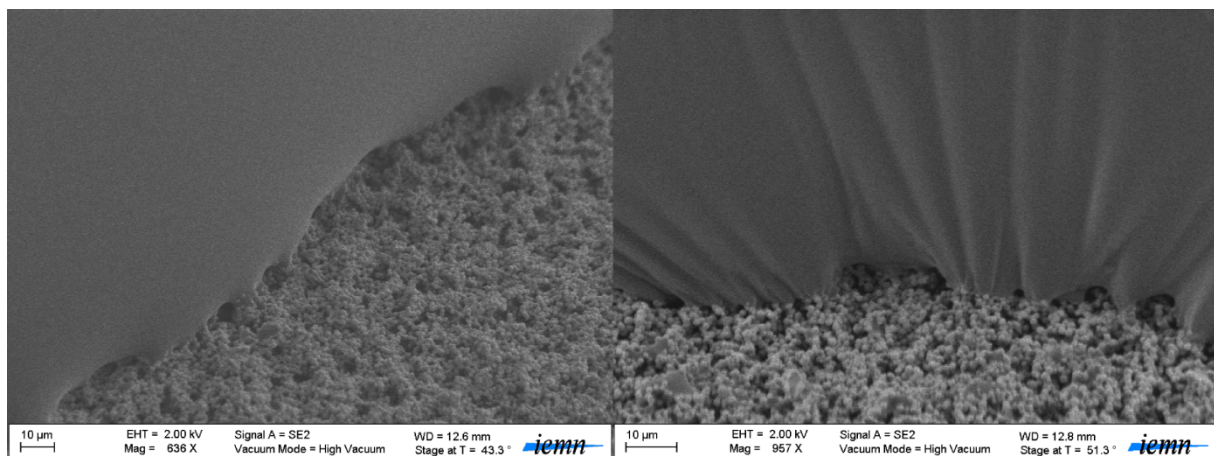
Globalement en comparant les surfaces, nous pouvons constater que les nanostructures présentant des aspects pointus avec des angles très saillants comme les nanofleurs et les nanorods présentent une dispersion des mesures entre les différents revêtements et créent des défauts piégeant la ligne triple causant des hystérésis importantes. Ces effets ne sont pas observés sur les nanoparticules dont les angles sont ré-entrants.

#### 2.5.4. Caractérisation microscopique de l'interaction liquide/surface

Cependant, les observations précédentes sont basées sur des mesures des propriétés de mouillage effectuées à l'échelle macroscopique. Pour caractériser le niveau d'empalement et l'état Cassie ou Wenzel, il est donc nécessaire d'utiliser d'autres moyens pour visualiser le mouillage au niveau local à une échelle microscopique.

##### 2.5.4.1. Piégeage de la ligne triple

Pour réaliser cette caractérisation, une goutte de 8 $\mu$ L de résine photo-durcissable NOA72 (*Norland Optical Adhesive, Norland Products Inc., USA*) dont la tension de surface est  $\sim$ 40mN/m [II42] est déposée sur une surface de nanoparticules revêtues de PFTS V. Cette surface a été choisie car les nanoparticules présentent les meilleurs propriétés de mouillage quelque soit le revêtement utilisé et la fonctionnalisation par PFTS en phase vapeur permet de limiter les effets de polymérisation dus à la présence d'impuretés et d'eau. La goutte de NOA72 est ensuite durcie par polymérisation par irradiation à 365 nm avec une lampe UV (12mW/cm<sup>2</sup>) pendant 10min. D'après les Figure 36d et Figure 37d, l'angle de contact et l'hystérésis de cette goutte sont de 146° et 30° respectivement.

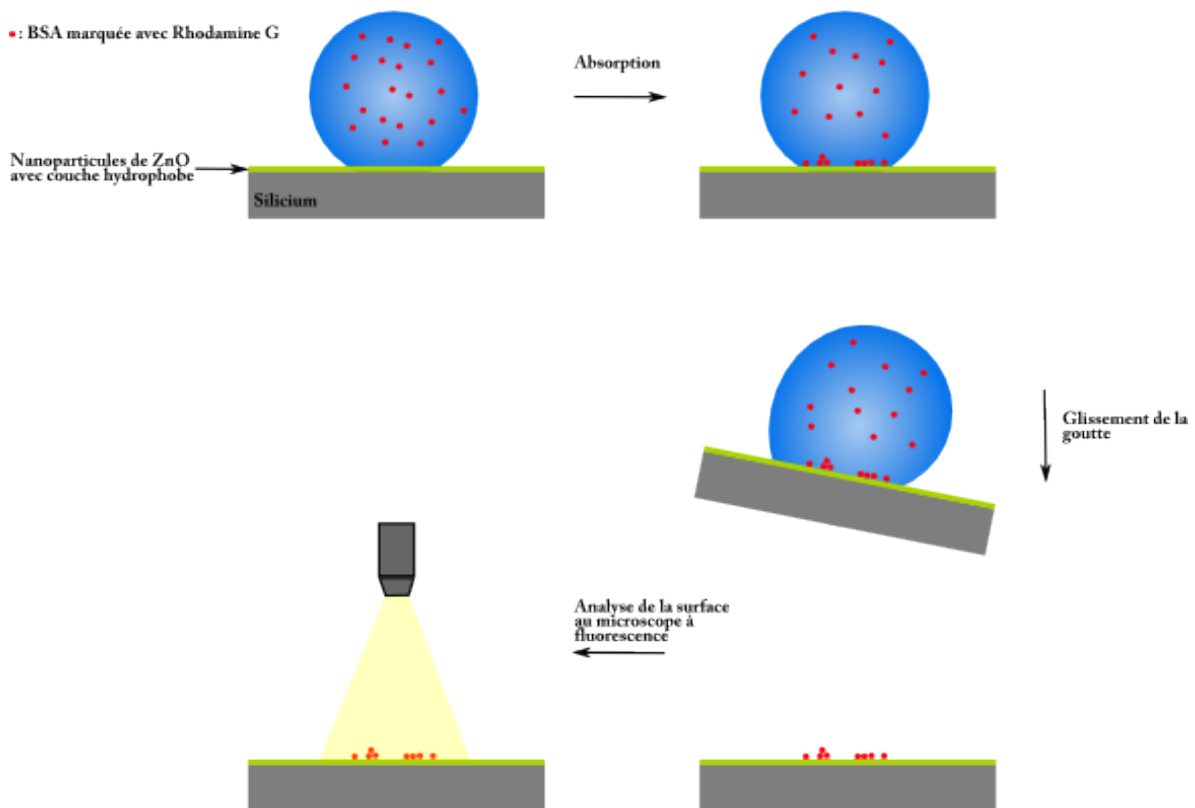


**Figure 38: Photos MEB d'une goutte de NOA déposée sur des nanoparticules avec traitement de surface au PFTS V**

Les photos MEB (Figure 38) montre que la goutte de NOA n'imprègne pas les nanostructures, mais que la ligne de contact est à certains endroits fortement accrochée au dessus des nanostructures [II43]. Cette déformation locale de la ligne triple qui a déjà été observée sur des microstructures est directement liée à l'hystérésis [II17]. De plus, ce comportement confirme l'existence d'état intermédiaire de mouillage entre les deux états extrêmes que sont Cassie-Baxter et Wenzel.

#### 2.5.4.2. Evaluation de la fraction de surface

Afin de pouvoir déterminer la fraction de surface de contact ( $\phi_s$ , définie dans 2.1.1.2) des nanostructures avec le liquide, des mesures en fluorescence ont été menées. Une solution contenant des molécules d'albumine sérique bovine (BSA) marquées avec de la Rhodamine G (fluorophore) (concentration de  $3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) a été utilisée.



**Figure 39: Schéma de principe pour évaluer  $\phi_s$  des nanostructures**

Afin de faire varier la tension de surface de la solution de protéines, nous avons réalisé 3 différents mélanges protéiques : une solution aqueuse de BSA présentant une tension de surface d'environ  $60\text{mN}/\text{m}$ , une solution de BSA avec 30% d'isopropanol de tension de surface de  $\sim 35\text{mN}/\text{m}$  et une dernière solution de BSA avec 50% d'isopropanol de tension de surface de  $29\text{mN}/\text{m}$ . Des gouttes des mélanges ainsi formés ont été déposées sur une surface de ZnO NP modifiée par le PFTS V. Environ une minute après le dépôt d'une goutte de  $20\mu\text{L}$ ,



- Pour  $\gamma=60$  mN/m (Figure 40a), un état de Cassie-Baxter a été relevé ce qui correspond bien au résultat obtenu en fluorescence (quasiment pas d'imprégnation du liquide).
- Pour  $\gamma=35$  mN/m (Figure 40b), un état intermédiaire a été observé, dû à une imprégnation partielle du liquide dans la surface
- Pour  $\gamma=29$  mN/m (Figure 40c), la mesure n'a pas été décrite dans la Figure 37 ( $\Delta\theta$ ) mais un état de Wenzel est observé, confirmé par l'imprégnation totale du liquide sur la surface en fluorescence.

La méthode d'analyse proposée a permis d'obtenir un ordre de grandeur de  $\phi_S$  sur des nanoparticules d'oxyde de zinc en fonction du liquide employé. Ces observations semblent bien être corrélées avec les mesures des propriétés de mouillage effectuées précédemment.

De plus, ces observations ont permis de comparer ces surfaces de nanostructures de ZnO avec des surfaces superomniphobes microtexturées en PDMS réalisées au cours de la thèse de Renaud Dufour [II16]. Dans le cas des surfaces microtexturées, un état de Cassie est observé jusqu'à des tensions de surface de 27,9 mN/m mais avec des hystérésis de l'angle de contact de l'ordre de 35°. Il n'y a pas d'imprégnation verticale du liquide pour de faibles tensions de surface ( $>27,9$ mN/m). Les nanostructures de ZnO présentent, au contraire, des hystérésis quasi-nulles jusqu'à des tensions de surface de 46mN/m. En dessous de cette valeur, le liquide commence à pénétrer dans la nanostructuration. Ces deux échelles de structurations ont donc des effets complémentaires [II44].

### 2.5.5. Conclusion

Les propriétés de mouillage des surfaces avec des nanostructures de ZnO ont été étudiées de façon systématique notamment en faisant varier la tension de surface des liquides utilisés. Au regard de l'angle de contact statique, la nature superomniphobe de ces surfaces est relevée avec un angle de contact statique compris entre 140-160°. La caractérisation de l'hystérésis permet de mettre en lumière les hétérogénéités qu'il existe entre les nanostructures et les revêtements. Ces différents résultats montrent que l'angle de contact statique ne dépend presque pas de la nanostructure et du revêtement mais que ces deux facteurs influent très fortement sur l'hystérésis de l'angle de contact. Le Tableau 14 récapitule l'état de mouillage d'une goutte en fonction de la tension de surface du liquide, de la nanostructure et du revêtement hydrophobe. Dans ce tableau, l'état de Cassie-Baxter est associé à des hystérésis inférieures à 20°, l'état intermédiaire d'empalement à des hystérésis comprises entre 20° et

40° et l'état de Wenzel à des hystérésis supérieures à 40°. Plusieurs remarques peuvent être tirées de ce tableau :

- La surface recouverte de nanorods modifiés avec du PFTS en phase vapeur est la seule de notre étude dans lequel l'état de Cassie-Baxter n'est pas présent.
- L'existence des trois états (Cassie-Baxter, Wenzel et intermédiaire) est relevée dans le cas des nanorods modifiés par le PFTS L et des nanofleurs avec du C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>.
- Les surfaces présentant des propriétés de déperlance (un état de Cassie-Baxter) pour la plus grande gamme de liquides testés sont les nanorods avec du C<sub>4</sub>F<sub>8</sub> et les nanofleurs avec du PFTS vapeur ou liquide. Ces trois cas ont les meilleures propriétés de l'étude, cependant ils dépendent à la fois de la nanostructuration et du revêtement hydrophobe.
- Les nanoparticules correspondent à la meilleure nanostructuration de cette étude. En effet, les propriétés de mouillage sur ces structures présentent des états de Cassie-Baxter ou des états intermédiaires quelque soit le revêtement hydrophobe. De plus, les différentes courbes (angle de contact statique et hystérésis de l'angle de contact) pour les nanoparticules montrent la plus faible dispersion des mesures entre les différents revêtements.

Nanostructures	ZnO NR			ZnO NF			ZnO NP		
	PFTS V	PFTS L	C <sub>4</sub> F <sub>8</sub>	PFTS V	PFTS L	C <sub>4</sub> F <sub>8</sub>	PFTS V	PFTS L	C <sub>4</sub> F <sub>8</sub>
$\gamma = 72,6$	E.I.	C-B	C-B	C-B	C-B	C-B	C-B	C-B	C-B
$\gamma = 58,7$	E.I.	C-B	C-B	C-B	C-B	C-B	C-B	E.I.	C-B
$\gamma = 52$	E.I.	C-B	C-B	C-B	C-B	E.I.	C-B	E.I.	C-B
$\gamma = 46$	E.I.	C-B	C-B	C-B	C-B	E.I.	C-B	E.I.	C-B
$\gamma = 42,9$	E.I.	E.I.	C-B	C-B	C-B	W	E.I.	E.I.	E.I.
$\gamma = 40$	E.I.	W	E.I.	E.I.	E.I.	W	E.I.	E.I.	E.I.
$\gamma = 35$	W	W	E.I.	E.I.	E.I.	W	E.I.	E.I.	E.I.

**Tableau 14: Récapitulatif des états d'empiement pour différentes tensions de surface sur différentes nanostructures avec différents revêtements omniphobes (C-B : Etat de Cassie-Baxter, W : Etat de Wenzel, E.I. : Etat intermédiaire)**

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté la réalisation de surfaces superomniphobes sur silicium et sur lames de verre recouvertes d'une couche mince d'or. Ces surfaces sont réalisées à l'aide d'un dépôt de nanostructures d'oxyde de zinc (ZnO). Une première étude de différents paramètres influant sur le dépôt comme le prétraitement au  $\text{KMnO}_4$ , la nature de la surface de dépôt, la nature du sel de zinc et la nature de l'éthanolamine a permis de montrer que les dimensions et les formes des nanostructures varient de façon importantes : dimensions de 20 à 5000nm, formes de bâtonnets (rods), fleurs (assemblage de rods) et de particules quasi-sphériques. Trois nanostructures obtenues à l'aide de ces dépôts ont été étudiées par la suite, il s'agit des nanorods, des nanofleurs et des nanoparticules. Ensuite, ces structures ont été recouvertes de différents revêtements hydrophobes, un perfluorosilane (PFTS) en phase vapeur et en phase liquide et un fluoropolymère ( $\text{C}_4\text{F}_8$ ).

Ces différents revêtements ont été analysés par XPS. Ces analyses ont permis d'établir que les couches possédant des ratios expérimentaux de concentrations atomiques proches des ratios théoriques, indiquant globalement une couche de bonne qualité, ne sont pas forcément celles qui possèdent le maximum de liaisons fluorées de basse tension de surface. Les revêtements en PFTS en phase vapeur ou liquide présentent les meilleures qualités notamment grâce à leurs nombreuses liaisons  $\text{CF}_3$  et  $\text{CF}_2$  bien que le  $\text{C}_4\text{F}_8$  crée d'avantage de liaisons fluorées. Cet effet est bien connu et rapporté dans la littérature [II45, II46].

Pour finir, les propriétés de mouillage pour des liquides d'une gamme de tensions de surface allant de 35mN/m à 72,6mN/m, ont été caractérisées sur les trois types de nanostructures recouvertes de différents revêtements. Les mesures d'angle de contact statique ont permis d'établir que le revêtement hydrophobe n'avait pas d'influence majeure contrairement à la forme de la structuration. Les mesures d'hystérésis d'angle de contact ont confirmé que les structures ayant des angles particulièrement saillants comme les nanorods et les nanofleurs engendrent des défauts qui viennent piéger la ligne triple entraînant des hystérésis importantes. Au contraire des angles « ré-entrants » présents sur les nanoparticules qui permettent de limiter le piégeage de la ligne triple et donc de maintenir un état de non empalement pour de faibles tensions de surface.

La compatibilité de ces surfaces dans le cadre de la détection par résonance de plasmon de surface sera étudiée dans le prochain chapitre afin de valider la réalisation de surfaces superomniphobes SPR.

## Bibliographie

- [II1] F. Lapiere, G. Piret, H. Drobecq, O. Melnyk, Y. Coffinier, V. Thomy, and R. Boukherroub. High sensitive matrix-free mass spectrometry analysis of peptides using silicon nanowires-based digital microfluidic device. *Lab on a Chip*, 11(9):1620–1628, 2011.
- [II2] R.H. Dettre and R.E. Jr. Johnson. *Contact Angle Hysteresis*, volume 43 de *Advances in Chemistry*, chapitre 8, pages 136–144. American Chemical Society, 1964.
- [II3] W. Barthlott and C. Neinhuis. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta*, 202(1):1–8, 1997.
- [II4] J. Bico, C. Marzolin, and D. Quéré. Pearl drops. *Europhysics Letters*, 47(2):220–226, 1999.
- [II5] R. N. Wenzel. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial and Engineering Chemistry*, 28:988–994, 1936.
- [II6] A. B. D. Cassie and S. Baxter. Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday Society*, 40:0546–0550, 1944.
- [II7] F. Lapiere. *Electromouillage sur diélectrique (EWOD): Conception et réalisation de dispositifs microfluidiques originaux sur surfaces superhydrophobes*. Thèse de doctorat, Université Lille 1 Sciences et Technologies, 2011.
- [II8] T. N. Krupenkin, J. A. Taylor, E. N. Wang, P. Kolodner, M. Hodes, and T. R. Salamon. Reversible wetting-dewetting transitions on electrically tunable superhydrophobic nanostructured surfaces. *Langmuir*, 23(18):9128–9133, 2007.
- [II9] J. B. Boreyko and C.-H. Chen. Restoring superhydrophobicity of lotus leaves with vibration-induced dewetting. *Physical Review Letters*, 103:174502, 2009.
- [II10] N. Kumari and S. V. Garimella. Electrowetting-induced dewetting transitions on superhydrophobic surfaces. *Langmuir*, 27(17):10342–10346, 2011.
- [II11] M. Nosonovsky. Multiscale roughness and stability of superhydrophobic biomimetic interfaces. *Langmuir*, 23(6):3157–3161, 2007.
- [II12] A. Tuteja, W. Choi, M. L. Ma, J. M. Mabry, S. A. Mazzella, G. C. Rutledge, G. H. McKinley, and R. E. Cohen. Designing superoleophobic surfaces. *Science*, 318:1618–1622, 2007.
- [II13] J. L. Liu, X. Q. Feng, G. F. Wang, and S. W. Yu. Mechanisms of superhydrophobicity on hydrophilic substrates. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 19(35):356002, 2007.
- [II14] A. Tuteja, W. Choi, J. M. Mabry, G. H. McKinley, and R. E. Cohen. Robust omniphobic surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(47):18200–18205, 2008.
- [II15] M. Im, H. Im, J. H. Lee, J. B. Yoon, and Y. K. Choi. A robust superhydrophobic and superoleophobic surface with inverse-trapezoidal microstructures on a large transparent flexible substrate. *Soft Matter*, 6(7):1401–1404, 2010.

- [II16] R. Dufour, M. Harnois, Y. Coffinier, V. Thomy, R. Boukherroub, and V. Senez. Engineering sticky superomniphobic surfaces on transparent and flexible PDMS substrate. *Langmuir*, 26(22):17242–17247, 2010.
- [II17] R. Dufour, M. Harnois, V. Thomy, R. Boukherroub, and V. Senez. Contact angle hysteresis origins: Investigation of superomniphobic surfaces. *Soft Matter*, 7:9380–9387, 2011.
- [II18] T. P. N. Nguyen, P. Brunet, Y. Coffinier, and R. Boukherroub. Quantitative testing of robustness on superomniphobic surfaces by drop impact. *Langmuir*, 26(23):18369–18373, December 2010.
- [II19] L. L. Cao and D. Gao. Transparent superhydrophobic and highly oleophobic coatings. *Faraday Discussions*, 146:57–65, 2010.
- [II20] D. A. Wang, X. L. Wang, X. J. E. Liu, and F. Zhou. Engineering a titanium surface with controllable oleophobicity and switchable oil adhesion. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(21):9938–9944, 2010.
- [II21] C. Aulin, S. H. Yun, L. Wagberg, and T. Lindstrom. Design of highly oleophobic cellulose surfaces from structured silicon templates. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 1(11):2443–2452, 2009.
- [II22] T. P. N. Nguyen. *Fabrication of nanostructured silicon substrates for the development of superomniphobic surfaces and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis of biomolecules*. Thèse de doctorat, Université Lille 1 Sciences et Technologies, 2011.
- [II23] W.A. Zisman. *Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution*, volume 43 de *Advances in Chemistry*, chapitre 1, pages 1–51. American Chemical Society, 1964.
- [II24] M. Kokotov and G. Hodes. Reliable chemical bath deposition of ZnO films with controllable morphology from ethanolamine-based solutions using KMnO<sub>4</sub> substrate activation. *Journal of Materials Chemistry*, 19(23):3847–3854, 2009.
- [II25] A. Chittofrati and E. Matijevic. Uniform particles of zinc-oxide of different morphologies. *Colloids and Surfaces*, 48(1-3):65–78, 1990.
- [II26] L. E. Greene, M. Law, J. Goldberger, F. Kim, J. C. Johnson, Y. F. Zhang, R. J. Saykally, and P. D. Yang. Low-temperature wafer-scale production of ZnO nanowire arrays. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(26):3031–3034, 2003.
- [II27] L. Vayssieres. Growth of arrayed nanorods and nanowires of ZnO from aqueous solutions. *Advanced Materials*, 15(5):464–466, 2003.
- [II28] R. B. Peterson, C. L. Fields, and B. A. Gregg. Epitaxial chemical deposition of ZnO nanocolumns from NaOH. *Langmuir*, 20(12):5114–5118, 2004.
- [II29] K. Govender, D. S. Boyle, P. B. Kenway, and P. O’Brien. Understanding the factors that govern the deposition and morphology of thin films of ZnO from aqueous solution. *Journal of Materials Chemistry*, 14(16):2575–2591, 2004.

- [II30] X. J. Wang, Q. L. Zhang, Q. A. Wan, G. Z. Dai, C. J. Zhou, and B. S. Zou. Controllable ZnO architectures by ethanolamine-assisted hydrothermal reaction for enhanced photocatalytic activity. *Journal of Physical Chemistry C*, 115(6):2769–2775, 2011.
- [II31] B. Weintraub, Z. Z. Zhou, Y. H. Li, and Y. L. Deng. Solution synthesis of one-dimensional ZnO nanomaterials and their applications. *Nanoscale*, 2(9):1573–1587, 2010.
- [II32] S. Onclin, B. J. Ravoo, and D. N. Reinhoudt. Engineering silicon oxide surfaces using self-assembled monolayers. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(39):6282–6304, 2005.
- [II33] J. Sagiv. Organized monolayers by adsorption .1. formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid-surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 102(1):92–98, 1980.
- [II34] A. Ulman. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews*, 96(4):1533–1554, 1996.
- [II35] H. O. Finklea, L. R. Robinson, A. Blackburn, B. Richter, D. Allara, and T. Bright. Formation of an organized monolayer by solution adsorption of octadecyltrichlorosilane on gold - electrochemical properties and structural characterization. *Langmuir*, 2(2):239–244, March 1986.
- [II36] D. L. Angst and G. W. Simmons. Moisture absorption characteristics of organosiloxane self-assembled monolayers. *Langmuir*, 7(10):2236–2242, 1991.
- [II37] P.; Possemiers K.; Grobet P. Vrancken, K.C.; Van der Voort and E.F. Vansant. *Chemically Modified Surfaces*, chapitre The Physisorption and Condensation of Aminosilanes on Silica Gel, pages 46–56. 1996.
- [II38] M. L. Hair and C. P. Tripp. Alkylchlorosilane reactions at the silica surface. *Colloids and Surfaces A-physicochemical and Engineering Aspects*, 105(1):95–103, 1995.
- [II39] J. B. Brzoska, I. Benazouz, and F. Rondelez. Silanization of solid substrates - a step toward reproducibility. *Langmuir*, 10(11):4367–4373, 1994.
- [II40] J. Frechette, R. Maboudian, and C. Carraro. Thermal behavior of perfluoroalkylsiloxane monolayers on the oxidized Si(100) surface. *Langmuir*, 22(6):2726–2730, March 2006.
- [II41] E. Hoque, J. A. DeRose, P. Hoffmann, B. Bhushan, and H. J. Mathieu. Alkylperfluorosilane self-assembled monolayers on aluminum: A comparison with alkylphosphonate self-assembled monolayers. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(10):3956–3962, 2007.
- [II42] T. N. Krupenkin, J. A. Taylor, T. M. Schneider, and S. Yang. From rolling ball to complete wetting: The dynamic tuning of liquids on nanostructured surfaces. *Langmuir*, 20(10):3824–3827, 2004.
- [II43] M. Reyssat and D. Quéré. Contact angle hysteresis generated by strong dilute defects. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(12):3906–3909, 2009.
- [II44] R. Dufour, P. Brunet, M. Harnois, R. Boukherroub, V. Thomy, and V. Senez. Zipping effect on omniphobic surfaces for controlled deposition of minute amounts of fluid or colloids. *Small*, 8(8):1229–1236, 2012.

[II45] S. A. Kulinich and M. Farzaneh. Hydrophobic properties of surfaces coated with fluoroalkylsiloxane and alkylsiloxane monolayers. *Surface Science*, 573(3):379–390, 2004.

[II46] I. P. Vinogradov and A. Lunk. Dependence of surface tension and deposition rate of fluorocarbon polymer films on plasma parameters in a dielectric barrier discharge (DBD). *Surface & Coatings Technology*, 200(1-4):695–699, 2005.





### **III. Applications de la résonance de plasmons de surface pour la biodétection dans un système EWOD**



## Introduction

Dans les deux précédents chapitres, deux différentes méthodes ont été développées afin de limiter l'adsorption non spécifique, principal frein au développement de la microfluidique digitale pour l'analyse biologique. Ce contrôle de l'interaction liquide/surface s'est effectué soit par ajout d'oxyde de graphène (GO) pour maintenir les biomolécules en suspension dans le liquide, soit par diminution de l'aire de contact entre le liquide et la surface *via* l'utilisation de surfaces superomniphobes à base de nanostructures de ZnO. Dans ces deux cas, l'interaction liquide/surface a été caractérisée par les propriétés de mouillage obtenues par mesures optiques macroscopiques comme l'angle de contact apparent par exemple. Cependant, la partie détection des biomolécules nécessaire à la réalisation d'un laboratoire sur puce, n'a pas encore été abordée.

Dans ce chapitre, nous allons présenter l'association de la résonance de plasmons de surface (SPR) avec les deux solutions développées dans les chapitres précédents. Les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés en collaboration avec M<sup>elle</sup> N. Maalouli (doctorante), M<sup>rs</sup> M. Bouazaoui et B. Pinchemel, Professeurs au Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (PhLAM) de l'université de Lille 1. Le banc SPR, qui a été développé au cours des thèses de M. Beaugeois [III1] et d' E. Galopin [III2] puis de celle de N. Maalouli [III3], a permis d'effectuer une large gamme d'expériences du fait de sa grande versatilité.

Tout d'abord, la méthode de détection par SPR sera présentée en commençant par son principe physique puis par un état de l'art de son utilisation pour la détection de biomolécules associée à un dispositif microfluidique. Ensuite, nous présentons les résultats de l'intégration à une méthode SPR des deux stratégies développées lors des précédents chapitres. Sachant que les résultats principaux obtenus consistaient à limiter l'interaction biomolécules / surface, il s'agit maintenant d'adresser localement ces biomolécules à une surface jouant le rôle de détecteur SPR.

Dans un premier temps le déplacement par EWOD de protéines en présence d'oxyde de graphène sera validé ainsi que la préservation de leur activité enzymatique. Puis, la nécessité de désorber ces biomolécules des nanofeuillets d'oxyde de graphène sera mise en évidence afin de pouvoir les analyser par SPR. De la même manière, des ouvertures de différentes tailles seront réalisées dans les surfaces superomniphobes afin de valider leur utilisation en SPR.

Au-delà d'être un outil permettant la biodétection dans un système microfluidique, la résonance de plasmons de surface apparaîtra alors comme une méthode de caractérisation de l'interface liquide / surface à l'échelle microscopique.

## **3.1. Méthode de détection pour la protéomique**

### **3.1.1. Introduction**

En biologie, l'étude des protéines est un domaine en pleine évolution depuis quelques décennies de par l'influence majeure des protéines sur les mécanismes biologiques. En effet, les protéines assurent de très nombreuses fonctions au sein d'un organisme vivant comme sa régulation, le transport d'autres molécules,.... Ces fonctions sont définies par la composition de la protéine *i.e.* la séquence d'acides aminés qui constitue la protéine. La composition des protéines est définie lors de leur synthèse : transcription de l'ADN en ARN messager puis traduction de l'ARN messager en protéine via l'ARN de transfert qui apporte les différents acides aminés. Cependant, les protéines peuvent subir une modification post-traductionnelle (PTM) (phosphorylation : addition d'un groupe phosphate, méthylation : addition d'un groupe méthyle,...). Cette modification peut être due :

- à un fonctionnement normal (activité d'une enzyme).
- à un dysfonctionnement interne de l'organisme.
- à un stress extérieur (présence de métaux lourds, de produits chimiques ou exposition à des rayonnements électromagnétiques à partir de l'UV).

Ces modifications entraînent un changement de la conformation de la protéine et donc de sa fonction. Il est alors très important de pouvoir à la fois observer les modifications anormales des protéines mais aussi de contrôler leur expression car ces phénomènes peuvent être les marqueurs d'une maladie ou d'un cancer [III4, III5].

Pour connaître et suivre ces modifications, il y a deux aspects particulièrement importants. Il s'agit de l'analyse et la détection des protéines. L'analyse permet de déterminer la composition d'un milieu complexe. C'est donc un moyen d'identifier les différentes espèces en fonction de leurs propriétés intrinsèques (physique, physico-chimique, chimique). Les principaux outils utilisés par l'analyse des protéines sont l'électrophorèse bidimensionnelle et la spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse fait d'ailleurs l'objet d'un fort intérêt pour son couplage avec des systèmes EWOD [III6-III9]. La détection, quant à elle, consiste uniquement à déterminer si une protéine donnée est présente ou pas dans un milieu complexe. Différentes méthodes (optiques, électrochimiques) peuvent être mises en œuvre afin de

réaliser une détection [III10, III11]. De plus, la détection s'effectue, de façon générale, par l'interaction de la molécule que l'on cherche à détecter avec une autre molécule (interaction anticorps-antigène, réaction d'une enzyme avec son substrat) préalablement fixée sur un biodétecteur.

Le couplage de l'analyse et/ou de la détection avec la microfluidique a suscité un fort engouement de la communauté scientifique ces dernières années notamment depuis l'invention du concept de microTAS (micro total analysis system, microsystème d'analyse complète) par Andreas Manz en 1990 [III12]. Depuis, de nombreuses revues scientifiques (*Lab-on-Chip*, *Analytical Chemistry*, *Biosensors and Bioelectronics*, *Nature*, *Science*, ...) publient des articles couplant une détection ou une analyse avec un système microfluidique. Des systèmes couplant ces deux aspects ont déjà été commercialisés par diverses sociétés (Agilent Technologies, GE Healthcare, Advanced Liquid Logic, Horiba Jobin-Yvon, ...). Cet intérêt pour la microfluidique peut s'expliquer de différentes façons. La microfluidique permet l'utilisation de plus faible volume (~ $\mu$ L) et d'augmenter la rapidité de l'analyse. De plus, les canaux microfluidiques (microcanaux) peuvent être parallélisés permettant une multiplication des mesures. Si la microfluidique en flux continu a constitué la base des premiers systèmes microfluidiques et s'est depuis largement développée, une autre méthode, la microfluidique en goutte, a également vu le jour [III13]. Dans cette méthode, les biomolécules ou les cellules dans un milieu liquide sont déplacées dans les microcanaux sous forme de gouttes. Cela permet à la fois de réduire les volumes utilisés mais aussi d'utiliser les gouttes de façon indépendante ou comme microréacteur pour des réactions chimiques ou biochimiques. Généralement, les gouttes constituées d'un milieu aqueux sont déplacées dans un milieu organique immiscible (huile) avec un différentiel de pression. D'autres méthodes de déplacement de gouttes ont aussi été étudiées comme les ondes acoustiques de surface (SAW) [III2] ou l'électromouillage sur diélectrique (EWOD) [III14]. Dans ces cas, les gouttes se déplacent sur un système planaire et non dans des microcanaux. Cette absence de microcanaux permet de manipuler facilement des gouttes en parallèle et de manière reconfigurable avec un système EWOD. Les systèmes EWOD ont déjà permis de réaliser des systèmes de microfluidique dite digitale avec une méthode d'analyse ou de détection. Comme nous l'avons déjà expliqué au chapitre I, ces systèmes sont sensibles à la pollution de surface donc la majorité des systèmes fonctionne en milieu biphasique (eau/huile).

Le premier exemple d'intégration d'un système de détection en ligne à un système EWOD biphasique (eau/huile) a été réalisé par Srinivasan *et al.* via une réaction enzymatique avec le glucose venant modifier l'absorbance. Cette réaction a, tout d'abord, été démontrée pour

différentes dilutions de glucose [III15] de 100, 300 et 800mg/dL dans l'eau désionisée. Ils ont montré la possibilité de détecter des concentrations de glucose de 25 à 300mg/dL avec une limite de détection de 9mg/dL. Dans une publication suivante [III16], ils utilisent le même système (EWOD dans l'huile) pour venir mesurer la concentration de glucose dans des liquides biologiques purs (plasma sanguin, sérum, urine et salive). Leur système permet de déplacer une goutte de sang pendant environ 40min sans interruption avec une tension d'actionnement de 52V à 10Hz. Depuis ces premiers travaux, d'autres systèmes EWOD avec une zone de détection ont été réalisés (voir la revue de Malic *et al.* en 2010 [III17]). Cependant, la plupart des exemples de détection en ligne présentés utilisent un système biphasique ou quasi-biphasique (encapsulation de la goutte de liquide aqueux dans de l'huile). L'utilisation de systèmes biphasiques restreint l'analyse et la détection à des méthodes optiques car le film d'huile vient isoler la goutte de la surface. Concernant les systèmes EWOD dans l'air, il n'y a, à ce jour, que deux exemples pour la détection en ligne de protéines. Le premier exemple a été réalisé par Miller *et al.* [III18] qui effectuent une détection d'une IgG humaine capturée par une anti-IgG humaine immobilisée en surface puis une anti-IgG humaine fluorescent vient réagir avec l'IgG humaine capturée. L'IgG humaine est déplacée à une concentration de 10 $\mu$ g/mL dans une solution de sérum de veau fœtal diluée 100 fois avec environ 0,01% (p/v) de Pluronic<sup>®</sup>, à noter que la solution de sérum dilué contient environ 100 $\mu$ g/mL d'IgG bovine. Ce déplacement est réalisé avec une tension d'actuation de 75V<sub>eff</sub> à 18kHz. La détection de l'IgG humaine a pu être effectuée malgré la présence de protéines interférentes. De plus, cette méthode de détection en ligne nécessite des temps d'incubation relativement lents (~2,5h). L'autre exemple a été réalisé par Choi *et al.* [III19]. Ils présentent l'intégration dans un système EWOD dans l'air d'un capteur composé d'un transistor à effet de champ pour détecter l'anticorps *avian influenza*. Le déplacement de cet anticorps s'effectue dans une solution de tampon salin phosphate avec 10 $\mu$ g/mL d'anti-IgG de lapin et 0,00005% (p/v) de Pluronic<sup>®</sup>. La limite de détection obtenue à l'aide de ce détecteur est de 0,5pg/mL (6,67fM). Dans ces deux cas, le déplacement des biomolécules s'effectue à l'aide de Pluronic<sup>®</sup> afin de limiter la biopollution. Cependant, le Pluronic<sup>®</sup> du fait de sa nature amphiphile (surfactant) vient se concentrer aux interfaces et a donc des inconvénients majeurs :

- une diminution de la tension de surface, le déplacement EWOD nécessite des tensions plus élevées.
- impossibilité pour une biomolécule dans le liquide de diffuser vers la surface.

Dans les deux premiers chapitres, différentes solutions ont été présentées pour limiter ces effets de biopollution par l'utilisation de nanofeuillets d'oxyde de graphène [III20] ou de surfaces superomniphobes [III21, III22]. Ces solutions ne viennent pas écranter l'interaction liquide/surface comme cela est le cas dans les systèmes biphasiques ou avec l'utilisation de surfactants. Dans ce chapitre nous allons étudier la compatibilité de ces solutions avec des méthodes d'analyse notamment avec un capteur SPR pour pouvoir effectuer la détection de biomolécules qui constitue le cadre du projet européen « Plasmobio » dans lequel s'inscrit cette thèse.

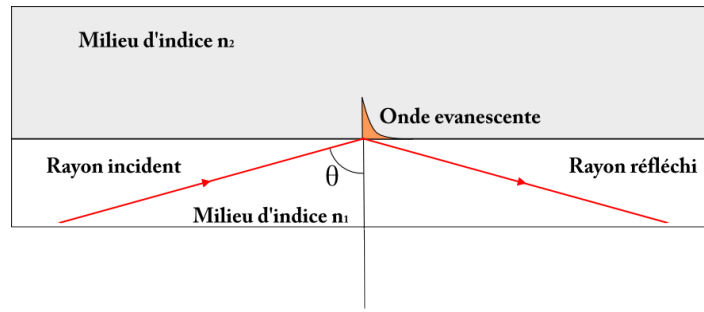
### 3.1.2. Principe physique du plasmon de surface

Le plasmon de surface est une onde électromagnétique évanescence qui est due à l'oscillation des électrons de conduction à l'interface métal/diélectrique. Le plasmon de surface se propage parallèlement à cette interface. La génération du plasmon nécessite certaines conditions que nous allons détailler.

Lorsqu'un rayon lumineux arrive à l'interface entre deux milieux d'indices optiques différents, il existe une réflexion et une réfraction. Les lois de Snell-Descartes décrivent ces deux phénomènes. Dans le cas où il est nécessaire de ne pas avoir de rayons réfractés pour générer une onde évanescence, il faut se placer dans une configuration de réflexion interne totale Figure 41. Dans cette configuration, la loi de Snell-Descartes donne :

$$\sin \theta = \frac{n_2}{n_1} \rightarrow \theta_c = \sin^{-1} \frac{n_2}{n_1} \quad (1)$$

D'après l'équation (1) et si la condition  $n_1 > n_2$  est satisfaite, il existe donc un angle critique  $\theta_c$  à partir duquel la réfraction n'existe plus. Une onde électromagnétique ne se propage plus du côté le moins réfringent, cependant les conditions aux limites de cette interface pour les champs électrique et magnétique imposent leur continuité à l'interface. Cela implique la présence d'une onde évanescence dans le milieu d'indice  $n_2$  (Figure 41). Le vecteur d'onde de l'onde évanescence possède une composante normale à l'interface imaginaire pure qui est la cause de la décroissance exponentielle le long de cet axe.



**Figure 41: Principe d'une réflexion totale interne à l'interface entre deux milieux d'indice n1 et n2 (avec n1 > n2)**

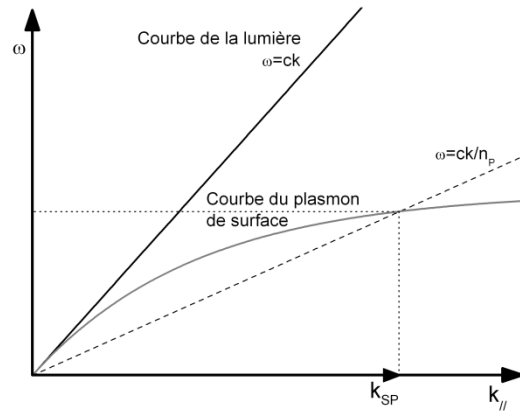
La profondeur de pénétration de l'onde  $\delta$  est donnée par la formule suivante (Equation 2) avec  $\lambda$  la longueur d'onde du rayon monochromatique incident.

$$\delta = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{(n_1 \sin \theta)^2 - 1}} , \theta > \theta_c \quad (2)$$

Généralement, une approximation au premier ordre est effectuée pour cette valeur qui vaut alors  $\lambda/2$ . Dans le cas où une fine couche métallique est placée entre les deux milieux, il y a une exaltation du phénomène car les électrons de conduction du métal entrent en résonance sous l'effet de l'onde évanescente. Le vecteur d'onde  $k_{SP}$ , permettant la propagation du plasmon de surface dans le métal, est obtenu par les équations de Maxwell avec les conditions de passage correspondant à une interface métal/diélectrique. Ce vecteur d'onde est donné par l'équation (3) et dépend de la pulsation de l'onde  $\omega$ , de la vitesse de la lumière dans le vide  $c$  ( $3 \cdot 10^8$  m/s) et des constantes diélectriques  $\epsilon_m$  et  $\epsilon_d$  respectivement du métal et du diélectrique. Il faut noter que  $\epsilon_m$  dépend de la pulsation de l'onde et est une valeur complexe.

$$k_{SP} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} = k_0 n_{SP} \text{ avec } k_0 = \frac{\omega}{c} \text{ et } n_{SP} = \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (3)$$

La Figure 42 illustre la courbe de dispersion à l'interface métal/air. De plus, la courbe de la lumière ne coupe pas la courbe du plasmon de surface. Il est donc nécessaire de réaliser un couplage avec un milieu incident d'indice supérieur à 1.



**Figure 42: Courbe de dispersion d'un plasmon de surface**

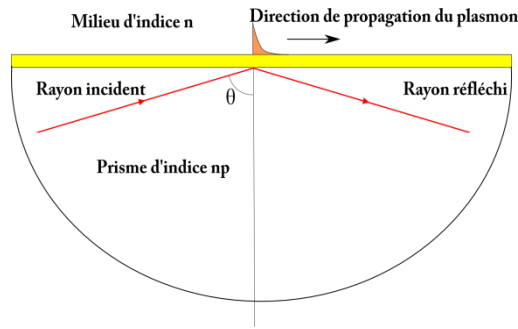
La courbe de dispersion dans un milieu d'indice  $n_p$  est aussi représentée sur la Figure 42. La composante parallèle à la surface du vecteur d'onde de l'onde incidente sous un angle d'incidence  $\theta_i$  est donnée par l'équation (4).

$$k_{//} = k_0 n_p \sin \theta_i \quad (4)$$

De plus, cette courbe coupe la courbe de dispersion du plasmon de surface. Cette intersection correspond à la condition de couplage nécessaire pour pouvoir exciter le plasmon de surface. Lors du couplage, il y a égalité entre le vecteur d'onde du plasmon de surface  $k_{SP}$  et la composante parallèle à l'interface du vecteur d'onde de l'onde incidente  $k_{//}$ . On obtient l'équation (5) :

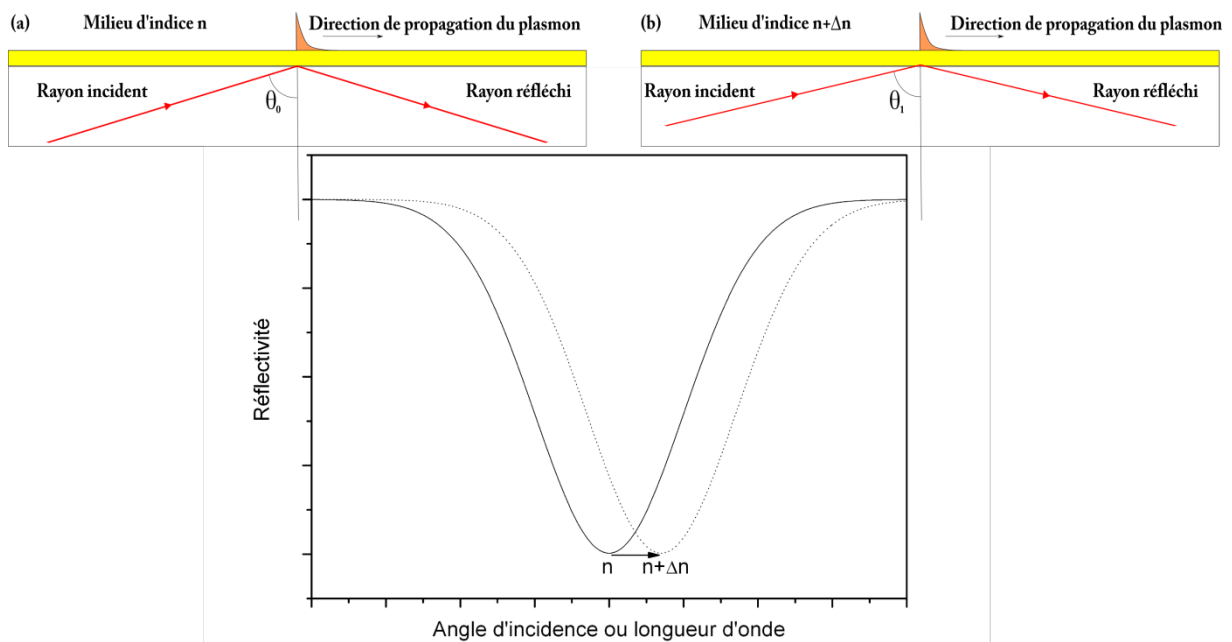
$$n_{SP} = n_p \sin \theta_i = \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (5)$$

Cette relation montre que l'angle d'incidence pour obtenir l'excitation du plasmon dépend directement de la constante diélectrique du milieu diélectrique à sonder ( $\epsilon_d$ ) et indirectement de la pulsation  $\omega$  (ou la longueur d'onde  $\lambda = 2\pi c/\omega$ ) de la lumière incidente (car  $\epsilon_m$  en dépend). Lorsque le plasmon de surface est excité, il y a un minimum de réflectivité pour l'angle d'incidence correspondant. La réalisation de ce couplage est effectuée par l'intermédiaire d'un prisme d'indice  $n_p = 1,64$  selon la configuration de Kretschmann représentée sur la Figure 43.



**Figure 43: Schéma de la configuration de Kretschmann utilisée pour l'excitation des plasmons de surface**

La détection d'un changement d'indice optique à l'interface métal/diélectrique peut être réalisée par ce principe comme cela est présenté sur la Figure 44.

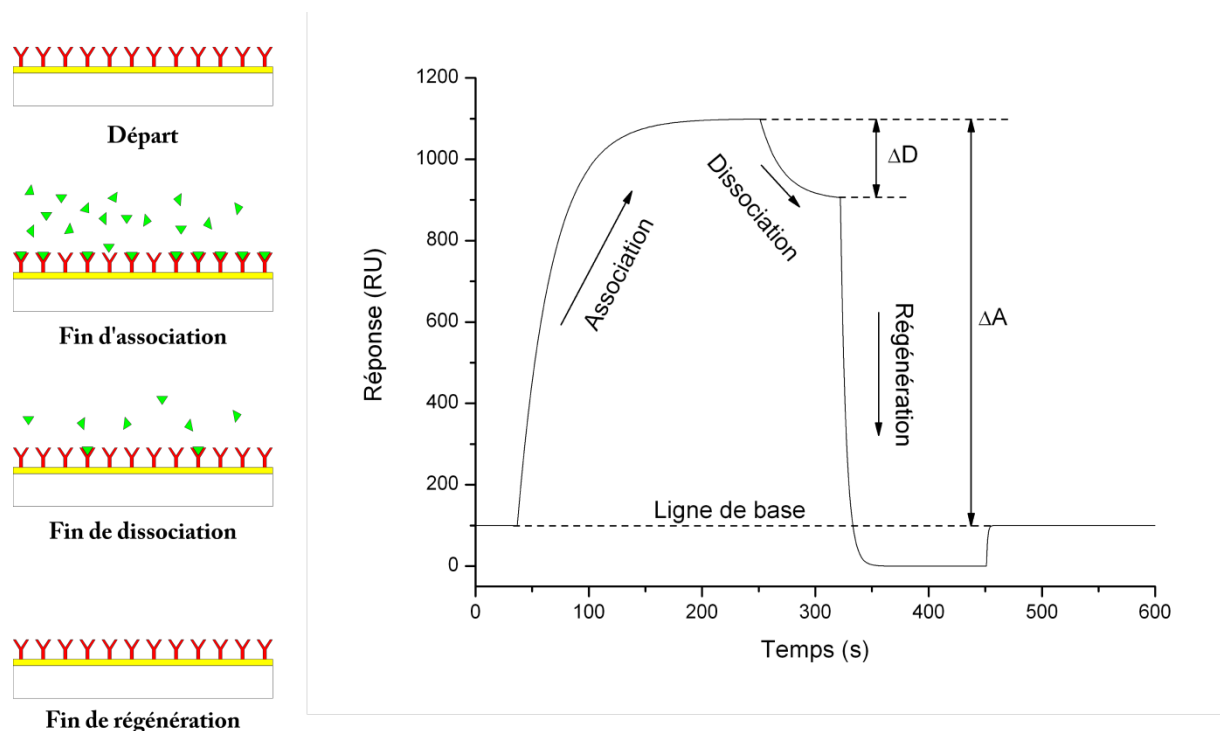


**Figure 44: Principe du suivi d'un changement d'indice optique à l'interface**

Au départ, le milieu diélectrique sondé possède un indice  $n$  (Figure 44a). Si cet indice est augmenté de  $\Delta n$ , les conditions d'excitation du plasmon de surface sont modifiées car  $n_{SP}$  est modifié (Figure 44b). Une modification de l'angle d'incidence (ou de longueur d'onde pour changer  $\epsilon_m$ ) est donc nécessaire afin d'obtenir le minimum de réflectivité (Figure 44). Il y a donc une interrogation angulaire afin de conserver le minimum du plasmon. Lors du suivi de changement d'indice, c'est la variation angulaire de ce minimum de réflectivité qui sera prise en considération. La variation de ce minimum est définie en RU (Reflectivity Unit), unité classiquement utilisée en SPR, où 1000RU correspondent pour la plupart des protéines à  $1 \text{ ng} \cdot \text{mm}^{-2}$ .

### 3.1.3. Applications du SPR à la détection biologique

Cette méthode, permettant le suivi d'un changement d'indice à l'interface/métal, a été utilisée pour la première fois par Liedberg *et al.* [III23] pour suivre des interactions biomoléculaires et est maintenant utilisée dans des appareils de détection commercialisés (Biacore<sup>6</sup>, SensiQ<sup>7</sup>, SPRI-Lab<sup>8</sup>) qui intègrent dans certains cas des dispositifs microfluidiques. La Figure 45 montre un exemple de suivi d'une interaction biomoléculaire



**Figure 45: Exemple d'un cycle de suivi d'une interaction entre un ligand et sa cible par résonance de plasmons de surface, à droite sensorgramme des différentes étapes et à gauche l'état de la surface du capteur SPR**

Tout d'abord, une biomolécule (ligand) est immobilisée par une chimie de surface appropriée sur une lame métallisée. Le métal choisi est généralement de l'or qui possède une meilleure stabilité chimique que l'argent mais un plasmon plus large. Ensuite, une solution contenant la cible, ayant une forte interaction avec le ligand immobilisé, est injectée. La cible vient s'associer au ligand du fait d'une interaction spécifique et par conséquent vient augmenter l'indice optique de l'interface qui se traduit par une hausse du sensorgramme (courbe de la Figure 45). Cette étape est la phase d'association. La fin de cette étape intervient lorsque l'équilibre entre l'association et la dissociation du complexe analyte/ligand est atteint.

<sup>6</sup>GE Healthcare, site web <http://www.biacore.com> consulté le 13/09/12

<sup>7</sup>SensiQ Technologies Inc., site web <http://www.discoversensiq.com> consulté le 13/09/12

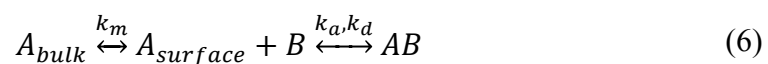
<sup>8</sup>Horiba Jobin-Yvon (rachat de Genoptics) site web <http://www.horiba.com/fr/scientific/products/surface-plasmon-resonance-imaging-spri/> consulté le 13/09/12

Ensuite, la surface est rincée à l'aide d'une solution tampon permettant de libérer la cible du ligand, il s'agit ici de l'étape de dissociation. L'indice à l'interface diminue car une partie des cibles est libérée, il y a donc une diminution du sensorgramme. Afin de libérer tous les sites d'immobilisation, il est nécessaire de régénérer la surface à l'aide d'une solution acide ou basique. Cela se traduit de nouveau par une baisse du sensorgramme. Ensuite, une solution tampon est réinjectée pour récupérer l'état initial du sensorgramme et rééquilibrer le milieu pour une autre interaction par exemple.

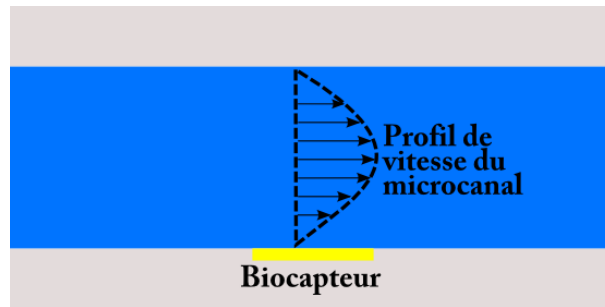
Le sensorgramme ainsi obtenu, permet de déterminer la concentration de la cible car l'indice optique dépend de la concentration, mais aussi des informations sur la cinétique de l'interaction entre la cible A et le ligand B. La détection de cette interaction s'effectue en plusieurs étapes :

- Migration de la cible du milieu vers la surface de détection. Cette étape est un processus diffusionnel, appelé transport de masse, qui est défini par la constante  $k_m$ .  $k_m$  ne dépend pas du ligand mais uniquement des propriétés du dispositif microfluidique et du coefficient de diffusion de l'analyte, donc du nombre de Péclet qui est le rapport entre le transfert par convection et le transfert par diffusion.
- Association de la cible avec le ligand. Cette étape passe par l'orientation des sites de reconnaissance de la cible et la création du complexe cible-ligand. Elle est caractérisée par la constante  $k_a$ .
- Dissociation de la cible du ligand. Dans cette étape, il y a rupture de la liaison créant le complexe cible-ligand. Cette rupture est caractérisée par la constante  $k_d$ .

Ces différentes étapes peuvent se traduire par l'équation suivante :



La principale difficulté dans le suivi de ces interactions en systèmes microfluidiques est liée au problème de transport de masse. A cause des écoulements laminaires observés en microfluidique, la vitesse du fluide à l'interface avec le solide est nulle (Figure 46). Les cibles ont donc des difficultés à diffuser vers le biocapteur et donc viennent fausser la cinétique de l'interaction cible/ligand. Il est donc nécessaire que l'apport de la cible vers la surface soit plus rapide que l'association de la cible avec le ligand afin qu'elle n'influe pas sur la cinétique.



**Figure 46: Schéma d'un écoulement laminaire dans un microcanal généré par un différentiel de pression**

Cette problématique de transport de masse a été abordée dans la thèse d'Elisabeth Galopin [III2]. Elle a montré que l'utilisation des ondes acoustiques de surface (surface acoustic waves, SAW) permet d'améliorer l'efficacité de transport de masse pour une interaction entre la streptavidine et une surface carboxylée activée par NHS/EDC (N-hydroxysuccinimide/1-Ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride) [III24].

### 3.1.4. Conclusion

La méthode de détection par résonance de plasmons de surface (SPR) a permis de montrer ses principaux avantages par rapport aux autres méthodes :

- Détection en ligne
- Détection sans marquage
- Dosage de molécules
- Détermination des constantes d'association et de dissociation entre deux biomolécules

Cependant, la SPR ne permet pas directement d'avoir une information sur la nature de l'analyte *i.e.* quelle est la molécule détectée? Il est donc nécessaire, dans ce cas, de développer des surfaces permettant d'obtenir des interactions spécifiques entre le ligand et l'analyte [III25-III27] ou alors de pouvoir coupler l'application SPR avec la spectrométrie de masse. Bien que des systèmes de détection SPR intégrant des dispositifs de microfluidique continue soient déjà commercialisés, il n'y a que peu d'exemple de détection SPR avec un système de microfluidique en goutte permettant de contrôler plus facilement l'interface liquide/solide comme le travail pionnier de Galopin *et al.* [III24] à l'aide d'un système SAW), repris plus tard par Renaudin *et al.* [III28] ainsi que le groupe de M. Tarbizian (Malic *et al.* [III29, III30]) qui a développé une imagerie SPR d'ADN avec système EWOD).

## **3.2. Système de microfluidique digitale par actuation EWOD**

Dans le chapitre I, nous avons montré que l'utilisation de nanofeuillets d'oxyde de graphène (GO) permet d'éviter l'adsorption des protéines sur la surface et donc le piégeage de la ligne triple. Avant d'observer l'influence de l'utilisation du GO sur le signal du plasmon de surface, nous allons, dans cette partie, étudier le déplacement par actuation EWOD (banc décrit en Annexe 7) de gouttes de différents mélanges de BSA et de GO. Jusqu'à présent, seul l'emploi de Pluronic<sup>®</sup> permet de limiter la pollution des surfaces et donc de déplacer des liquides à fortes concentrations en protéines (10% de sérum de veau fœtal) dans un système EWOD dans l'air.

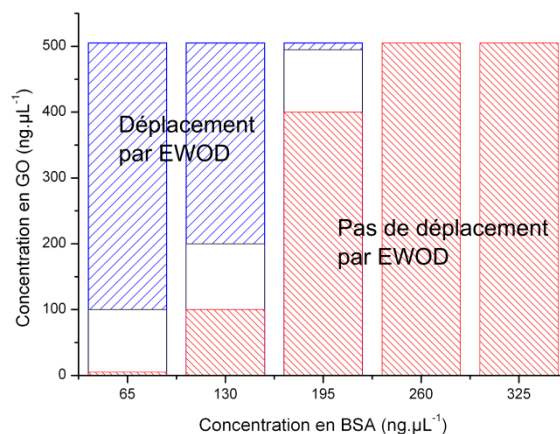
Afin de présenter une méthode alternative pour limiter la biopollution des surfaces en utilisant de l'oxyde de graphène, deux tests de déplacement seront réalisés avec des solutions de BSA et de GO, pour évaluer la tenue du système sur des déplacements de longue durée et sa capacité à faire des cycles de déplacement-arrêt. Ensuite, le déplacement d'une solution contenant du GO et une enzyme sera effectué afin de vérifier que ni son adsorption sur le GO ni son déplacement par EWOD ne modifie l'activité enzymatique de la protéine.

### **3.2.1. Tests de déplacement de solutions de BSA et de GO**

Afin de caractériser l'effet du GO dans des solutions de BSA lors du déplacement par EWOD, deux tests complémentaires ont été effectués :

- Le premier test consiste à effectuer 100 allers et retours sur 4 électrodes pendant une durée d'environ 13 min sous une tension de 100V. Le principal objectif de ce test est de déterminer si les protéines viennent piéger la ligne triple durant le déplacement et donc réduisent la robustesse du système.
- Lors du second test, la goutte effectue 3 allers et retours sur 4 électrodes puis s'arrête sur une électrode durant 2 min. Ce cycle de déplacements et d'arrêts est répété 10 fois sur les mêmes électrodes. Ce test a pour objectif de tester un protocole de déplacement typique dans un système d'analyse biochimique (déplacement d'une goutte jusqu'à la zone d'analyse, arrêt pour l'interaction puis de nouveau déplacement).

Chacun des ces deux tests est réalisé deux fois et les résultats sont présentés sur la Figure 47.



**Figure 47: Résultats du déplacement EWOD selon la concentration en BSA et en GO pour les deux tests, les rayures indiquent un succès des deux tests et les rayures descendant de gauche à droite indiquent un échec des tests**

La concentration de BSA (albumine sérique bovine) la plus importante pouvant être déplacée par EWOD sans oxyde de graphène, est de 6,5ng/µL (non présenté dans la Figure 47). Cette concentration particulièrement faible limite l'utilisation de l'EWOD dans l'air pour le déplacement de liquides biologiques purs comme le plasma sanguin (l'albumine représente environ ~60% des protéines plasmatiques). A l'image de ce que nous avons caractérisé en électromouillage statique au chapitre I, l'idée a été d'observer si la présence de GO avec la BSA permet d'augmenter la concentration de BSA déplaçable d'au moins un facteur 10. Cinq différentes concentrations de BSA ont été préparées, correspondant à 10, 20, 30, 40 et 50 fois la concentration maximale de BSA déplaçable par EWOD sans aucun adjuvant (6,5ng/µL).

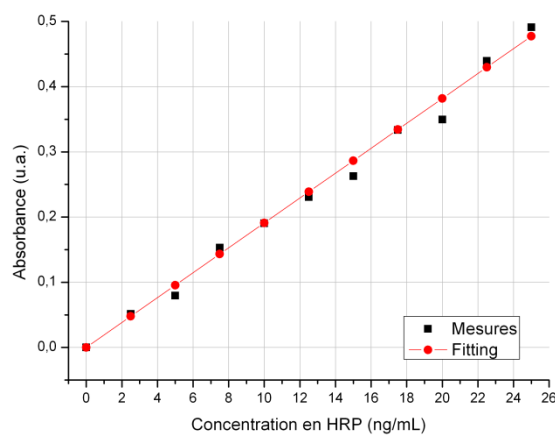
Le déplacement de la solution à 65ng/µL de BSA a pu être possible pour les deux tests avec l'ajout d'au moins 100ng/µL de GO. De même la solution à 130ng/µL de BSA a, quant à elle, réussi les deux tests avec l'ajout d'un minimum de 200ng/µL de GO. Dans ces deux cas, le ratio [BSA]/[GO] doit être supérieur ou égal à 0,65 pour réussir les tests. Ce ratio est identique à celui observé dans les expériences d'évaporation pour la conservation d'un angle de contact constant. Seul l'ajout de 500ng/µL de GO a permis de réussir les deux tests pour la solution à 195ng/µL de BSA. Par contre les solutions de 260ng/µL et 325ng/µL n'ont pas pu être déplacées même avec l'ajout d'oxyde de graphène jusqu'à 500ng/µL.

### **3.2.2. Préservation de l'activité enzymatique en présence de GO lors du déplacement**

Après avoir montré que l'oxyde de graphène permet d'augmenter la concentration de BSA que l'on peut déplacer par EWOD et donc limiter le biofouling, il est nécessaire de montrer que l'activité de la protéine est bien préservée lors son déplacement par EWOD en présence

de GO. La BSA n'ayant pas d'activité spécifique autre que le transport d'autres protéines, une enzyme sera choisie pour effectuer ce test. Notre choix se porte sur la peroxydase de raifort (HRP, Horse Radish Peroxidase). Contrairement à la BSA, nous avons observé que cette enzyme peut être déplacée sans GO jusqu'à une concentration de 10ng/μL, légèrement supérieure à celle observée pour le GO. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'elle ne présente pas la même séquence d'acides aminés qui cause l'aspect hydrophobe de la BSA. D'autre part la HRP possède un poids moléculaire plus faible que la BSA (~44kDa contre ~65kDa) et son point isoélectrique est de 7,2 ; la HRP est donc chargée positivement dans l'EDI (pH~5,5-6) alors que la BSA est chargée négativement (pI=4,7).

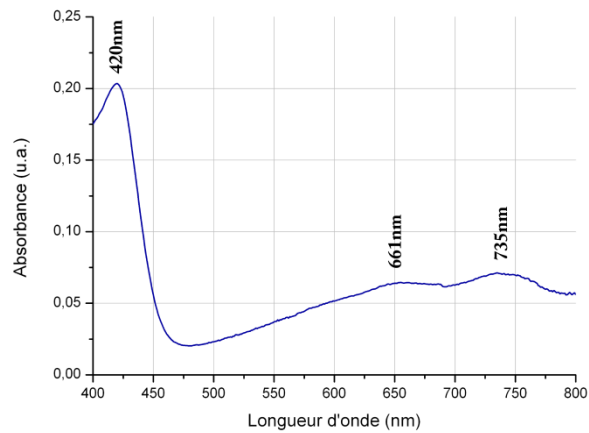
L'activité de la HRP peut être mesurée par un test colorimétrique. Ce test est basé sur une réaction d'oxydation de l'ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) catalysée par la HRP en présence d'eau oxygénée. L'ABTS oxydée présente un pic d'adsorption à 420nm. Tout d'abord une courbe de calibration (Figure 48), permettant d'établir une relation entre la concentration de HRP et son absorbance, est réalisée selon le protocole décrit en Annexe 8. Une régression linéaire est ensuite réalisée à partir des points obtenus. La droite obtenue présente un coefficient de corrélation  $R^2=0,991$ .



**Figure 48: Courbe de calibration de la HRP**

Afin d'assurer une adsorption de la plus grande partie de la HRP sur le GO et de pouvoir déplacer une concentration d'enzyme significative, nous avons fixé un rapport 1/1 de HRP / GO à une concentration de 50ng/μL. Les deux tests de déplacement EWOD sont alors effectués avec succès. Après son déplacement, une goutte de 2μL contenant donc 100ng de GO et 100ng de HRP est laissée sur la contre-électrode afin qu'elle sèche. La contre-électrode est ensuite immergée pendant 30 min dans la solution de 2mL contenant le mélange ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la concentration de HRP dans cette solution est de 50ng/mL (dilution de 100ng dans 2mL). La surface est ensuite retirée de la solution et est ensuite placée dans un

spectrophotomètre UV/Vis (PerkinElmer Inc., Etats-Unis) afin d'obtenir le spectre d'adsorption de 400 à 800nm.



**Figure 49: Spectre d'absorption de la solution d'ABTS et d'eau oxygénée après réaction avec la HRP de la surface**

Le spectre obtenu est représenté sur la Figure 49. La présence d'un pic d'absorption à 420nm indique clairement que la HRP déplacée en présence de GO est restée active. A l'aide de la courbe de calibration qui a été préalablement établie et de l'intensité de l'absorption à 420nm de la Figure 49, la concentration de la HRP restée active est alors déterminée à 11ng/mL. Cette concentration correspond à environ un 5<sup>ième</sup> de la concentration initiale de HRP.

### 3.2.3. Conclusion

Les expériences menées dans cette partie ont montré deux effets importants.

- Tout d'abord, la présence de GO a permis d'augmenter la concentration de BSA que l'on pouvait déplacer par actuation EWOD de gouttes. Deux tests ont été réalisés pour valider ce phénomène : (i) test de déplacement longue durée et (ii) test de cycles alternant déplacement et arrêt. La réussite de ces deux tests a été possible pour des solutions dont le ratio [BSA]/[GO] est inférieur ou égal à 0,65. Ce ratio n'est valable que pour des concentrations de BSA inférieure ou égale à 65ng/μL au-delà de laquelle il semble y avoir un effet de saturation.
- Ensuite, un test colorimétrique a été effectué pour vérifier l'activité d'une enzyme (HRP) ayant été déplacée par EWOD en présence de GO. Le test a révélé que la HRP est bien restée active. La réalisation préliminaire d'une courbe de calibration a aussi permis de déterminer le pourcentage de la concentration initial de HRP restant active. Ce pourcentage est d'environ 20%.

Ces deux résultats sont particulièrement importants. D'une part, la concentration maximale de BSA, protéine connue pour sa forte adsorption, pouvant être déplacée, a été augmentée d'un facteur 30 en présence de 500ng/μL de GO par rapport à la solution sans GO. D'autre part, le contrôle de l'activité enzymatique de la HRP a montré que la protéine restait bien active. Jusqu'à présent la principale stratégie pour limiter la biopollution dans les systèmes EWOD dans l'air était l'utilisation de Pluronic<sup>®</sup> proposée par le groupe de Wheeler [III31,III32]. Même si cette solution permet le déplacement de milieu de culture cellulaire contenant 10% de sérum de veau fœtal avec 0,02% (p/v) de polymère Pluronic<sup>®</sup>, la présence du polymère rend cette méthode incompatible avec des méthodes d'analyses comme la spectrométrie de masse. L'utilisation d'oxyde de graphène permet, au contraire, une analyse par spectrométrie de masse et même d'améliorer sa sensibilité [III33, III34].

### **3.3. Détection SPR des protéines en présence du GO**

#### **3.3.1. Introduction**

Dans le chapitre I, l'utilisation de nanofeuillets d'oxyde de graphène (GO) a été présentée, afin de prévenir l'adsorption des biomolécules sur la surface, par la caractérisation des propriétés de mouillage et d'électromouillage des solutions contenant de la BSA et du GO. De plus, le paragraphe précédent a montré l'intérêt de leur utilisation dans les dispositifs EWOD en améliorant leur résistance à la pollution des surfaces. Cependant, les protéines adsorbées sur le GO restent en suspension dans la solution et ne migrent pas vers l'interface liquide/surface. Il est donc nécessaire de désorber les protéines du GO afin qu'elles puissent s'adsorber sur la surface pour permettre leur détection SPR.

#### **3.3.2. Comment désorber ?**

L'adsorption de la BSA sur le GO est causée par la création de liaisons intermoléculaires entre ces deux molécules. Il est donc nécessaire de causer la rupture de ces liaisons pour permettre la désorption de la BSA du GO. La rupture de ces liaisons peut être réalisée à l'aide de plusieurs approches :

- Approche générale : La plupart des liaisons entre la BSA et le GO étant d'origine électrostatique (liaison hydrogène, interaction dipôle-dipôle), l'idée de cette approche est d'ajuster le pH de la solution de BSA/GO et/ou de jouer avec la force ionique de la solution *i.e.* la concentration en sels (cependant les sels pouvant causer un claquage de la couche diélectrique du dispositif EWOD, nous cherchons à nous affranchir de cette

solution) afin d'avoir des charges nettes de surface de même signe de façon à favoriser les répulsions électrostatiques.

- Approche spécifique : Dans ce cas, l'idée est d'immobiliser sur la surface, une molécule ayant une forte affinité pour la BSA. Dans ce cas, la BSA change de conformation pour interagir avec l'autre molécule causant le détachement de la BSA du GO du fait d'une plus forte interaction BSA/molécule que BSA/GO.

Dans la suite de cette partie, la désorption de la BSA du GO sera effectuée à l'aide d'une modification du pH de la solution (approche générale). L'approche spécifique n'est pas été retenue du fait de sa plus grande difficulté à mettre en œuvre (immobilisation des molécules sur la surface avec plusieurs étapes et validation de chaque étape par une analyse de surface XPS). Cette désorption par variation du pH peut s'effectuer en modifiant la charge surfacique de la BSA ou du GO. La variation de la charge de la BSA est bien connue [III35], son point isoélectrique (pI) étant égal à 4,7; la charge surfacique est positive pour des pH inférieurs au pI et négative pour des pH supérieurs au pI. Afin de connaître la charge surfacique des nanofeuillets de graphène, nous avons mesuré le pH puis le potentiel zêta des solutions d'EDI contenant du GO. Le pH des solutions sera mesuré à l'aide du pHmètre (Consort bvba, Belgique). Les mesures de potentiel zêta seront effectuées à l'aide du Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Angleterre). Les résultats de ces mesures<sup>9</sup> sont donnés sur le Tableau 15.

<b>Solution</b>	<b>pH</b>	<b>Potentiel zêta</b>
GO 50ng/μL	4,74	-43,67±0,75mV
GO 100ng/μL	4,51	-42,37±1,47mV
GO 50ng/μL dans NaOH	11,27	-33,43±0,47mV

**Tableau 15: Valeurs de pH et de potentiel zêta pour différentes solutions de GO**

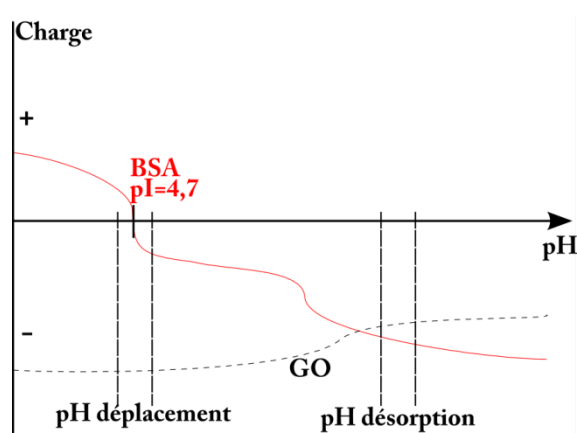
D'après ces mesures, plusieurs observations peuvent être tirées :

- L'ajout d'oxyde de graphène dans l'eau désionisée rend la solution plus acide (pH de EDI~5,5-6). Une concentration d'oxyde de graphène plus importante diminue légèrement le pH.
- Le potentiel zêta est quasiment équivalent pour les deux concentrations de GO mesurées. De plus ce potentiel étant négatif pour un pH~4,6, il ne semble pas possible d'avoir une charge surfacique positive dans une gamme de pH de 4 à 12 car la charge est positive quand le pH est inférieur au pI.

<sup>9</sup> Les mesures de pH et de potentiel zêta dépendent de la température. Elles ont été réalisées dans ce cas à 20°C.

- Le potentiel zêta d'une solution de 50ng/μL de GO en présence NaOH a augmenté de façon surprenant alors que l'on devrait s'attendre à une baisse. Cela est sans doute dû à la présence d'ions Na<sup>+</sup> qui créent une couche autour des sites des nanofeuillets chargés négativement.

Ces mesures de potentiel zêta des nanofeuillets de GO permettent d'affirmer qu'il n'est pas possible d'obtenir une charge surfacique positive pour ceux-ci. Des résultats similaires ont déjà été observés et publiés par Konkona et Vasudevan [III36]. Comme le signe de la charge surfacique du graphène ne peut pas être modifié, il sera nécessaire de jouer sur celui de la BSA.



**Figure 50: Illustration schématique de la variation, en fonction du pH de la charge de la BSA (relevée dans la littérature) et de celle du GO (que nous avons mesuré)**

La Figure 50 représente la variation de la charge surfacique de la BSA (issue de la littérature) et de celle que nous avons mesurée sur GO, en fonction du pH de la solution, [III35, III36]. D'après cette figure, on remarque que des solutions de BSA/GO déplacées ont un pH pour lequel il y a attraction électrostatique entre la BSA (chargée positivement ou faiblement chargée négativement) et les nanofeuillets de GO (chargés négativement). Ce cas est donc favorable à l'adsorption de la BSA sur le GO (interaction de type électrostatique). Pour effectuer la désorption de la BSA, l'objectif est donc d'augmenter le pH, *i.e.* rendre la solution plus basique, afin de charger négativement la BSA et donc de créer une répulsion électrostatique. Il faut noter que le changement de la charge nette de surface s'effectue de façon progressive. En effet, il y a protonation ou déprotonation des groupements acido-basiques en fonction de leur pKa. Il est donc préférable d'utiliser une solution suffisamment basique pour permettre la déprotonation d'une majorité de ces groupements. La solution choisie pour effectuer cette désorption, est une solution aqueuse de NaOH (hydroxyde de sodium, Carlo Erba Reagents, France). Cette solution a une concentration en NaOH de 25mM

et un pH de 12,5. Il est nécessaire d'indiquer que le milieu basique dans lequel les protéines sont présentes, vient sans doute modifier leur activité biologique. Dans le cas où il est nécessaire de conserver la protéine active, il sera nécessaire de neutraliser la solution avec un acide pour obtenir un pH neutre.

### **3.3.3. Validation de la désorption par SPR**

Afin de valider le principe de désorption, le protocole expérimental suivant sera utilisé. Le capteur SPR utilisé est une lame de verre dorée (Ti/Au 5/50nm) recouverte d'une fine couche de Cytop<sup>®</sup> (~30nm).

- Dépôt d'une goutte d'EDI de 2 $\mu$ L
- Injection d'une goutte de 2 $\mu$ L de solution de BSA, de GO ou de BSA et GO
- Injection dans la goutte contenant le mélange d'une goutte de 2 $\mu$ L de NaOH

Le suivi de ces différentes étapes sera effectué à l'aide du banc SPR. Le banc SPR présenté en Annexe 9, est composé :

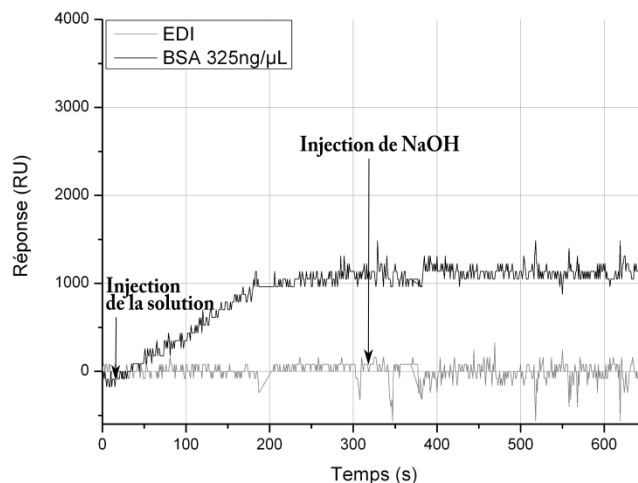
- d'un laser à colorant polarisé TM dont la longueur d'onde est de 760nm fournissant une puissance lumineuse d'environ 200mW (CR-690, Coherent Inc., Etats-Unis)
- d'une caméra CCD d'une résolution de 1280x1024 pixels (DCU224M, Thorlabs Inc., Etats-Unis)
- de divers éléments optiques (lentilles, miroirs) utilisés pour la focalisation et la concentration du faisceau laser.

Sur la lame métallisée, la largeur du faisceau laser est de l'ordre du millimètre.

Tout d'abord, des contrôles seront effectués afin d'observer l'influence du NaOH sur le plasmon des solutions contenant uniquement de la BSA et celles contenant uniquement du GO.

Sur les Figure 51-53, une goutte d'EDI servira de référence et de contrôle. De plus, elle permettra de vérifier que l'ajout d'une goutte de NaOH dans une goutte d'EDI ne vient pas modifier la position du minimum du plasmon. L'évolution du minimum du plasmon montre que l'ajout de NaOH (à 23mM) ne vient pas modifier l'indice optique à l'interface.

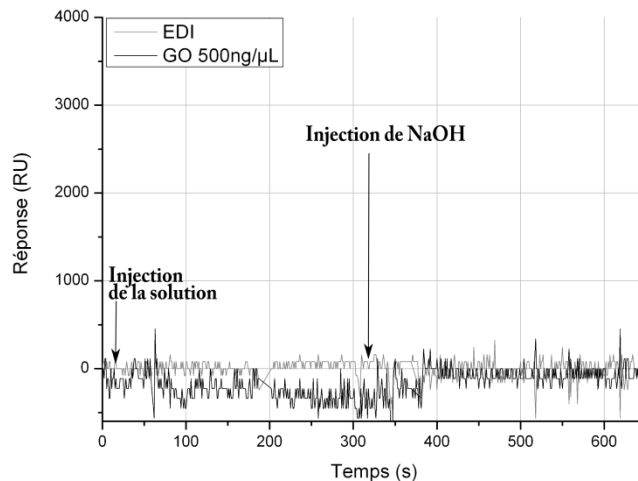
La Figure 51 illustre le cas de solutions contenant uniquement de la BSA (365ng/ $\mu$ L). Lors de l'injection de la solution de BSA dans la goutte d'EDI, il y a une augmentation de l'indice optique effectif de l'interface due à l'adsorption des protéines sur la surface amenant donc à un décalage angulaire du minimum de réflectivité. Par contre, quand la solution de NaOH est ajoutée, il n'y a pas de modification du signal plasmonique si ce n'est un phénomène de dilution de la BSA lors que celle-ci n'est pas totalement adsorbée à la surface.



**Figure 51: Evolution du minimum du plasmon pour une solution de 325ng/μL de BSA**

Ce premier contrôle sur deux solutions de concentrations différentes en BSA montre que la solution de NaOH n'a pas d'influence sur la réponse SPR de la BSA.

Le second contrôle effectué est présenté sur la Figure 52. Il s'agit d'observer l'influence d'une solution de GO sur le plasmon mais aussi l'influence de l'ajout de NaOH dans une solution de GO.

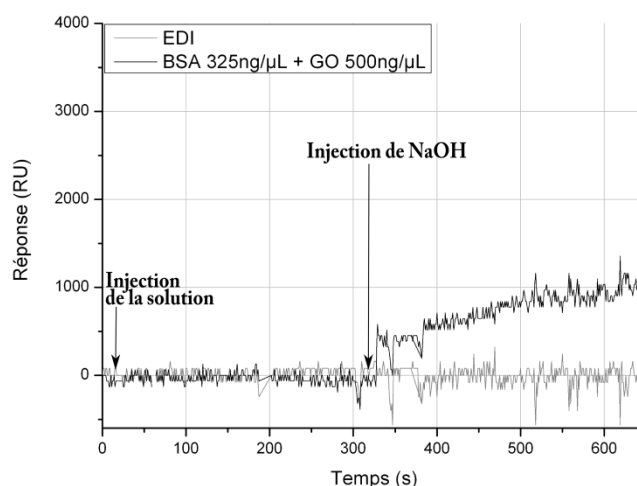


**Figure 52: Evolution du minimum du plasmon pour une solution de 500ng/μL de GO**

Lors de l'injection de de 500ng/μL de GO (Figure 52), il n'y a pas de modification de l'indice optique de l'interface et donc aucune évolution du minimum du plasmon. Ces observations viennent bien confirmer les mesures d'indice optique des solutions de GO qui ne variaient pas par rapport à celui de l'EDI. L'injection de NaOH dans les solutions de GO n'a pas d'effet notable sur la réponse du plasmon. Comme dans le cas de l'EDI, il n'y a pas de changement d'indice à l'interface liquide/surface.

L'ensemble des contrôles effectués sur l'EDI, des solutions de BSA et des solutions de GO indique que l'ajout de NaOH dans ces solutions ne vient pas modifier l'évolution du minimum du plasmon par rapport à son évolution initiale.

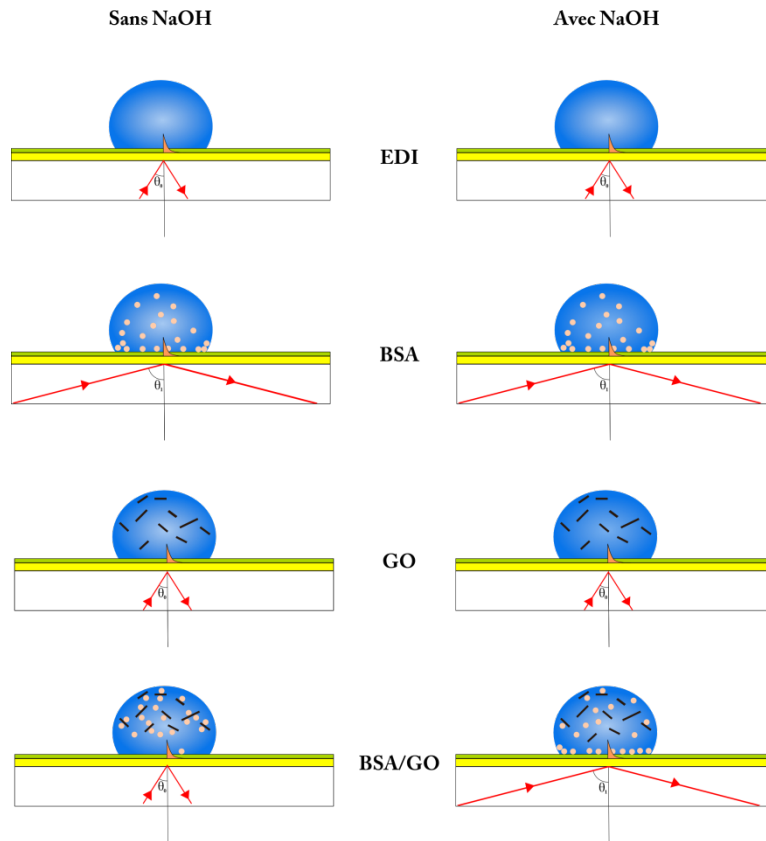
La Figure 53 représente l'évolution du minimum du plasmon pour deux mélanges de BSA/GO différents. Lors de l'injection d'une solution de 325ng/μL de BSA et de 500ng/μL de GO, on n'observe aucune modification de la réponse car les protéines sont adsorbées par le GO et restent en suspension dans la goutte. La concentration de BSA dans la zone sondée par SPR ( $\lambda/2=380\text{nm}$ ) Cependant, lorsqu'une goutte de NaOH est injectée, la réponse SPR est nettement modifiée. Cela confirme le phénomène de désorption de la BSA et sa migration à l'interface liquide surface.



**Figure 53: Evolution du minimum du plasmon pour une solution de 325ng/μL de BSA et 500ng/μL de GO**

### 3.3.4. Conclusion

La méthode de désorption mise au point pour relâcher la BSA adsorbée sur le GO est basée sur une modification du pH entraînant un changement de signe de la charge surfacique de la BSA. Ce changement permet d'augmenter les répulsions de type électrostatique entre la BSA et le GO. Le suivi de ces désorptions a été réalisé à l'aide du banc SPR du PhLAM. Les deux premiers contrôles effectués pour observer l'influence de la solution basique de NaOH sur les solutions de BSA et les solutions de GO ont montré que le NaOH n'influe pas la réponse de ces solutions. De plus, la solution de GO n'a pas d'effet sur le signal plasmonique car son indice optique est équivalent à celui de l'EDI. Pour des solutions de BSA et de GO, leur injection dans l'eau n'entraîne pas de modification de la position du minimum du plasmon. Par contre, lors de l'injection de NaOH, il y a une variation de cette position indiquant la désorption de la BSA. Ces différents cas sont représentés par la Figure 54.



**Figure 54: Effet du NaOH sur l'angle d'incidence pour différentes solutions (les angles sont volontairement exagérés)**

Cette méthode de désorption montre qu'il est possible d'utiliser les nanofeuillets d'oxyde de graphène dans un système microfluidique avec un capteur SPR. De plus, l'hydroxyde de sodium (NaOH) à 23mM peut être déplacé par EWOD.

### 3.4. Détection SPR sur surfaces superomniphobes

La présentation de la technique de détection par SPR, décrite en introduction, montre qu'il est nécessaire d'avoir une zone de contact entre la couche métallique, propageant le plasmon, et la solution, contenant la molécule à détecter, afin d'observer un changement d'indice optique. Ce film métallique qui est continu pour la détection SPR, peut être nanostructuré afin de créer des effets de couplage entre les nanostructures [III37-III39]. Ce phénomène est appelé SPR localisé ou LSPR (Localized-SPR). Bien que la réalisation de surfaces superhydrophobes nécessite une structuration de surfaces, il n'existe que peu d'exemples de surfaces superhydrophobes pour la LSPR. Le seul exemple qui existe, à ce jour, de capteurs LSPR superhydrophobes, a été publié dans *J. Phys. Chem. C* en 2011 par R. Brenier, (Laboratoire de physique de la matière condensée et des nanostructures à Lyon) [III40]. Ces surfaces sont réalisées à l'aide d'un dépôt de nanoparticules d'argent fonctionnalisées avec un

perfluorothiol sur un dépôt de nanoparticules d'oxyde de zirconium ( $ZrO_2$ ) avec ou sans revêtement de perfluorosilane. Les propriétés de mouillage de ces surfaces sont caractérisées et indiquent un état de Wenzel (angle de contact statique important  $137-144,5^\circ$  et forte hystérésis  $>36^\circ$ ) dans la plupart des cas. Il existe cependant un cas correspondant à un état de mouillage intermédiaire ( $151,5^\circ$  et  $23^\circ$ ) ainsi qu'un état de Cassie-Baxter ( $158^\circ$  et  $8^\circ$ ). Les propriétés optiques de ces surfaces sont caractérisées uniquement par des spectres de transmission et de réflexion. Il ne caractérise pas le déplacement du minimum de réflexion par modification de l'indice optique de l'interface.

Nous proposons, dans cette partie, de caractériser par résonance de plasmons de surface les surfaces superomniphobes (NP PFTS L) à base de nanostructures de ZnO, présentées dans le chapitre II. Ces surfaces présentent des états de mouillage de Cassie-Baxter ou intermédiaires. La nature de ces états empêche toute interaction entre le liquide et la surface d'or. De plus, l'épaisseur des nanostructures ( $\sim 1-10 \mu m$ ) est bien supérieure à la profondeur de pénétration du plasmon (380 nm). Il est donc nécessaire de réaliser localement une ouverture dans ces nanostructures afin de pouvoir établir ce couplage. La réalisation des ouvertures devrait permettre d'augmenter l'interaction liquide/surface par le confinement du contact entre la goutte et l'or, et d'augmenter la concentration en protéines du fait de l'aspect superomniphobe de la surface. Dans ce paragraphe, le procédé technologique pour la réalisation des ouvertures sera tout d'abord décrit. Ensuite, la validation expérimentale des ouvertures sera effectuée à l'aide du banc SPR.

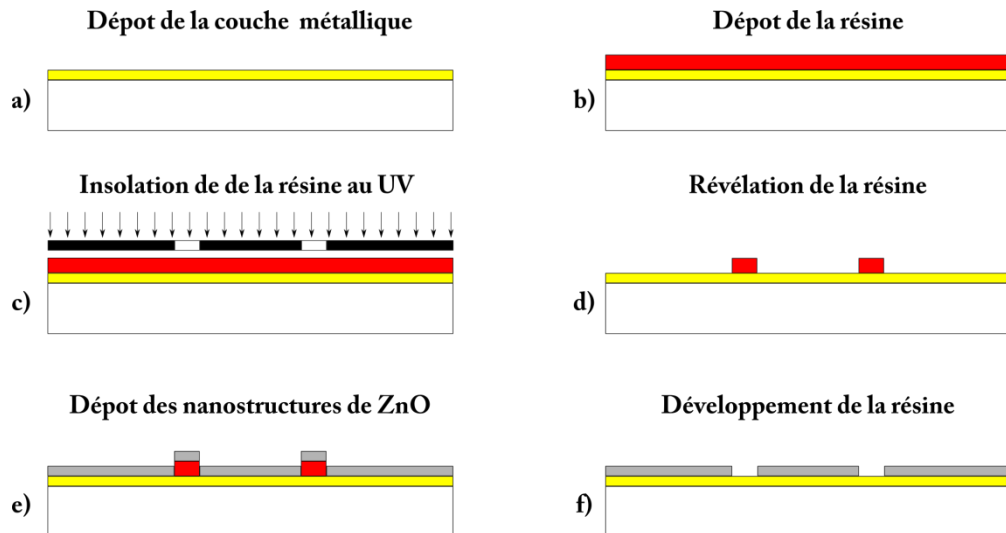
### 3.4.1. Réalisation des ouvertures

Les ouvertures dans les nanostructures de ZnO sont réalisées à l'aide d'un procédé standard de photolithographie. Deux approches peuvent alors être :

- Approche de type lift-off. Un dépôt de résine est utilisé comme masque physique lors du dépôt des nanostructures de ZnO, puis la résine est retirée à l'acétone. La Figure 55 montre un schéma de principe. Dans notre cas, cette approche présente des inconvénients majeurs. En effet, la résine est développée lorsqu'elle est en contact avec la solution basique servant au dépôt de ZnO.<sup>10</sup> Ce développement est d'autant plus rapide que la solution est chauffée. De plus, le dépôt de ZnO peut, dans certains cas, s'effectuer directement sur la résine empêchant ainsi sa dissolution ultérieure. Cette approche schématisée Figure 55, a été expérimentée mais sans succès.

---

<sup>10</sup> La plupart des développeurs utilisés pour les résines de type AZ sont des solutions basiques.



**Figure 55: Schéma de principe pour la réalisation des ouvertures par procédé lift-off**

- Approche par gravure du ZnO. Dans ce cas, le dépôt des nanostructures de ZnO est tout d'abord réalisé. La photolithographie est ensuite effectuée puis le ZnO non recouvert par la résine est gravé à l'aide d'une solution acide ( $H_3PO_4$ ). Une solution acide est utilisée car l'oxyde de zinc présente une meilleure solubilité en milieu acide qu'en milieu basique. De plus, la solution basique est à éviter du fait de la présence de la résine. Notre choix s'est porté sur l'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ ) car il permet une gravure mieux contrôlée et moins rapide que l'acide chlorhydrique (HCl) même dilué. Une fois la gravure du ZnO terminée, la résine est dissoute dans l'acétone. Un schéma de principe de cette approche est représenté sur la Figure 56. Néanmoins, cette approche présente également des inconvénients. Les nanostructures peuvent être soumises à une contrainte de la part de la résine et se détacher. De plus, il peut toujours rester quelques traces de ZnO sur l'or au fond de l'ouverture.

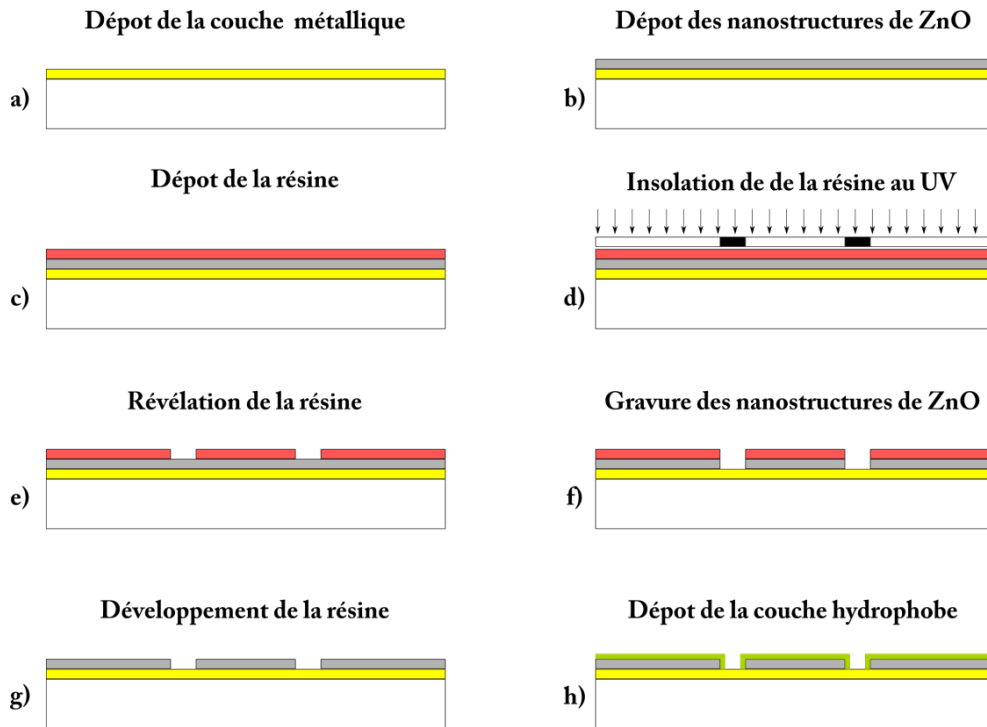
Chacune de ces deux approches présente à la fois des avantages et des inconvénients. Nous avons choisi d'utiliser la méthode par gravure afin d'éviter une éventuelle pollution du bain de ZnO par de la résine.

Les différentes étapes pour la réalisation des ouvertures dans les nanostructures de ZnO sont les suivantes.

La première étape consiste à effectuer un dépôt de nanostructures de ZnO sur un wafer en verre de 2" suivant la méthode présentée dans le chapitre II. Les nanostructures réalisées par dépôt sont des nanoparticules, ce choix se justifie du fait que celles-ci ne présentent pas d'état de Wenzel quelque soit le type de revêtement hydrophobe utilisé (*cf.* Chapitre II). Les

ouvertures sont ensuite réalisées par photolithographie, une fois le dépôt de nanostructures effectué. Le masque optique utilisé, comprend des ouvertures de deux largeurs différentes :

- Ouvertures de 480µm séparées de 890µm
- Ouvertures de 270µm séparées de 1100µm



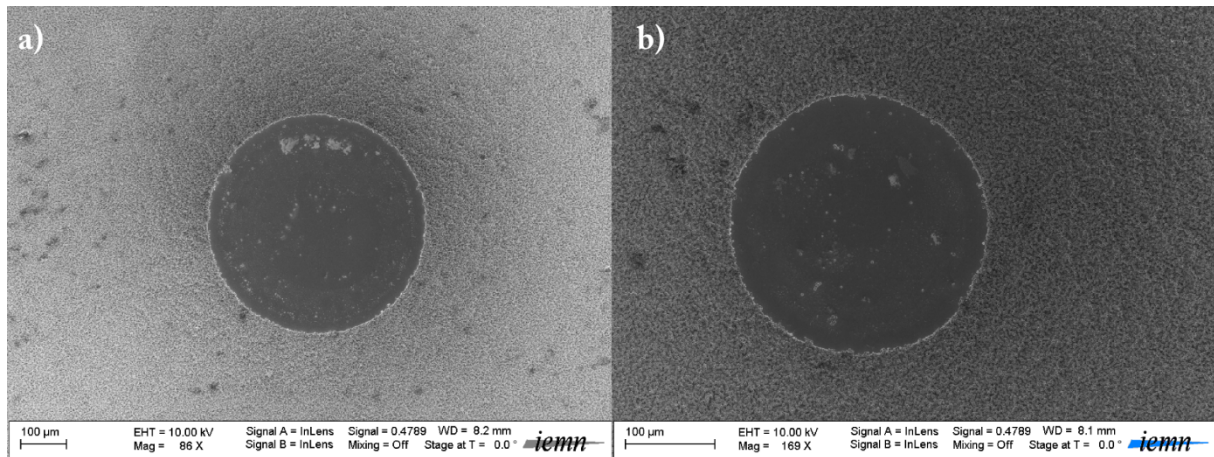
**Figure 56: Schéma récapitulatif des étapes technologiques pour la réalisation des ouvertures**

L'enduction de résine sur les nanostructures est réalisée selon les paramètres donnés dans le Tableau 16.

Résine	Enduction	1 <sup>er</sup> recuit	Insolation	2 <sup>ème</sup> recuit	Révélation
AZnLOF2070	1500/1000/30	90s@110°C	540mJ.cm <sup>-2</sup>	60s@110°C	90s@AZ326MIF

**Tableau 16: Paramètre de dépôt de résine pour la réalisation d'ouverture dans le ZnO**

Après vérification du bon développement de la résine au microscope optique, les nanostructures de ZnO sont gravées à l'aide d'une solution d'acide phosphorique H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> diluée dans l'EDI (2/3 d'EDI et 1/3 de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%)) pendant 5 min. Après la fin de la gravure, la surface est rincée à l'EDI et séchée par un flux d'azote. Ensuite, la surface est placée dans un bain d'acétone pour dissoudre la résine et un bain d'isopropanol pour enlever les traces d'acétone puis finalement séchée à l'azote. La Figure 57 montre des photos MEB des ouvertures de 480µm (Figure 57a) et de 270µm (Figure 57b).



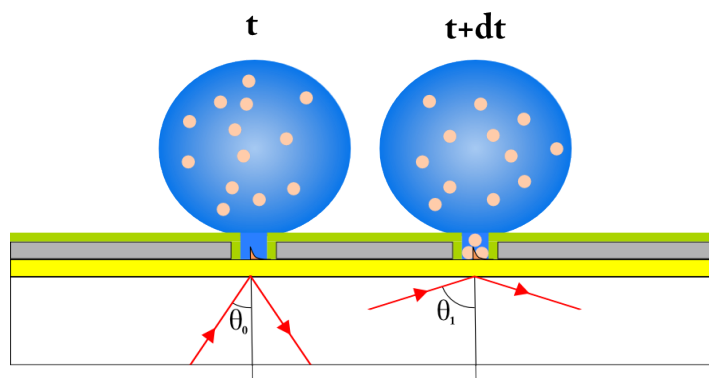
**Figure 57: Images MEB des ouvertures de a) 480 $\mu$ m et de b) 270 $\mu$ m**

Bien que la majorité des nanostructures ait été gravée, il reste quelques nanostructures de ZnO dans le fond des ouvertures. Cela montre que la gravure n'a pas été totale. Afin d'obtenir un fond de gravure propre, différents essais ont été réalisés (solution d'acide plus concentrée, temps de gravure plus lent). Cependant, ces différents essais n'ont pas permis d'améliorer sensiblement la propreté du fond de gravure. L'obtention d'un fond de gravure sans aucun résidu issu de la dégradation des nanostructures ou de nanostructures subsistantes n'a pas été possible. L'idée étant ici d'établir une preuve de concept de l'utilisation de surfaces superomniphobes comme capteur SPR, la présence de ces résidus n'a pas été considéré comme un inconvénient majeur.

Pour terminer, un revêtement hydrophobe est déposé afin de rendre la surface superomniphobe. Le revêtement hydrophobe qui sera utilisé pour les ouvertures, est le PFTS en phase liquide, (*cf.* Chapitre II).

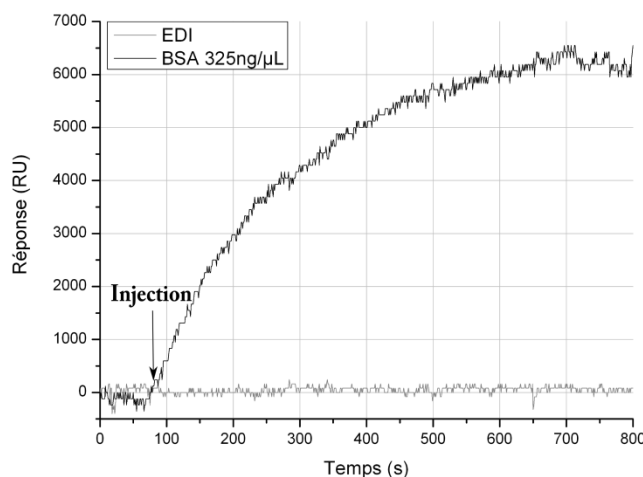
### **3.4.2. Validation des ouvertures au moyen du banc SPR**

Maintenant que les ouvertures de deux diamètres différents (270 $\mu$ m et 480 $\mu$ m) ont été réalisées, la validation de leur utilisation comme capteur SPR superomniphobe est effectuée avec une solution de BSA de concentration 325ng/ $\mu$ L. A noter ici que l'utilisation d'une caméra haute résolution CCD (DCU224M, Thorlabs Inc., Etats-Unis) se révèle particulièrement utile car les plasmons, très peu visibles à l'œil nu, sont facilement observables sur la vidéo retransmise *via* le programme Labview.



**Figure 58:Schéma de principe de la création d'un plasmon dans les ouvertures (les angles sont volontairement exagérés)**

Le protocole de validation des ouvertures est le suivant. Dans un premier temps, une goutte d'EDI de 5 ou 6 $\mu$ L est placée sur une ouverture. Puis une goutte d'un volume équivalent d'une solution avec de la BSA est ajoutée à la goutte d'EDI. Après un temps de réponse dû à la diffusion des protéines vers l'interface liquide/or, il y a une augmentation de l'indice optique de l'interface conduisant à une variation de l'angle d'indice et donc de la position du minimum du plasmon. Ce phénomène est illustré dans la Figure 58. Les évolutions du minimum du plasmon dans les ouvertures de 480 $\mu$ m sont présentées sur la Figure 59. Le dépôt d'une goutte de 4 $\mu$ L n'ayant pas été possible du fait du caractère superomniphobe (déperlant) de la surface, des gouttes de 6 $\mu$ L ont été déposées.

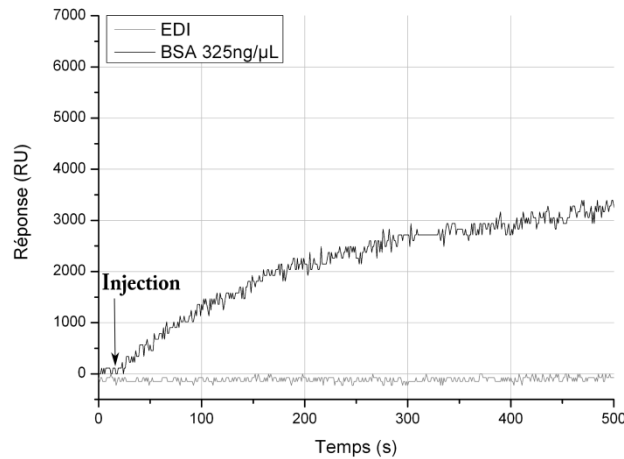


**Figure 59:Evolution du minimum du plasmon dans des ouvertures de 480 $\mu$ m pour un goutte de 6 $\mu$ L**

Pour ces deux volumes, quand une goutte d'EDI est injectée dans l'EDI, il n'y a pas de déplacement du minimum du plasmon. Bien que le signal soit légèrement bruité, celui-ci reste relativement constant et servira de référence. Sur la Figure 59, une montée extrêmement

rapide est observée lors de l'injection aux alentours de 75s. Le signal commence à se stabiliser autour de 6100RU à partir de 700s.

Une expérience identique de validation de l'ouverture a été effectuée sur celles de 270 $\mu$ m de diamètre. Cependant, dans ce cas, il a fallu augmenter le volume de la goutte à 8 $\mu$ L afin de procéder à son dépôt (caractère déperlant plus important pour une ouverture réduite). Le résultat de cette expérience est représenté sur la Figure 60.



**Figure 60: Evolution du minimum du plasmon dans des ouvertures de 270 $\mu$ m avec des gouttes de 8 $\mu$ L**

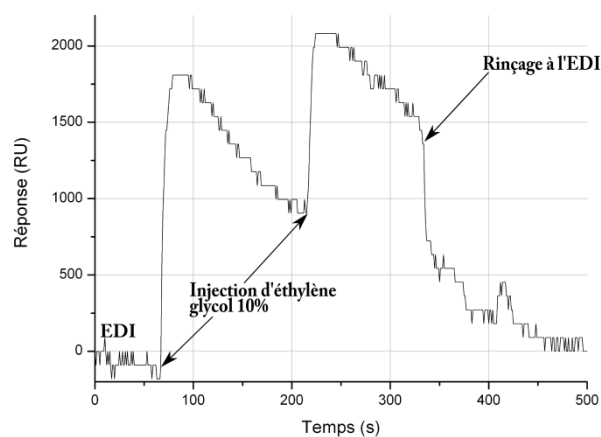
Comme précédemment, une goutte d'EDI est déposée et sert de référence lors de l'expérience. Lors de l'injection de la goutte, la réponse augmente de façon quasi-linéaire jusqu'à environ 175s puis la réponse s'infléchit et augmente de façon moins rapide et finit par se stabiliser autour de 3250RU.

Dans le cas de l'ouverture de 480 $\mu$ m, une montée plus importante du signal plasmonique est observée bien que la quantité de BSA soit plus faible (1950ng) que pour l'ouverture de 270 $\mu$ m (2600ng). Ceci peut s'expliquer par la différence de diamètre entre les ouvertures mais aussi par la propreté du fond de gravure.

### 3.4.3. Réalisation d'une cinétique

L'utilisation des capteurs SPR superomniphobes avec des ouvertures de 480 $\mu$ m a été démontrée pour la détection de BSA. Dans cette partie, nous allons chercher à réaliser une « cinétique » *i.e.* le suivi du changement d'indice en temps réel avec des étapes d'injection et de rinçage. Dans ce cas, les étapes d'injection se feront avec une solution d'éthylène glycol à 10% car les injections de BSA conduisent à un changement d'indice de manière irréversible à cause de l'adsorption de la BSA sur la surface. L'évolution du minimum du plasmon lors de ces différentes étapes est présentée sur la Figure 61. Tout d'abord, une goutte de 4 $\mu$ L d'EDI

est placée dans l'ouverture. Une première goutte de 4 $\mu$ L d'éthylène glycol à 10% est injectée, entraînant un déplacement rapide du minimum du plasmon représenté sur la Figure 61 par une forte hausse de la réponse en RU traduisant un apport conséquent en éthylène glycol augmentant l'indice à l'interface. Ensuite, le signal décroît de façon régulière, il y a homogénéisation du mélange EDI/éthylène glycol dans la goutte. En rajoutant de nouveau une goutte de 4 $\mu$ L d'éthylène glycol, une brusque hausse de la réponse est observée. Cependant, cette hausse est plus faible que lors de la première injection car la variation de la concentration en éthylène glycol est plus faible. Ensuite, il y a de nouveau une baisse du signal correspondant à une homogénéisation s'effectuant au sein de la goutte par diffusion. Vers 330s, l'ouverture est rincée avec de l'EDI. A l'aide d'une pompe péristaltique, une partie du volume de la goutte est aspirée puis une goutte d'EDI est injectée, cette étape est répétée plusieurs fois jusqu'à atteindre le niveau de départ correspondant au niveau de l'EDI.



**Figure 61: Evolution du minimum du plasmon lors de différentes étapes d'injection et de rinçage dans une ouverture de 480 $\mu$ m**

### 3.4.4. Conclusion

Dans ce paragraphe, la réalisation de capteur SPR superomniphobe puis leur validation expérimentale ont été présentées. Leur fabrication a été effectuée à travers quatre étapes successives :

- Dépôt des nanostructures de ZnO
- Photolithographie
- Gravure du ZnO
- Dépôt d'un revêtement hydrophobe

Ce procédé de fabrication des ouvertures est basé sur des méthodes utilisées de façon standard en microfabrication. Cela a permis de réaliser des ouvertures de 2 diamètres différents : 270 $\mu\text{m}$  et 480 $\mu\text{m}$ .

La validation SPR des ouvertures s'est effectuée par deux méthodes :

- Dépôt d'une goutte d'une solution de BSA dans une goutte d'EDI pour le suivi d'un changement d'indice dans les ouvertures des deux diamètres.
- Etapes successives d'injection et de rinçage de l'ouverture de 480 $\mu\text{m}$  pour le suivi en temps d'une succession de changement d'indice.

La première méthode a permis de valider l'obtention d'un signal plasmonique à l'intérieur des ouvertures des deux diamètres. Lors de l'injection d'une solution contenant des protéines dans la goutte déposée sur l'ouverture, il y a une variation de la réponse en RU qui est causée par l'adsorption des protéines à l'interface or/liquide et qui entraîne une augmentation de l'indice optique. De plus, cette variation semble dépendre de la taille des ouvertures et de la propreté du fond de gravure.

Pour finir, la seconde méthode a permis de démontrer l'utilisation de l'ouverture de 480 $\mu\text{m}$  pour effectuer le suivi d'une succession de changement d'indice à l'aide d'une solution d'éthylène glycol à 10%. Les injections de l'éthylène glycol a bien conduit à une variation de la réponse (augmentation de l'indice) et l'étape de rinçage avec de l'EDI a bien permis de revenir au niveau initial correspondant à l'absence d'éthylène glycol.

Ces différentes expériences ont montré la possibilité d'utiliser les surfaces superomniphobes comme capteur SPR afin de limiter la pollution de la surface et d'augmenter l'interaction liquide/surface dans l'ouverture par un contraste de mouillabilité (superomniphobe sur les nanostructures et hydrophile dans l'ouverture).

## **Conclusion**

Dans ce chapitre, la méthode de détection SPR a été présentée. Cette méthode permet la détection d'un analyte sans marquage, en temps réel et peut être intégrée avec un système microfluidique. Dans un premier temps, la validation de l'utilisation de l'oxyde de graphène (GO) pour diminuer la biopollution dans le système EWOD a été effectuée. Les nanofeuillets de GO adsorbent la BSA par des effets principalement électrostatiques et permet d'augmenter la concentration de protéines déplaçable. La ratio  $[BSA]/[GO]$  nécessaire pour permettre le déplacement doit être inférieur à 0,65 avec cependant un effet de saturation pour des concentrations de BSA à partir de 300ng/ $\mu\text{L}$ . La BSA n'ayant pas d'activité biologique spécifique, nous avons utilisé une enzyme (la HRP) afin de démontrer que l'enzyme reste

toujours active après déplacement par EWOD en présence de GO. La concentration de l'enzyme active est égale à un 5<sup>ième</sup> de la concentration de l'enzyme déplacée. Cette diminution de concentration entre l'enzyme déplacée et l'enzyme active peut être expliquée par le fait que le site actif de la HRP interagit avec le GO la rendant donc inactive.

Cependant, cette méthode de transport des protéines ne permet pas la migration des protéines à l'interface liquide/surface et donc une détection SPR car les protéines restent en suspension dans le liquide à cause de leur adsorption sur le GO. Il est donc nécessaire de désorber au préalable les protéines afin de pouvoir les détecter. Cette désorption est effectuée par changement de pH de la solution. Ceci amène à une modification du signe de la charge surfacique de la BSA et favorise les répulsions électrostatiques entre la BSA et le GO. Cette désorption, avec l'aide d'une solution basique de NaOH, a permis de procéder à une détection SPR de BSA 325ng/μL (avec 500ng/μL de GO). De plus, l'ajout de NaOH dans les solutions de BSA et les solutions de GO n'a aucune influence sur la réponse du plasmon. Bien que cette solution permette de désorber facilement la BSA du GO, l'aspect basique de la solution peut entraîner une dénaturation de la protéine qu'il faudra neutraliser à l'aide d'une solution acide après retrait du GO pour éviter une ré-adsorption.

Pour finir, des ouvertures de deux diamètres différents (270μm et 480μm) ont été réalisées dans les surfaces superomniphobes *via* la photolithographie suivie d'une étape de gravure humide afin de réaliser un contact entre le liquide et la surface métallisée. Ces deux ouvertures ont permis d'obtenir des capteurs SPR superomniphobes qui ont été validés avec une solution de BSA de 325ng/μL. De plus, le suivi en temps réel d'une variation de l'indice optique de l'interface a été effectué dans les ouvertures de 480μm avec une solution d'éthylène glycol 10% démontrant la possibilité d'utiliser ces ouvertures pour réaliser des cinétiques d'interaction entre le ligand et la cible.

Pour conclure, ce chapitre a permis de confirmer les deux méthodes retenues pour limiter la biopollution des surfaces. Les solutions de BSA et de GO ont pu être détectées par SPR par désorption, de plus la présence de GO rend le couplage avec une analyse par spectrométrie de masse possible. La réalisation de surfaces superomniphobes et compatibles SPR a été effectuées par la première fois. Ces surfaces permettent de localiser à un endroit précis la goutte et d'augmenter l'interaction liquide/surface à cet endroit. Dans ce chapitre, nous avons validé plusieurs solutions pour limiter la biopollution compatible avec une détection SPR. La réalisation de la plateforme microfluidique EWOD avec la détection SPR passera par l'intégration de ces différentes briques de base.

## Bibliographie

- [III1] M. Beaugeois. *Modélisation et caractérisation de composants optiques submicroniques pour le démultiplexage en longueur d'onde: application de la résonance de plasmon de surface à la détection d'espèces biologiques en goutte*. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, 2007.
- [III2] E. Galopin. *Adressage par Microfluidique Digitale: Application à la Détection de Marqueurs Biologiques par Plasmon de Surface et Détection Intégrée*. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, 2007.
- [III3] N. Maalouli. *Développement d'un banc plasmonique en goutte et conception de nouvelles interfaces appliquées à la biodétection*. Thèse de doctorat, Université Lille 1 Sciences et Technologies, 2012.
- [III4] D. D. Edberg, J. E. Bruce, W. F. Siems, and R. Reeves. In vivo posttranslational modifications of the high mobility group Ala proteins in breast cancer cells of differing metastatic potential. *Biochemistry*, 43(36):11500–11515, 2004.
- [III5] J. N. Arnold, R. Saldova, U. M. A. Hamid, and P. M. Rudd. Evaluation of the serum n-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics*, 8(16):3284–3293, 2008.
- [III6] H. Moon, A. R. Wheeler, R. L. Garrell, J. A. Loo, and C. J. Kim. An integrated digital microfluidic chip for multiplexed proteomic sample preparation and analysis by MALDI-MS. *Lab on a Chip*, 6(9):1213–1219, 2006.
- [III7] K. P. Nichols and H. Gardeniers. A digital microfluidic system for the investigation of pre-steady-state enzyme kinetics using rapid quenching with MALDI-ToF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 79(22):8699–8704, 2007.
- [III8] M. J. Jebrail and A. R. Wheeler. Digital microfluidic method for protein extraction by precipitation. *Analytical Chemistry*, 81(1):330–335, 2009.
- [III9] F. Lapierre, G. Piret, H. Drobecq, O. Melnyk, Y. Coffinier, V. Thomy, and R. Boukherroub. High sensitive matrix-free mass spectrometry analysis of peptides using silicon nanowires-based digital microfluidic device. *Lab on a Chip*, 11(9):1620–1628, 2011.
- [III10] L. Nicu and T. Leichle. Biosensors and tools for surface functionalization from the macro-to the nanoscale: The way forward. *Journal of Applied Physics*, 104(11):1101, 2008.
- [III11] C. Delattre, C. P. Allier, Y. Fouillet, D. Jary, F. Bottausci, D. Bouvier, G. Delapierre, M. Quinaud, A. Rival, L. Davoust, and C. Peponnet. Macro to microfluidics system for biological environmental monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*, 36(1):230–235, 2012.
- [III12] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer. Miniaturized total chemical-analysis systems - a novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B-chemical*, 1(1-6):244–248, 1990.
- [III13] S. Y. Teh, R. Lin, L. H. Hung, and A. P. Lee. Droplet microfluidics. *Lab on a Chip*, 8(2):198–220, 2008.

- [III14] F. Lapiere. *Electromouillage sur diélectrique (EWOD): Conception et réalisation de dispositifs microfluidiques originaux sur surfaces superhydrophobes*. Thèse de doctorat, Université Lille 1 Sciences et Technologies, 2011.
- [III15] V. Srinivasan, V. K. Pamula, and R. B. Fair. Droplet-based microfluidic lab-on-a-chip for glucose detection. *Analytica Chimica Acta*, 507(1):145–150, 2004.
- [III16] V. Srinivasan, V. K. Pamula, and R. B. Fair. An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids. *Lab on a Chip*, 4(4):310–315, 2004.
- [III17] L. Malic, D. Brassard, T. Veres, and M. Tabrizian. Integration and detection of biochemical assays in digital microfluidic LoC devices. *Lab on a Chip*, 10(4):418–31, 2010.
- [III18] E. M. Miller, A. H. C. Ng, U. Uddayasankar, and A. R. Wheeler. A digital microfluidic approach to heterogeneous immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(1):337–345, 2011.
- [III19] K. Choi, J. Y. Kim, J. H. Ahn, J. M. Choi, M. Im, and Y. K. Choi. Integration of field effect transistor-based biosensors with a digital microfluidic device for a lab-on-a-chip application. *Lab on a Chip*, 12(8):1533–1539, 2012.
- [III20] G. Perry, V. Thomy, M. R. Das, Y. Coffinier, and R. Boukherroub. Inhibiting protein biofouling using graphene oxide in droplet-based microfluidic microsystems. *Lab on a Chip*, 12:1601–1604, 2012.
- [III21] R. Dufour, G. Perry, M. Harnois, Y. Coffinier, V. Thomy, V. Senez, and R. Boukherroub. From micro to nano reentrant structures: hysteresis on superomniphobic surfaces. *Colloid & Polymer Science*, 1–7, 2012. Doi:10.1007/s00396-012-2750-7.
- [III22] G. Perry, Y. Coffinier, V. Thomy, and R. Boukherroub. Sliding droplets on superomniphobic zinc oxide nanostructures. *Langmuir*, 28(1):389-395, 2012.
- [III23] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundstrom. Surface-plasmon resonance for gas-detection and biosensing. *Sensors and Actuators*, 4(2):299–304, 1983.
- [III24] E. Galopin, M. Beaugeois, B. Pinchemel, J. C. Camart, M. Bouazaoui, and V. Thomy. SPR biosensing coupled to a digital microfluidic microstreaming system. *Biosensors & Bioelectronics*, 23(5):746–750, 2007.
- [III25] M. B. Villiers, S. Cortes, C. Brakha, J. P. Lavergne, C. A. Marquette, P. Deny, T. Livache, and P. N. Marche. Peptide-protein microarrays and surface plasmon resonance detection: Biosensors for versatile biomolecular interaction analysis. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(4):1554–1559, 2010.
- [III26] R. Bombera, L. Leroy, T. Livache, and Y. Roupioz. DNA-directed capture of primary cells from a complex mixture and controlled orthogonal release monitored by SPR imaging. *Biosensors & Bioelectronics*, 33(1):10–16, 2012.
- [III27] N. Maalouli, A. C. Gouget-Laemmel, B. Pinchemel, M. Bouazaoui, J. N. Chazaviel, F. Ozanam, Y. K. Yang, P. Burkhard, R. Boukherroub, and S. Szunerits. Development of a metal-chelated plasmonic interface for the linking of His-peptides with a droplet-based surface plasmon resonance read-off scheme. *Langmuir*, 27(9):5498–5505, 2011.

- [III28] A. Renaudin, V. Chabot, E. Grondin, V. Aimez, and P. G. Charette. Integrated active mixing and biosensing using surface acoustic waves (SAW) and surface plasmon resonance (SPR) on a common substrate. *Lab on a Chip*, 10(1):111–115, 2010.
- [III29] L. Malic, T. Veres, and M. Tabrizian. Two-dimensional droplet-based surface plasmon resonance imaging using electrowetting-on-dielectric microfluidics. *Lab on a Chip*, 9(3):473–475, 2009.
- [III30] L. Malic, T. Veres, and M. Tabrizian. Nanostructured digital microfluidics for enhanced surface plasmon resonance imaging. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(5):2053–2059, 2011.
- [III31] V. N. Luk, G. C. H. Mo, and A. R. Wheeler. Pluronic additives: A solution to sticky problems in digital microfluidics. *Langmuir*, 24(12):6382–6389, 2008.
- [III32] S. H. Au, P. Kumar, and A. R. Wheeler. A new angle on pluronic additives: Advancing droplets and understanding in digital microfluidics. *Langmuir*, 27(13):8586–8594, 2011.
- [III33] L. A. L. Tang, J. Z. Wang, and K. P. Loh. Graphene-based SELDI probe with ultrahigh extraction and sensitivity for DNA oligomer. *Journal of the American Chemical Society*, 132(32):10976–10977, 2010.
- [III34] J. Lee, Y. K. Kim, and D. H. Min. Laser desorption/ionization mass spectrometric assay for phospholipase activity based on graphene oxide/carbon nanotube double-layer films. *Journal of the American Chemical Society*, 132(42):14714–14717, 2010.
- [III35] J. Y. Yoon and R. L. Garrell. Preventing biomolecular adsorption in electrowetting-based biofluidic chips. *Analytical Chemistry*, 75(19):5097–5102, 2003.
- [III36] B. Konkena and S. Vasudevan. Understanding aqueous dispersibility of graphene oxide and reduced graphene oxide through pK(a) measurements. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(7):867–872, 2012.
- [III37] N. C. Lindquist, P. Nagpal, K. M. McPeak, D. J. Norris, and S. H. Oh. Engineering metallic nanostructures for plasmonics and nanophotonics. *Reports On Progress In Physics*, 75(3):036501, 2012.
- [III38] A. V. Kabashin, P. Evans, S. Pastkovsky, W. Hendren, G. A. Wurtz, R. Atkinson, R. Pollard, V. A. Podolskiy, and A. V. Zayats. Plasmonic nanorod metamaterials for biosensing. *Nature Materials*, 8(11):867–871, 2009.
- [III39] E. Galopin, J. Niedziolka-Jonsson, A. Akjouj, Y. Pennec, B. Djafari-Rouhani, A. Noual, R. Boukherroub, and S. Szunerits. Sensitivity of plasmonic nanostructures coated with thin oxide films for refractive index sensing: Experimental and theoretical investigations. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(27):11769–11775, 2010.
- [III40] R. Brenier. Bifunctional surfaces with superhydrophobic and plasmonic properties. *Journal of Physical Chemistry C*, 115(21):10544–10549, 2011.





# Conclusion Générale et Perspectives

Les travaux présentés dans ce manuscrit proposent des solutions originales pour limiter la biopollution au sein des systèmes microfluidiques des laboratoires-sur-puce. De plus, la compatibilité de ces solutions avec la résonance de plasmons de surface a été démontrée.

Dans le chapitre I, nous avons vu que l'adsorption non spécifique de biomolécules est un problème majeur en microfluidique et particulièrement en microfluidique digitale de type EWOD. Dans ce cadre, la solution largement adoptée consiste à l'utilisation d'un système biphasique (eau/huile) qui n'est compatible qu'avec des biocapteurs optiques. Il est possible de limiter la pollution de surface en travaillant dans l'air en utilisant des surfactants mais cela amène certains inconvénients (diminution des tensions de surface et tensions d'actuation plus élevées). Nous sommes ainsi arrivés à présenter une solution originale via l'utilisation de nanofeuillets d'oxyde de graphène (GO). Ces derniers, en solution avec des protéines permettant le maintien des protéines en suspension dans le liquide, dû à leur adsorption sur les nanofeuillets. La protéine utilisée pour ces études est l'Albumine Sérique Bovine (BSA) connue pour sa forte adhésion aux surfaces. L'étude des propriétés de mouillage, dans un premier temps, a montré que la présence de GO avec des protéines permet de : (i) garder la tension de surface à un niveau équivalent à la tension de surface de l'eau désionisée ( $\sim 72\text{mN/m}$  jusque  $650\text{ng}/\mu\text{L}$  de BSA avec  $500\text{ng}/\mu\text{L}$  de GO) indiquant l'absence des protéines à l'interface air/liquide, (ii) déplacer la ligne triple lors de l'évaporation ( $195\text{ng}/\mu\text{L}$  de BSA et  $500\text{ng}/\mu\text{L}$  de GO), dans ce cas, les protéines sur l'oxyde de graphène s'adsorbent pas sur la surface et (iii) diminuer l'hystérésis de l'angle de contact jusqu'à des valeurs inférieures à celle de l'eau désionisée ( $7^\circ$  pour  $195\text{ng}/\mu\text{L}$  de BSA et  $400\text{ng}/\mu\text{L}$  de GO et  $14^\circ$  pour l'eau désionisée). Ces expériences ont mis en évidence l'apport de l'oxyde de graphène au sein de solutions de protéines notamment sur la mobilité de la ligne triple. Les expériences menées en électromouillage statique ont montré qu'il était possible d'obtenir une réversibilité du phénomène pour des solutions de protéines et d'oxyde de graphène pour des concentrations maximum de  $325\text{ng}/\mu\text{L}$  de BSA avec  $600\text{ng}/\mu\text{L}$  de GO. Cependant, ces effets semblent limités par un phénomène de saturation intervenant dans le cas de fortes concentrations en protéines à partir de  $195\text{ng}/\mu\text{L}$  de BSA même en présence d'oxyde de graphène.

Une autre solution complémentaire pour limiter la biopollution est l'utilisation de surfaces texturées dont l'utilisation a déjà été présentée durant la thèse de Florian Lapierre. Le second

chapitre a donc présenté la réalisation et la caractérisation de surfaces superomniphobes. A l'aide d'un dépôt de nanostructures d'oxyde de zinc effectué avec un simple bain chimique à basse température ( $\sim 90^\circ\text{C}$ ), différentes formes de nanostructuration ont pu être obtenues par la variation du sel de zinc ou de l'éthanolamine utilisés et/ou du temps de déposition. Trois principales formes ont été retenues en vue de l'étude des propriétés de mouillage: (i) nanorods, (ii) nanofleurs et (iii) nanoparticules. Ces nanostructures recouvertes de différentes couches hydrophobes (perfluorosilane déposé en phase vapeur ou liquide, polymère déposé par plasma  $\text{C}_4\text{F}_8$ ) ont présenté des angles de contact statiques supérieurs à  $140^\circ$  pour des tensions de surface supérieures à  $35\text{mN/m}$ . Il n'y a dans ce cas aucune influence de la structuration ou du revêtement. Au contraire, les mesures d'hystérésis ont montré de plus fortes variations dues principalement à la morphologie de la structuration. Les nanoparticules qui ont une structuration formant des angles ré-entrants, par rapport aux angles saillants des nanorods et des nanofleurs, présentent les meilleurs propriétés de mouillage avec des hystérésis inférieurs à  $40^\circ$  quelque soit le revêtement hydrophobe. De plus, ces surfaces permettent de limiter l'adsorption non spécifique par leur résistance à l'imprégnation d'une solution de biomolécules fluorescentes.

Le troisième chapitre a permis de valider l'utilisation des solutions présentées précédemment. Dans une première partie, nous avons confirmé dans un système microfluidique à base d'électromouillage-sur-diélectrique que la présence d'oxyde de graphène permet de limiter la biopollution. En testant le déplacement (durée de 13 min sans arrêt, typique d'un système d'analyse, déplacement puis arrêt de 3 min) de solutions de protéines avec de l'oxyde de graphène, nous avons démontré que l'oxyde de graphène augmente d'un facteur 30 la concentration de protéines déplaçables ( $195\text{ng}/\mu\text{L}$  contre  $6,5\text{ng}/\mu\text{L}$ ). De plus, nous avons également démontré, à l'aide un simple test colorimétrique, qu'une enzyme déplacée en présence d'oxyde de graphène reste active dans une proportion de un  $5^{\text{ième}}$  de la concentration initiale en enzyme. Dans une seconde partie, la compatibilité de l'oxyde de graphène et des surfaces superomniphobes avec la détection à résonance de plasmons de surface (SPR) a ensuite été étudiée. La modification des charges de surface des protéines à l'aide d'une solution basique a permis leur désorption et leur détection par SPR. La réalisation d'ouvertures de deux diamètres différents ( $270$  et  $480\mu\text{m}$ ) sur les surfaces de nanostructures de ZnO superomniphobes a été effectuée. Ces ouvertures ont permis la détection de biomolécules par SPR ainsi qu'un suivi en temps réel du changement d'indice à l'interface liquide/surface.

Ces travaux ont contribué à apporter des solutions originales pour limiter la biopollution des surfaces, problématique majeure dans les systèmes microfluidiques. Néanmoins certains points pourraient être étudiés plus en détails :

- Etudier l'influence du degré d'oxydation du GO sur l'adsorption de différents types de biomolécules (dans un sérum par exemple) ainsi que leur fonctionnalisation avec une chimie spécifique pour réaliser un enrichissement en biomolécules d'intérêt. Cela permettrait d'effectuer une première séparation entre les biomolécules. Dans ce cas, la méthode de désorption pourrait permettre un relargage spécifique des protéines adsorbées.
- D'un point de vue applicatif, la réalisation d'un système couplant à la fois la détection par SPR (détection temps réel) et l'analyse par spectrométrie de masse (analyse off line) est possible car le GO peut servir de matrice inorganique.
- Concernant les nanostructures de ZnO, une étude approfondie de la robustesse à l'empalement de structures ainsi que de leur stabilité mécanique serait nécessaire avant leur utilisation comme capot superomniphobe. De plus, la réalisation des ouvertures pourrait être améliorée par l'utilisation d'un masque physique autre que de la résine ou alors par ablation laser. Cela devrait permettre de réduire la présence de résidus dans le fond de gravure et d'effectuer une chimie de surface.

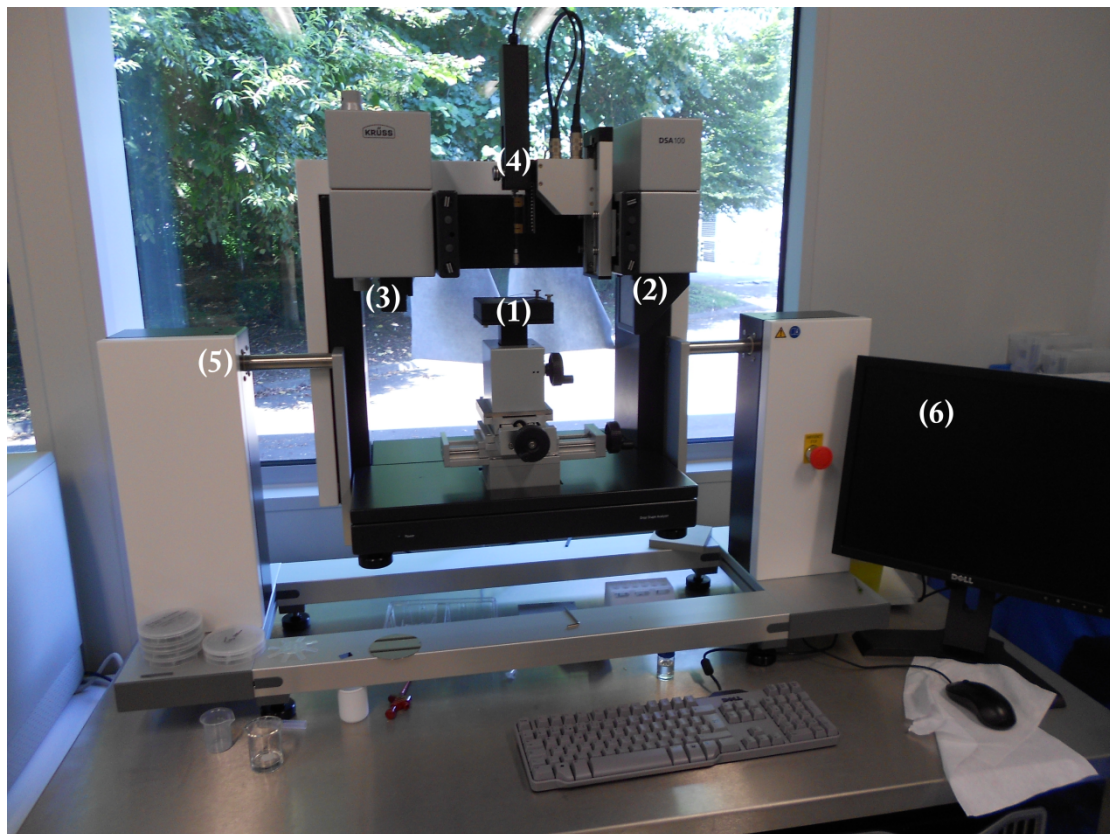
L'intégration des ces différentes stratégies avec le système d'électromouillage-sur-diélectrique avec le détecteur à résonance de plasmons de surface pourraient ensuite être effectuée. Les ouvertures réalisées dans les nanostructures ne permettent qu'un test unique dû au piégeage de la goutte dans l'ouverture. Il pourrait être intéressant de regarder à partir de quel diamètre d'ouverture un plasmon peut être obtenu tout en assurant le déplacement d'une goutte. D'un point de vue microfluidique, la gestion de l'adressage des biomolécules vers le détecteur reste à étudier : au moyen du micro-mélange induit par des effets électrohydrodynamiques, les temps de diffusion des biomolécules (cibles) vers leurs ligands sur la surface pourraient être améliorés.



# **Annexes**

## 1. Mesures des angles de contact

Les propriétés de mouillage des surfaces sont déterminées par mesure des angles de contact statique, d'avancée et de reculée. Ces mesures sont effectuées à l'aide du goniomètre Drop Shape Analysis DSA100 (Krüss GmbH, Allemagne) représenté sur la Figure 62. Le goniomètre est composé d'une table inclinable avec une source lumineuse, une caméra CCD (52images/s) et d'un système de dosage. Après dépose de la goutte, la table est inclinée de  $0^\circ$  à  $90^\circ$  par pas de  $0,3^\circ$  toutes les secondes. Les angles sont mesurés à partir des images acquises par la caméra avec le logiciel DSA3 avec 10 mesures d'angles par seconde. Afin de calculer l'angle de contact, la méthode choisie est basée sur une interpolation polynomiale de la forme de la goutte. L'angle de contact statique est mesuré juste après la déposition de la goutte sur la surface. Les angles de contact d'avancée et de reculée sont les angles mesurés juste avant le dépiégeage de la ligne triple.



**Figure 62: Photo du goniomètre Krüss. (1) support pour les surface, (2) source lumineuse, (3) caméra CCD, (4) système de dosage, (5) axe de rotation de la table et (6) ordinateur avec le logiciel DSA3**

## 2. Synthèse et caractérisation de l'oxyde de graphène

L'oxyde de graphène utilisé dans cette thèse est synthétisé à partir de la méthode de Hummers et Offman<sup>11</sup>. Il s'agit d'une exfoliation chimique et d'une oxydation de graphite. Dans le protocole utilisé<sup>12</sup>, 1g de poudre de graphite (<20µm, Sigma-Aldrich, Allemagne) est ajouté dans 23mL d'acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Qualigens, Inde) placé dans un bain glacé. Ensuite, 3g de permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>, NICE-Chemical, Inde) sont ajoutés lentement en agitant le mélange et en refroidissant afin de garder la température de réaction en-dessous de 20°C. La température est ensuite augmentée à 35°C pendant 30 min. Ensuite, 46mL d'EDI sont ajoutés lentement au mélange et la température est augmentée à 98°C. Après 15min, 140mL d'EDI sont ajoutés au mélange suivi de 10mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Le produit solide (feuilletés d'oxyde de graphène) est ensuite séparé par centrifugation. Il est rincé successivement avec une solution de HCl 5% jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'ions sulfate. Un rinçage successif avec de l'EDI est ensuite effectué afin d'éliminer les ions chlorure. Le produit est ensuite filtré et lavé 3-4 fois à l'acétone pour enlever les impuretés puis il est séché dans un four à 65°C pendant une nuit. L'oxyde de graphène (GO) est suspendu dans l'EDI et exfolié aux ultra-sons pendant 3h. Une solution homogène brun rougâtre de nanofeuilletés de GO est finalement obtenue.

La caractérisation de ces nanofeuilletés d'oxyde de graphène a été réalisée par Fellahi *et al.*<sup>13</sup> à l'aide d'analyses XPS et de mesures AFM. Les analyses XPS ont mis en évidence un ratio C/O de 1,73 et le spectre haute résolution du carbone présente trois composantes attribuées aux liaisons (C-C 285eV, C-OH ou C-O-C 287eV et C=O 288,1eV). Les mesures AFM ont montré que les nanofeuilletés ont une dimension caractéristique formant une gaussienne centrée sur 300nm et une épaisseur comprise entre 0,6 et 0,7nm.

---

<sup>11</sup>W. S. Hummers and R. E. Offeman. Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(6):1339–1339, 1958.

<sup>12</sup>M. R. Das, R. K. Sarma, R. Saikia, V. S. Kale, M. V. Shelke, and P. Sengupta. Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide sheets and its antimicrobial activity. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 83(1):16–22, 2011.

<sup>13</sup>O. Fellahi, M. R. Das, Y. Coffinier, S. Szunerits, T. Hadjersi, M. Maamache, and R. Boukherroub. Silicon nanowire arrays-induced graphene oxide reduction under UV irradiation. *Nanoscale*, 3(11):4662–4669, 2011.

### 3. Mesures de la tension de surface

Les tensions de surfaces sont mesurées, dans cette thèse, à l'aide de la méthode de la goutte pendante sur le goniomètre DSA100. A partir de la forme d'une goutte pendant au bout d'une aiguille, le logiciel DSA3 permet après acquisition de l'image de déterminer la tension de surface par un « fitting » avec la méthode d'Young-Laplace.

### 4. Réalisation des capots EWOD et des capteurs SPR

Les étapes de la réalisation des capots EWOD en Silicium sont décrites sur la Figure 63.



Figure 63:Etapes du procédé de réalisation des capots EWOD

Les capots sont réalisés sur des wafers de silicium fortement dopé (0,009-0,01 $\Omega/cm$ , Siltronic, France).

Les étapes de réalisations des capteurs SPR sont décrites sur la Figure 64.

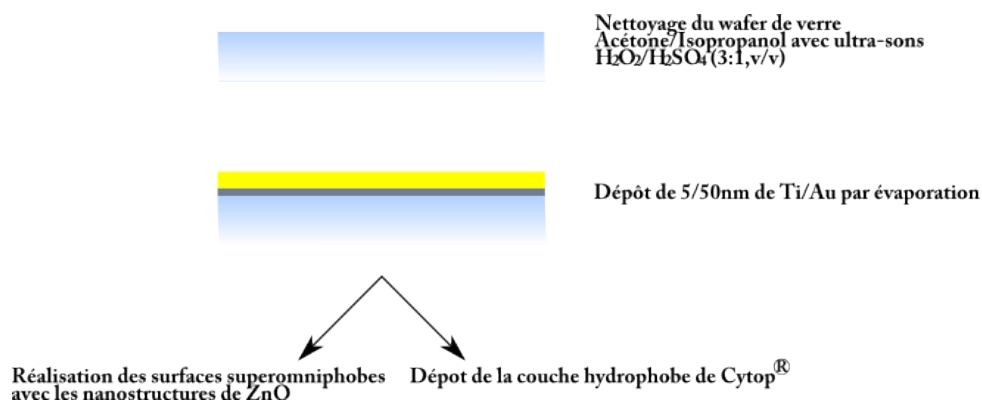
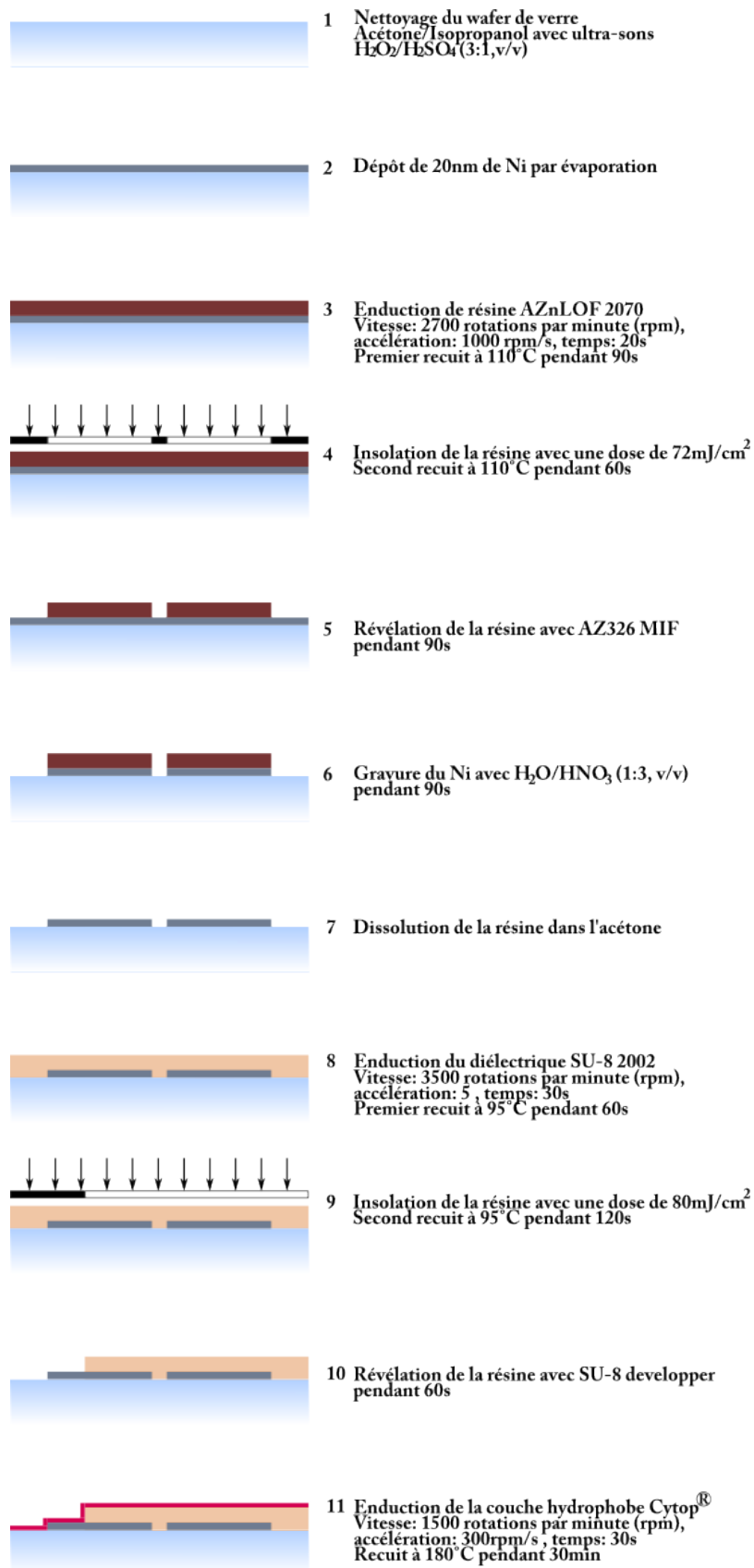


Figure 64:Etapes de du procédé de réalisation des capteurs SPR

Les capteurs SPR sont réalisés sur des lames porte-objet de microscope (Gerhard Menzel GmbH, Allemagne).

### 5. Réalisation des bases EWOD



**Figure 65: Etapes du procédé de réalisation des bases EWOD**

Les différentes étapes de réalisation des bases EWOD sont représentées sur la Figure 65. Le matériau des wafers utilisés est du borosilicate (Neyco, France). Les étapes nécessitant

l'emploi de liquide sont toujours suivies d'un rinçage à l'EDI et d'un séchage sous flux d'azote.

## 6. Spectroscopie de photoélectron X (XPS)

La spectroscopie de photoélectron X est une méthode d'analyse de surface qui permet de fournir des informations sur la nature des éléments atomiques présents sur la surface et sur les liaisons entre ces éléments. Cette méthode permet de détecter la totalité des atomes à l'exception de l'hydrogène H, avec une limite de détection d'environ 0,1% en concentration atomique. De plus, l'analyse XPS est une analyse fonctionnant en ultra-vide qui permet de venir sonder le volume sous la surface avec une profondeur comprise entre 5-10nm.

Le principe de l'XPS est montré sur la Figure 66. Les atomes de la surface, irradiés par les photons X, émettent des électrons (appelés photoélectron) par effet photoélectrique. L'analyse XPS consiste à mesurer l'énergie cinétique des photoélectrons  $E_{kin}$  durant le temps d'irradiation avec le faisceau monochromatique de rayons X.

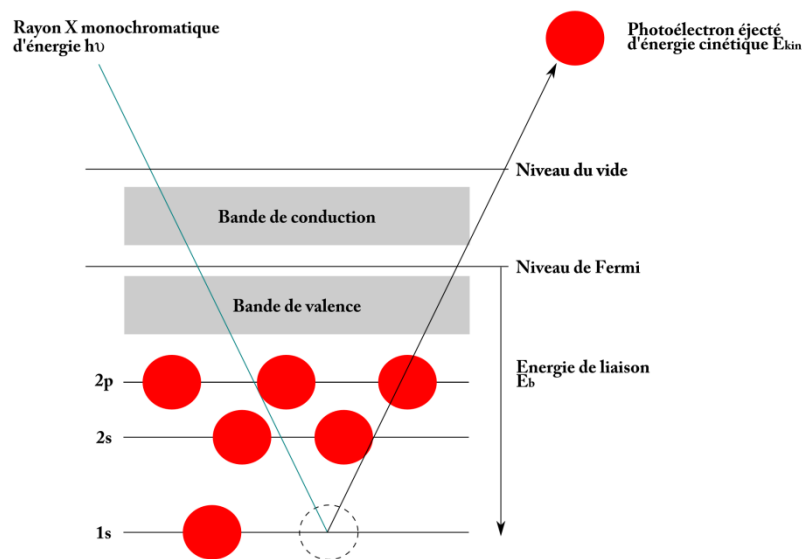


Figure 66:Schéma de principe de la spectroscopie de photoélectron X

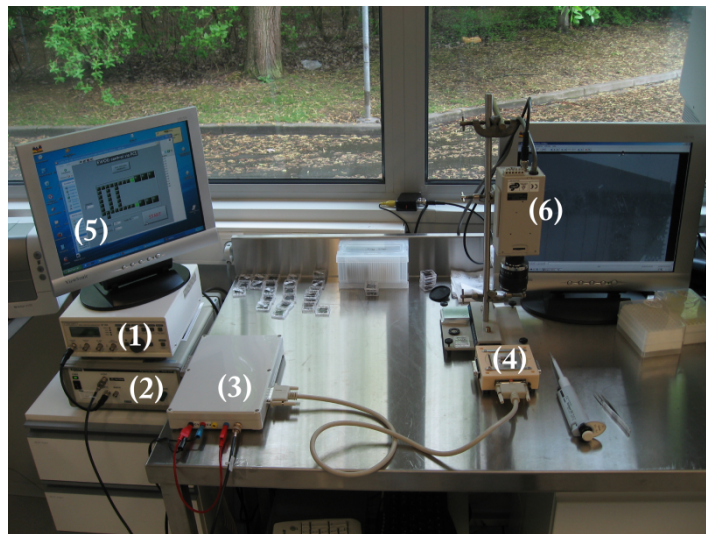
Un électron d'une couche électronique donnée est caractérisé par son énergie de liaison  $E_b$  qui est spécifique de chaque atome. L'énergie de liaison peut être directement calculée à partir de la loi de conservation de l'énergie :  $E_b = h\nu - E_{kin}$ , où  $h\nu$  est l'énergie du faisceau incident de rayon X et  $E_{kin}$  l'énergie cinétique mesurée du photoélectron.

Les analyses XPS de cette thèse sont réalisées à l'aide de l'XPS Kratos, Axis Ultra<sup>DLD</sup> de la plateforme régionale d'analyse de surface. L'énergie de la source monochromatique de rayon X (Al  $K\alpha$ ) est de 1486eV. L'angle entre la source, le point d'impact et l'analyseur est de

54,7°. Les photoélectrons sont collectés à 90° par rapport à la surface analysée. Les spectres obtenus sont ensuite traités à l'aide du logiciel CasaXPS.

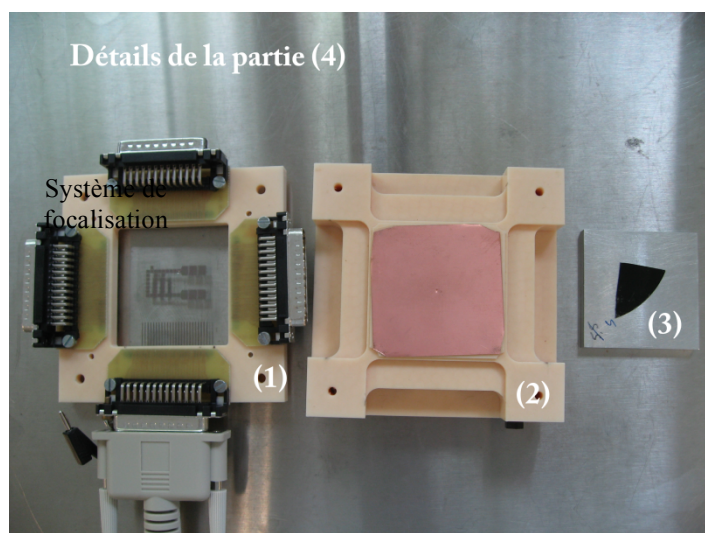
## 7. Dispositif pour le déplacement EWOD

Le dispositif instrumental pour le déplacement EWOD est représenté sur la Figure 67. L'activation des électrodes de la base EWOD est contrôlée par un programme LabView qui commande la carte relais. Lorsqu'une électrode est activée, la carte relais lui délivre le signal fourni par le générateur basse fréquence et amplifié par un amplificateur haute tension.



**Figure 67: Photo du banc permettant le déplacement de gouttes par électromouillage. (1) générateur basse fréquence, (2) amplificateur, (3) carte relais, (4) support pour la base et le capot EWOD, (5) ordinateur avec le programme Labview et (6) caméra**

La carte relais est reliée à la base et au capot EWOD *via* un câble db25. La base EWOD est placée dans un support permettant sa connexion à l'aide d'un ruban conducteur. Le capot EWOD est lui placé sur une cale métallique dont la hauteur permet de contrôler la distance base/capot et qui permet de connecter le capot à la masse. Le support est représenté sur la Figure 68.



**Figure 68: Détails du support EWOD. (1) support pour la base, (2) support pour le capot et (3) capot sur la cale métallique**

## 8. Dosage de l'activité enzymatique

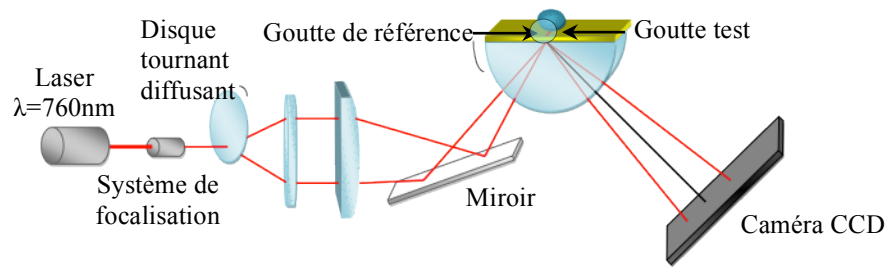
Afin de déterminer la concentration d'enzyme (HRP) active après son déplacement par EWOD en présence d'oxyde de graphène, une courbe de calibration est réalisée à l'aide d'un test colorimétrique. Le protocole expérimental est le suivant :

- Une gamme de solution de HRP de concentration différentes et connues est préalablement préparée.
- Dans une cuvette en polystyrène, une solution contenant 3,6mM de 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) et de 50 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est injectée.
- Une solution de HRP de concentration connue est ajoutée.
- La solution est ensuite mélangée et laissée incuber à l'obscurité pendant 20min.
- La cuvette est placée dans l'un des bras du spectrophotomètre UV/Visible afin d'obtenir le spectre d'absorption de la solution. (La référence du spectrophotomètre ayant préalablement été réalisée avec deux solutions sans HRP).
- Les dernières étapes sont répétées pour chaque concentration de HRP.

A partir de l'absorption à 420nm de ces différentes solutions, la courbe de calibration est tracée. Cette courbe permet de relier l'absorption à la concentration de HRP active.

## 9. Banc pour la résonance plasmonique de surface (SPR)

Le banc utilisé pour la SPR a été développé successivement au cours des thèses de Maxime Beaugeois, Elisabeth Galopin et Nazek Maalouli. Une partie de ce banc est représentée sur la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**



**Figure 70:Schéma optique du banc SPR**

Le banc est composé :

- d'un laser à colorant polarisé en TM (CR-690, Coherent Inc., Etats-Unis)
- d'un objectif associé à un disque tournant diffusant pour obtenir une tache sans speckle.
- d'une première lentille permettant d'obtenir un faisceau parallèle
- d'une seconde lentille, cylindrique, pour faire converger le faisceau incident au niveau de l'interface prisme/métal suivant une ligne ce qui permet l'observation simultanée de 2 à 4 signaux plasmoniques.
- d'un prisme hémicylindrique d'indice 1,64 tronqué et sur lequel est placé la lame métallisée. Le couplage est réalisé à l'aide d'un liquide d'indice adapté. Le faisceau incident converge au centre du système prisme+lame lequel est supporté par une platine permettant des microdéplacements en x,y,z et  $\theta$  (variation de l'incidence du prisme). Cette platine est commandée par ordinateur.
- d'une caméra CCD d'une résolution de 1280\*1024 pixels (DCU224M, Thorlabs Inc., Etats-Unis) vers laquelle est dirigé le faisceau réfléchi.

L'utilisation d'une caméra permet le suivi de plusieurs plasmons en temps réel par l'intermédiaire d'un programme LabView donnant la forme du plasmon et le décalage du minimum du plasmon au cours du temps.

---

# Publications et Communications

---

## Articles dans une revue internationale avec comité de lecture

- [1] R. Dufour<sup>14</sup>, **G. Perry**<sup>14</sup>, M. Harnois, Y. Coffinier, V. Thomy, V. Senez, and R. Boukherroub. From micro to nano reentrant structures: hysteresis on superomniphobic surfaces. *Colloid & Polymer Science*, 1–7, 2012. doi:10.1007/s00396-012-2750-7.
- [2] **G. Perry**, V. Thomy, M. R. Das, Y. Coffinier, and R. Boukherroub. Inhibiting protein biofouling using graphene oxide in droplet-based microfluidic microsystems. *Lab on a Chip*, 12:1601–1604, 2012.
- [3] **G. Perry**, Y. Coffinier, V. Thomy, and R. Boukherroub. Sliding droplets on superomniphobic zinc oxide nanostructures. *Langmuir*, 28(1):389-395, 2012.

## Communications internationales avec actes

- [1] **G. Perry**, N. Maalouli, B. Pinchemel, M. Bouazaoui, V. Thomy and R. Boukherroub. EWOD-based micromixing for fast protein sensing using SPR, Proceedings of the 2nd European Conference on Microfluidics  $\mu$ Flu'10, Toulouse, France, Decembre 8-10, 2010, paper 10-207, 1-6. Poster

## Communications sans actes

- [1] **G. Perry**, F. Lapierre, Y. Coffinier, V. Thomy, and R. Boukherroub. Superhydrophobicity and graphene oxide nano-sheets to prevent biofouling in EWOD based lab-on-chip devices, 222<sup>nd</sup> Meeting of ECS, Honolulu, Etats-Unis, Octobre 7-12, 2012; Oral
- [2] **G. Perry**, F. Lapierre, Y. Coffinier, R. Boukherroub, and V. Thomy. Superhydrophobicity and graphene oxide nano-sheets to prevent biofouling in EWOD based lab-on-chip devices, 8th International Meeting on Electrowetting, EW8, Athènes, Grèce, Juin 21-23, 2012. Oral
- [3] **G. Perry**, Y. Coffinier, V. Thomy, and R. Boukherroub. Inhibiting biofouling in EWOD device for SPR applications, 2nd Workshop on Frontiers in Biological Detection, Plasmobio 2012, Mons, Belgique, Mai 21-23, 2012. Oral
- [4] F. Lapierre, G. Piret, **G. Perry**, V. Thomy, Y. Coffinier and R. Boukherroub. Droplet based lab-on-chip microfluidic microsystems for high sensitive mass spectrometry analysis, 5th International Workshop on Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing, SMCBS'2011, Lochow, Pologne, Novembre 4-8, 2011. Oral
- [5] **G. Perry**, N. Maalouli, B. Pinchemel, M. Bouazaoui, V. Thomy and R. Boukherroub. Integrated SPR sensor to detect biomolecules EWOD device, Journées Nationales Communes du GDR Micro et Nano Fluidique et du Club Micro Capteurs Chimiques, Villeneuve d'Ascq, France, Mai 5-6, 2010. Poster

---

<sup>14</sup> Les auteurs ont contribué également à l'article et partagent la place de 1<sup>er</sup> auteur.

## Séminaire

[1] G. Perry, V. Thomy and R. Boukherroub. Realization and characterization of a digital microfluidic platform for integrated SPR microsystem, Ecole de Physique des Houches, Microfluidique: concept de base, enjeux, evolution, Les Houches, France, Janvier 11-22, 2010

## Résumé

Ces travaux de thèse ont porté sur l'étude de solutions originales pour limiter la biopollution dans des systèmes microfluidiques à base d'électromouillage (EWOD) couplés à un biocapteur à résonance de plasmons de surface (SPR). Deux approches complémentaires ont été étudiées.

Dans un premier temps nous avons mis à profit la forte adsorption de protéines sur des nanofeuillets d'oxyde de graphène (GO): les caractérisations de mouillage de solutions contenant un mélange de GO et de protéines (albumine sérique bovine - BSA) ont permis de montrer que le GO maintenait en suspension les protéines en évitant leur adsorption sur la surface. Le résultat le plus remarquable obtenu concerne le déplacement par EWOD de BSA, à une concentration de 195ng/μL (pour 500ng/μL de GO), 30 fois plus que ce qu'il est possible de transporter sans GO. Nous avons montré que la présence des feuillets de GO n'altère pas l'activité enzymatique.

Une autre solution a consisté à développer des surfaces superomniphobes (connues pour leur propriété d'auto-nettoyage) *via* un dépôt chimique de nanostructures d'oxyde de zinc (ZnO). Nous avons montré que certaines nanostructures de forme rééminente présentent des angles de contact supérieurs à 140°, des hystérésis inférieures à 20° pour des liquides de tensions de surface supérieures à 35mN/m.

Pour finir, ces deux approches ont été validées pour l'application envisagée. L'interaction entre biomolécules et biodétecteur SPR a pu être validée (i) en contrôlant la désorption des protéines du GO par une solution basique, (ii) en réalisant des ouvertures dans les nanostructures de ZnO.

Mots-Clé : Mouillage, Electromouillage, Protéomique, Résonance des plasmons de surface, Surfaces Omniphobes

## Abstract

This work reports on the study of original strategies to limit biofouling in Electrowetting-on-Dielectric (EWOD) based microfluidic devices coupled with a Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensor. Two complementary approaches have been investigated.

In the first part, we take advantage of the high adsorption capacity of graphene oxide (GO) for biomolecules: the wetting properties of a mixed solution containing Bovin Serum Albumine (BSA) and GO show that GO keeps proteins in suspension inhibiting their adsorption on the surface. The most important result concerns the EWOD motion of BSA droplet with a concentration of 195ng/μL (with 500ng/μL of GO). In this case, the BSA concentration is 30 times higher than the BSA concentration which can be displaced without GO. We show also that the presence of GO in the droplet does not alter the enzymatic activity of horseradish peroxidase (HRP) after GO/HRP displacement.

The other developed solution consists in the development of superomniphobic surfaces (known for their self-cleaning properties) *via* chemical deposition of zinc oxide (ZnO) nanostructures. The chemically functionalized ZnO nanostructures display contact angles higher than 140° and hysteresis lower than 20° for liquids of surface tensions higher than 35 mN/m.

To conclude, these two approaches have been validated for the targeted application. Interaction between biomolecules and the SPR biosensor can be realized (i) by controlling proteins' desorption from GO in base solution, (ii) by making microapertures in ZnO nanostructured surfaces.

Keywords: Wetting, Electrowetting, Proteomics, Surface Plasmons Resonance, Omniphobic Surfaces