

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGENIEUR

par **Nicolas MOLL**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : ÉLECTRONIQUE

Étude et réalisation d'un système immunocapteurs à ondes de Love : application à la détection de toxines, de virus ou de bactéries

Soutenue le : 29 juin 2007

Après avis des rapporteurs :

M.	Carles CANÉ	Professeur de Recherche, CNM (Barcelone)	Rapporteur
M ^{me}	Nicole JAFFREZIC-RENAULT	Directeur de Recherche, Université Claude Bernard-Lyon1	Rapporteur

Devant la commission d'examen composée de :

M.	Carles CANÉ	Professeur de Recherche, CNM (Barcelone)	Examinateur
M ^{me}	Corinne DÉJOURS	Maître de Conférence, Université Bordeaux 1	Examinateur
M ^{me}	Nicole JAFFREZIC-RENAULT	Directeur de Recherche, Université Claude Bernard-Lyon1	Examinateur
M.	Jacques PISTRÉ	Professeur, ENSEIRB	Examinateur
M.	Dominique REBIÈRE	Professeur, Université Bordeaux 1	Président
M.	Pierre TEMPLE-BOYER	Chargé de Recherche, LAAS CNRS	Rapporteur

*À Nadège,
Pour le plus merveilleux des cadeaux,
Notre fils, Louis*

À mes parents, ma famille

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire se sont déroulés au sein du Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système de l'Université Bordeaux 1. Je souhaite ici remercier les nombreuses personnes qui ont contribué à l'élaboration de ces travaux.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur André TOUBOUL, Professeur à l'Université Bordeaux 1, pour m'avoir accueilli au sein de son Laboratoire en 2003, ainsi que Monsieur Pascal FOUILLAT, Professeur à l'ENSEIRB, depuis qu'il a pris la direction de l'IMS en 2007.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur Jacques PISTRÉ, Professeur à l'ENSEIRB, pour la confiance qu'il m'a accordée en dirigeant ces travaux de recherche, et qui a toujours veillé au bon déroulement de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement et très chaleureusement Madame Corinne DÉJOUS, Maître de Conférence à l'Université Bordeaux 1 et co-directrice de thèse, qui grâce à son énergie, sa rigueur, sa disponibilité et sa bonne humeur quotidienne a grandement contribué à la réalisation de ces travaux ainsi qu'à la rédaction de ce mémoire.

Je suis sincèrement reconnaissant à Monsieur Dominique REBIÈRE, Professeur à l'Université Bordeaux1, pour le grand honneur qu'il m'a accordé en acceptant pour la première fois la présidence d'un jury de thèse. Je tiens également à le remercier pour son soutien, son expérience et ses conseils judicieux qui ont été d'une grande aide pour l'aboutissement de ces travaux.

J'exprime ma gratitude à Madame Nicole JAFFREZIC-RENAULT, Directeur de Recherche à l'Université Claude Bernard de Lyon, pour l'attention qu'elle a porté à ce travail en acceptant d'en être rapporteur.

Que Monsieur Carles CANÉ, Professeur de Recherche au CNM à Barcelone, trouve ici toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier Monsieur Pierre TEMPLE-BOYER, Chargé de Recherche au LAAS-CNRS, pour avoir examiné ces travaux et pour sa participation en tant que membre du jury.

Que Messieurs Bernard BENNETAU, Daniel MOYNET, Jean-Paul PILLOT et Luc VELLUTINI trouvent ici toute ma gratitude pour m'avoir initié aux domaines de l'immunologie et de la chimie organique. Leur connaissance et leur expérience m'ont énormément aidé pour l'aboutissement de ces travaux.

Je remercie vivement Mademoiselle Émilie PASCAL, Ingénieur de Recherche (AGUR), pour la réalisation de nombreuses expériences de détection biologique, et Monsieur Duy Hai DINH, doctorant à l'Institut des Sciences Moléculaires, pour le greffage des molécules de GPTS à la surface du capteur.

J'adresse mes remerciements à Messieurs Pierre MÉRICAM-BOURDET et Yannick MOREL de la Délégation Générale pour l'Armement, pour leur intérêt à ses travaux ainsi que pour la fourniture de matériel biologique, en particulier d'un couple bactérie *Escherichia coli* et anticorps anti *Escherichia coli* dirigé contre l'enveloppe externe.

Je remercie Monsieur Yan MAS, Ingénieur (AGUR), pour son implication dans les projets communs à ces travaux.

Un grand merci à Isabelle DUFOUR, Professeur à l'Université Bordeaux 1, qui s'est investie pour me permettre d'effectuer ces travaux grâce à l'obtention d'une bourse de thèse DGA-CNRS.

Merci à Céline ZIMMERMANN pour m'avoir fait profiter de son expérience sur les capteurs à ondes acoustiques.

Je remercie Monsieur Fabien JOSSE, Professeur à l'Université Marquette, pour son point de vue lors des discussions sur les dispositifs à ondes de Love, et particulièrement pour ses conseils sur la conception de la cellule de test, avec la volonté de promouvoir l'utilisation des ondes acoustiques de surface guidées.

Puis je tiens à remercier largement Nicolas LAVIGNE, Serge DESTOR qui par leurs compétences m'ont aidé pendant ces travaux de thèse, et plus particulièrement Jean-Luc LACHAUD qui s'est grandement investi dans la conception d'une cellule de test générique à nos applications.

Que Mesdames Véronique CONEDERA et Monique BENOIT du LAAS-CNRS trouvent ici toute ma reconnaissance pour la fabrication des lignes à retard utilisées au cours de ces travaux.

Je remercie les doctorants de l'équipe Capteurs : Pierre MAZEIN, Florence RAZAN, Frédéric LOCHON, Vincent RAIMBAULT, Grégory TORTISSIER pour la bonne ambiance générale et les nombreuses discussions (scientifiques ou non).

De nombreuses autres personnes m'ont également aidé par des discussions fructueuses, leur bonne humeur, leur gentillesse, leur patience et leurs encouragements. Je leur adresse également un grand merci.

1.3.3	Les capteurs à ondes de Love	42
1.3.3.1	Modélisation des capteurs à ondes de Love et sensibilité	43
1.3.3.2	Structure des capteurs à ondes de Love	45
1.4	Conclusion	46
2	Le dispositif à ondes de Love	47
2.1	Description du dispositif	47
2.1.1	Ligne à retard	47
2.1.2	Cellule de mesure	52
2.1.3	Caractérisation des capteurs à l'analyseur de réseaux .	53
2.1.4	Dispositifs faibles pertes	55
2.1.5	Influence de la géométrie sur la pente de phase	58
2.2	Conditionneur électronique	61
2.2.1	Principe du conditionneur	61
2.2.2	Relation entre les sensibilités en vitesse et en fréquence	62
2.2.3	Caractéristiques de l'électronique	63
2.2.3.1	L'amplificateur	63
2.2.3.2	L'atténuateur	64
2.2.3.3	Le filtre	65
2.2.3.4	Le coupleur	66
2.2.4	Limitation du bruit	66
2.2.5	Spécificité de l'électronique en milieu liquide	68
2.2.6	Caractérisation électrique	69
2.2.7	Le banc de mesure	71
2.3	L'apport des matériaux polymères	72
2.3.1	Couche guidante	73
2.3.1.1	Choix des matériaux	74
2.3.1.2	Réalisation des capteurs à couche guidante polymère	75
2.3.1.3	Utilisation en milieu liquide	76
2.3.2	Cellule fluïdique	80
2.3.2.1	Application	80
2.4	Conclusion	81
3	Stratégie d'Immobilisation à la Surface du Capteur	83
3.1	Introduction	83
3.2	Le biorécepteur	83
3.2.1	Les enzymes	84
3.2.2	Hybridation de l'ADN	84
3.2.3	La reconnaissance moléculaire (Les MIPs)	84

3.2.4	Affinité antigénique	85
3.3	Le couple Antigène/Anticorps	85
3.3.1	L'anticorps	85
3.3.1.1	Constitution	85
3.3.1.2	Liaison à l'antigène	86
3.3.1.3	Anticorps monoclonaux et polyclonaux	87
3.3.2	L'antigène	88
3.4	Préparation de la surface et greffage de la couche sensible d'anticorps	88
3.4.1	Protocole de test permettant de s'affranchir de la dépendance au volume de liquide	88
3.4.2	Nettoyage de la surface	89
3.4.3	Les agents de couplage	89
3.4.3.1	Le DTSP	90
3.4.3.2	La Protéine G	92
3.4.3.3	Le GPTS	95
3.5	Validation par imagerie de surface et influence de la nature de l'anticorps	98
3.5.1	Influence de la nature de l'anticorps	98
3.5.2	Validation par immunofluorescence	99
3.6	Conclusion	102
4	Application à la détection d'espèces cibles	105
4.1	Présentation des espèces cibles	105
4.1.1	Les protéines, les toxines (de petites tailles)	105
4.1.2	Les bactériophages ou virus (de moyennes tailles)	107
4.1.3	Les bactéries (de grandes tailles)	108
4.2	Optimisation de la couche sensible : Détermination de la concentration optimale d'anticorps à utiliser	109
4.3	Détection par une approche classique	110
4.3.1	Les bactériophages	111
4.3.2	Les protéines	112
4.3.3	Les bactéries	113
4.3.3.1	Essais préliminaires	114
4.3.3.2	Accessibilité des bactéries à la couche sensible et rugosité de surface	115
4.4	Détection de bactéries avec un nouveau protocole immunologique	117
4.4.1	Une nouvelle approche immunologique	117
4.4.2	Validation et reproductibilité	118
4.4.3	Spécificité	120
4.4.4	Seuil de détection	122

4.4.5	Influence de la température	123
4.4.6	Temps d'incubation et durée d'analyse	124
4.5	Conclusions et perspectives	126
Conclusion		129
A	Schéma de la nouvelle géométrie des lignes à retard	133
B	Caractéristiques des matériaux	135
B.1	Le Quartz	135
B.2	Le SiO ₂	136
B.3	Le Polyméthylméthacrylate (PMMA)	136
C	Annexe Biologique	139
C.1	Références du matériel biologique et chimique	139
C.2	ELISA, comment ça marche?	140
C.3	La titration	141
C.3.1	Les bactéries	142
C.3.2	Les bactériophages	142
D	Fabrication / Technologie	145
D.1	Le "spin-coating"	145
D.2	Les micro cellules en PDMS	147
E	Glossaire	149
	Bibliographie	157
	Liste des publications relatives à ces travaux	165

Introduction

Ces travaux ont été financés par une bourse de thèse DGA-CNRS qui a permis la collaboration avec le centre d'Etude du Bouchet pour la fourniture de bactéries et d'anticorps, et ont été réalisés dans le cadre d'un partenariat avec la société AGUR (Aquitaine Gestion Urbaine et Rurale), spécialisée dans l'affermage (eau et assainissement) ainsi que dans les prestations de service en matière de gestion de l'eau et de l'environnement. La pluridisciplinarité de ces travaux, réalisés au Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système (IMS, Université Bordeaux 1, ENSEIRB, CNRS UMR 5218), a également permis une collaboration étroite et fructueuse avec le Laboratoire des Sciences Moléculaires (ISM, Université Bordeaux 1, CNRS UMR 5255), et le Laboratoire d'Immunologie et de Parasitologie (LIP, Université Bordeaux 2 Victor Segalen EA3677).

La détection d'espèces biologiques telles que les protéines, les virus ou les bactéries est un enjeu de plus en plus important dans de nombreux domaines (environnemental, médical, militaire, sécurité alimentaire, etc. . .). Les outils de détection "classiques" sont encombrants, onéreux à l'achat, mais ont surtout un temps d'analyse souvent long de quelques heures à 2 jours.

Or les enjeux économiques et sanitaires nécessitent de réduire ces délais à quelques heures, voire quelques minutes tout en disposant d'une portabilité et d'un coût réduit des dispositifs. Les microcapteurs présentent des potentialités intéressantes pour répondre à ces exigences.

Le développement de microcapteurs au sein du Laboratoire IMS, depuis les ondes de Rayleigh étudiées par Dominique Rebière au début des années 1990 aux ondes de Love étudiées puis utilisées successivement par Céline Zimmermann, Ollivier Tamarin, Pierre Mazein et Florence Razan en passant par les dispositifs à modes de plaque transverses horizontaux développés par Corinne Déjous et Irène Esteban, confère à l'équipe capteur un savoir faire reconnu dans ce domaine.

Nous proposons dans cette étude la réalisation d'un système utilisant les biocapteurs à ondes de Love dédiés aux applications de détection rapide de toxines, de virus ou de bactéries.

Le premier chapitre présente le contexte et les enjeux des microcapteurs biologiques, suivi d'une étude bibliographique recensant les principales technologies de biocapteurs déjà utilisées dans le monde, en détaillant plus particulièrement les capteurs à ondes acoustiques. Nous présentons également les principales performances obtenues avec les diverses technologies présentées en nous focalisant plus précisément sur les immunocapteurs.

Dans le deuxième chapitre sont regroupés la présentation du capteur à ondes de Love utilisé ainsi que l'électronique faible bruit de contre réaction. L'élaboration de l'électronique de conditionnement ainsi que la description du banc de mesure y sont détaillés. Nous présentons également plusieurs méthodes susceptibles améliorer les performances du capteur, comme l'étude de la géométrie des transducteurs interdigités ou l'utilisation des matériaux polymères comme couche guidante ou comme cellule fluïdique.

Le troisième chapitre est consacré à la couche sensible bioréceptrice du capteur. Le choix s'étant porté sur l'utilisation des anticorps, la comparaison de plusieurs agents de couplage a permis de sélectionner celui qui offrait une couche la plus dense et uniforme et qui assurait une amplitude et une reproductibilité suffisante sur les réponses du capteur lors du greffage de cette couche sensible. Une validation par fluorescence a également mis en évidence une influence de la nature de l'anticorps sur la densité de greffage.

Enfin, l'application à la détection d'espèces biologiques fait l'objet du quatrième chapitre. Nous y détaillons les résultats suite à la détection de modèles des différents types d'espèces biologiques comme les protéines, les virus ou les bactéries. Une nouvelle méthode faisant intervenir un couple d'anticorps a permis de surmonter les difficultés rencontrées pour l'immobilisation des bactéries.

Chapitre 1

Étude bibliographique

1.1 Contexte de la biodétection

1.1.1 Problématique dans le domaine environnemental

La pollution biologique environnementale peut se retrouver dans différents éléments tels que l'air, l'eau ou le sol. L'eau est une des principales sources de propagation d'épidémies bactériennes ou virales. Il est donc important de contrôler la qualité de l'eau, qu'elle soit de baignade ou domestique, afin de limiter l'expansion de pollutions biologiques.

Au XIX^{ème} siècle, en Europe, plusieurs épidémies mortelles ont été transmises par l'eau (typhoïde, choléra). Les déjections animales ou les rejets des matières fécales d'origine humaine ont été les principales sources de contamination bactérienne de l'eau. Ce risque a été considérablement réduit par la mise en place de procédés de désinfection des eaux et des installations de traitement des eaux usées, mais il n'a pas disparu. L'eau reste aujourd'hui à l'origine de la mort de 3 à 10 millions de personnes dans le monde, entre autres par les contaminations bactériennes [TB].

Le contrôle de la qualité biologique de l'eau repose sur la recherche d'indicateurs de contamination fécale, qui est la contamination bactérienne la plus répandue. Elle peut être aisément suivie par la présence d'une bactérie témoin : la présence d'*Escherichia. coli* (*E. coli*) dans l'eau révèle une contamination fécale qui peut se traduire par des diarrhées, ou des gastro-entérites plus ou moins graves, susceptibles d'engager le pronostic vital pour les personnes les plus fragiles.

Parmi les critères de qualité de l'eau distribuée, le paramètre bactériologique mérite la plus grande vigilance car il reflète le risque immédiat pour la santé du consommateur. La réglementation impose la recherche d'indicateurs de contamination fécale comme *E. coli* ou les entérocoques. Malgré

cette importance majeure pour la santé, plusieurs millions de personnes sont confrontées à des contaminations bactériologiques de façon plus ou moins régulière.

Le contrôle des légionelles, bactéries responsable de la légionellose (une infection respiratoire), dans les eaux douces et dans les circuits hydrauliques (ballons de stockage d'eau chaude, tours réfrigérantes, etc. . .) est d'un enjeu considérable également. Un système de mesure intégré aux tours aéro-réfrigérantes, par exemple, permettrait d'éviter la contamination des populations avoisinantes. De la même façon, une détection rapide des cyanobactéries pouvant apparaître dans les lacs peut se révéler d'une grande importance.

De nouvelles problématiques émergentes peuvent nécessiter l'utilisation des biocapteurs. De nos jours, plusieurs de nos écosystèmes aquatiques sont sujets à une pression toujours grandissante des activités humaines et sont susceptibles d'être contaminés par une multitude de substances toxiques. Cette contamination de nos milieux aquatiques peut avoir de sérieuses répercussions sur la santé de nos écosystèmes et des êtres qui y habitent.

L'utilisation de biocapteurs permettrait d'augmenter la vitesse d'analyse et ainsi obtenir une information pertinente sur la présence de germes pathogènes. Leur portabilité ainsi que leur miniaturisation permettraient de disposer d'un dispositif permanent de surveillance placé stratégiquement pouvant concurrencer les méthodes actuelles reposant sur une culture des bactéries.

1.1.2 Problématique dans le domaine militaire

Le bioterrorisme consiste en l'utilisation ou la menace d'utilisation de germes (virus, de bactéries, de champignons, de toxines ou de micro-organismes) dans le but de provoquer intentionnellement une maladie ou le décès d'êtres humains, d'animaux ou de plantes. Les agents biologiques sont habituellement disséminés par aérosol (inhalés ou avalés).

Il est surprenant de constater que l'utilisation d'armes biologiques n'est pas récente, au contraire elle commence dès le VI^e siècle où les Assyriens empoisonnent les puits de leurs ennemis avec de l'ergot de seigle, un champignon dont la toxine produit de violentes hallucinations (on en extrait notamment le LSD), ou bien encore quand au XV^e siècle le conquistador espagnol Pizarro aurait cherché à affaiblir les Indiens d'Amérique du Sud en leur offrant des vêtements contaminés par la variole, d'autres exemples de bioterrorisme se poursuivent à travers les siècles jusqu'à sa forme actuelle.

Avec les progrès réalisés en génétique et en biologie moléculaire, des bactéries inoffensives peuvent être rendues pathogènes par insertion de gènes de toxicité empruntés au génome de bactéries dangereuses. Il est également possible de rendre encore plus virulentes des bactéries qui étaient déjà dange-

reuses ou de les modifier afin qu'elles ne soient pas reconnues par le système immunitaire ou qu'elles soient résistantes à tous les antibiotiques.

Qu'il s'agisse d'attaque directe sur la population, ou indirecte par attaque de l'élevage et/ou de l'agriculture d'un pays la conséquence du bioterrorisme est l'affaiblissement de l'économie, voire la paralysie, de la région ou du pays concerné.

1.1.3 Problématique dans le domaine médical

Dans le domaine médical, la prévention contre la propagation des infections nosocomiales est un des enjeux majeurs en termes de détection biologique. En effet, le milieu hospitalier, accueillant par définition une vaste population, met donc en présence des individus sains, mais aussi des patients présentant des pathologies différentes, infectieuses ou non. Or chaque personne, en se déplaçant dans les locaux, disperse les germes qu'elle porte sur elle sur les poignées de porte, les interrupteurs, les surfaces, dans l'air Ainsi l'environnement hospitalier regorge de germes. La flore ainsi formée évolue en fonction des capacités de résistance intrinsèques de chaque bactérie, des antiseptiques utilisés pour le nettoyage, mais aussi des antibiotiques prescrits dans l'établissement.

Dans le cadre de l'indicateur composite des activités de lutte contre les infections nosocomiales (ICALIN [Min]) mis en place par le ministère de la Santé et qui a pour mission d'inciter les établissements de santé à mesurer leurs actions et leurs résultats dans le domaine de la lutte contre les infections nosocomiales, les biocapteurs permettraient de réduire les risques en informant rapidement la présence ou non de germes pathogènes.

Les biocapteurs peuvent également être utilisés à réduire et simplifier les temps d'analyses et de recherche de bactéries ou de virus chez un patient. Ces temps d'analyses sont souvent longs (plusieurs heures) car ils reposent sur la croissance des bactéries. Ces durées d'analyses peuvent être réduits de façon considérable grâce à l'utilisation des biocapteurs et peuvent ainsi permettre une prise en charge plus rapide des soins des patients.

1.2 Qu'est-ce qu'un biocapteur ?

D'après l'encyclopédie Kirk-Othmer, un capteur est un dispositif qui transforme l'état d'une grandeur physique observée en une grandeur utilisable, exemple : une tension électrique, une hauteur de mercure, une intensité, la déviation d'une aiguille. . . . On fait souvent (à tort) la confusion entre

capteur et transducteur : le capteur est au minimum constitué d'un transducteur.

Le capteur se distingue de l'instrument de mesure par le fait qu'il ne s'agit que d'une simple interface entre un processus physique et une information manipulable. Par opposition, l'instrument de mesure est un appareil autonome se suffisant à lui-même. Il dispose donc d'un affichage ou d'un système de stockage des données ; ce qui n'est pas forcément le cas du capteur.

Les capteurs sont les éléments de base des systèmes d'acquisition de données. Leur mise en œuvre est du domaine de l'instrumentation.

Un biocapteur est un composant associant :

- une membrane qui comprend une espèce biologique permettant la reconnaissance de la molécule recherchée,
- un transducteur permettant de transformer l'événement de reconnaissance en un signal physique mesurable.

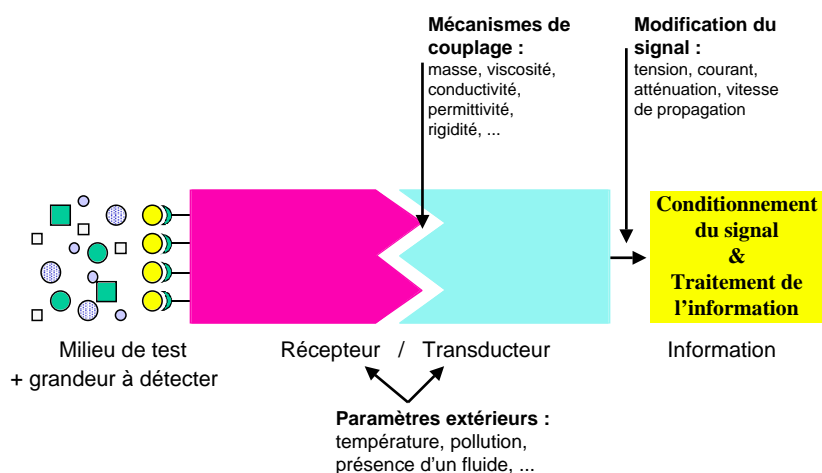


FIG. 1.1: *Principe de fonctionnement d'un biocapteur*

Une revue récente sur les biocapteurs [Gor04] est riche d'informations et bien documentée. Elle a en partie servi à la rédaction de ce chapitre, et il sera utile de s'y référer pour tout complément d'information concernant les travaux de recherche réalisés dans ce domaine.

1.2.1 Les biocapteurs électrochimiques

Le principe des capteurs électrochimiques repose sur une réaction d'oxydo-réduction, ou une modification de conductivité électrique au niveau de l'interface, qui modifie un signal électrique suite à la fixation de l'élément à

analyser. Il existe différents types de biocapteurs électrochimiques comme les capteurs ampérométriques, potentiométriques ou les ISFETs.

1.2.1.1 Ampérométrie

L'Ampérométrie est une technique qui repose sur la détermination de l'intensité de courant qui traverse une cellule électrochimique à un potentiel imposé [Tri06, Li04]. Elle est fonction de la concentration des corps électroactifs qui seront oxydés ou réduits à une électrode indicatrice, la seconde étant en général une électrode de référence. Il est donc possible, après étalonnage, de déterminer la concentration de certains corps présents, par la mesure de l'intensité.

Lorsqu'une électrode ampérométrique est utilisée comme transducteur de base d'un biocapteur, il y a en plus, consommation d'un des produits de la réaction : c'est la différence par rapport à l'électrode potentiométrique. Les équations de diffusion-réaction sont applicables si l'on considère que la concentration du produit au niveau de l'interface transducteur-couche active est nulle $[P] = 0$. Cette hypothèse correspond à la sensibilité maximale du biocapteur.

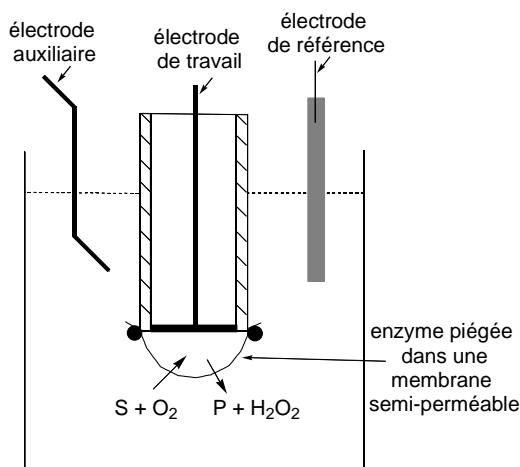


FIG. 1.2: Un capteur ampérométrique, d'après [Bad]

L'équipe de Mittelman *et al.* [Mit02] utilise des biocapteurs ampérométriques d'enzymes basés sur la détection de l'activité de la β -D-galactosidase, qui représente la présence de bactéries coliformes comme *E. coli* ou *Klebsiella pneumoniae*. Cette détection est indirecte du fait de la reconnaissance d'une enzyme spécifique à une ou plusieurs bactéries et non pas la bactérie en elle-même. Dans le cas présenté ici, il s'agit de la dégradation du substrat de *p*-

amino-phenyl- β -D-galactopyranoside, qui permet de déterminer la présence d'un signal mesurable dû à la β -D-galactosidase, représentant les deux types de bactéries cités dans des concentrations allant de 10^3 à 10^7 cfu/ml.

1.2.1.2 Potentiométrie

La potentiométrie est une méthode électrochimique basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence [Ghi96, Lak04]. La détermination des potentiels de d'électrode permet de connaître directement la concentration du corps à doser : le signal obtenu est proportionnel au logarithme de la concentration (loi de Nernst). Les différents transducteurs potentiométriques usuels sont l'électrode de verre pour la mesure du pH ou des ions monovalents, les électrodes spécifiques sensibles aux anions et aux cations et les électrodes à gaz telles que l'électrodes à $p\text{CO}_2$ ou $p\text{NH}_3$. Ces électrodes se prêtent facilement à la réalisation de biocapteurs. Il suffit pour cela de fixer, au niveau de leur élément sensible, le biorécepteur correspondant au dosage que l'on veut effectuer. Dans le cas des capteurs enzymatiques, ce sont donc un ou plusieurs enzymes qui sont immobilisées sur le transducteur.

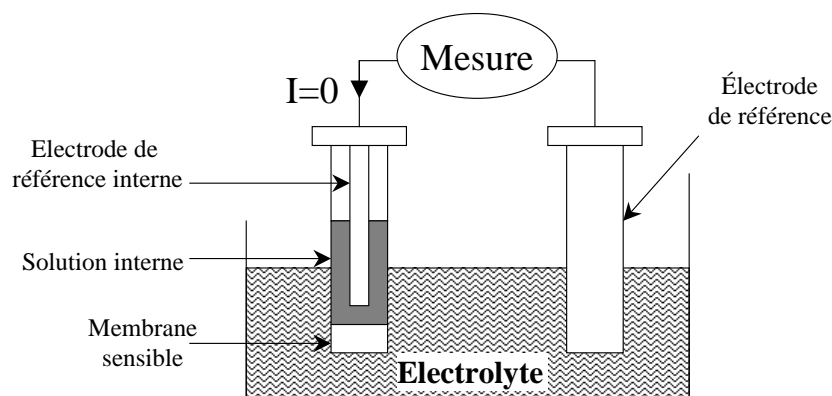


FIG. 1.3: Capteur potentiométrique, d'après [Sch95]

La mesure du potentiel se fait par l'intermédiaire d'une électrode de référence dont le potentiel est constant et pris comme origine. En général, c'est l'électrode au calomel qui est utilisée. Elle est plongée dans la solution et disposée à côté du capteur enzymatique. Lorsque l'électrode à gaz est utilisée, l'élément de référence tel que Ag/AgCl est disposé dans l'électrolyte intermédiaire, à l'intérieur de l'électrode enzymatique. Le capteur enzymatique et l'électrode de référence sont branchés à un millivoltmètre à haute

impédance d'entrée ($Z > 10^{12} \Omega$), associé à des circuits électriques permettant l'amplification du signal.

Il existe des travaux de recherche utilisant cette technologie pour des applications de détection de bactéries de manière indirecte, comme par exemple ceux de Yang *et al.* de l'Université de l'Arkansas aux États-Unis [Yan03]. Dans cet exemple, le seuil de détection est relativement faible (quelques dizaines de bactéries/ml) avec cependant un temps d'analyse d'environ 15 heures. Les performances de ces capteurs se révèlent donc plutôt faibles ce qui n'apporte que peu d'intérêt en comparaison des méthodes immunologiques classiques telles que l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) qui ont également pour inconvénient de prendre beaucoup de temps. La détection de plus fortes concentrations de bactéries permet de réduire le temps d'analyse, mais celui-ci reste cependant très élevé (6 heures pour $6.5 \cdot 10^5$ bactéries/ml) par rapport aux autres biocapteurs qui seront détaillés plus bas.

Dans un autre article, Yang *et al.* immobilisent des anticorps anti-*E. coli* sur des microélectrodes d'oxyde d'étain-indium. L'accrochage des bactéries *E. coli* sur cette surface augmente la résistance de transfert des électrons qui est mesuré à l'aide de biocapteurs potentiométriques en présence de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{(3-/4-)}$ comme sonde redox. Ils obtiennent un seuil de détection de 10^6 cfu/ml.

1.2.1.3 Impédancemétrie ou conductimétrie

Les capteurs impédancemétriques ou conductimétriques reposent sur la mesure de la conductivité d'une solution électrolytique. Mais contrairement aux capteurs ampérométriques et potentiométriques, la mesure ne peut s'effectuer qu'en courant alternatif pour éviter une électrolyse qui viendrait perturber la mesure du signal. Les capteurs impédancemétriques sont généralement composés de deux plaques métalliques parallèles de surface S séparés d'une longueur l . Dans ce cas la conductance G est donnée d'après l'équation 1.1 :

$$G = \sigma \frac{S}{l} \quad (1.1)$$

avec G la conductance en S, S la surface des plaques métalliques en m^2 , l la longueur séparant les deux plaques en m, et σ la conductivité électrique en $\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$.

Cependant, certains capteurs impédancemétriques sont réalisés avec des électrodes interdigitées, ce qui permet notamment de réduire leur encombrement.

Ce type de capteurs impédancemétriques peuvent être couplés à des ondes acoustiques (cf. paragraphe 1.2.3.2 et 1.3), comme le montre Zhao *et al.* de la République Démocratique de Chine [Zha05] qui utilisent des capteurs impédancemétrique de type BAW (Bulk Acoustic Wave) pour la détection de bactérie. Le principe de détection repose sur une modification de l'impédance dû à la croissance bactérienne sur la surface du capteur. Les seuils de détection minimum sont bas ($3 \cdot 10^2$ bactéries/ml) mais dans un temps relativement long (supérieur à 10 heures). Le temps de détection peut être réduit à quelques heures, mais au détriment du seuil de détection.

1.2.1.4 Les ISFETs pour Ion Selective Field Effect Transistor

Les capteurs ISFET [Sol02, Wu00], dont un exemple est présenté en figure 1.4, sont des FETs (Field Effect Transistor) dans lequel la grille a été supprimée et remplacée par un liquide de mesure. Un transistor FET se compose, de façon simplifiée, d'une plaque en silicium dotée de deux surfaces dopées, la source et le drain.

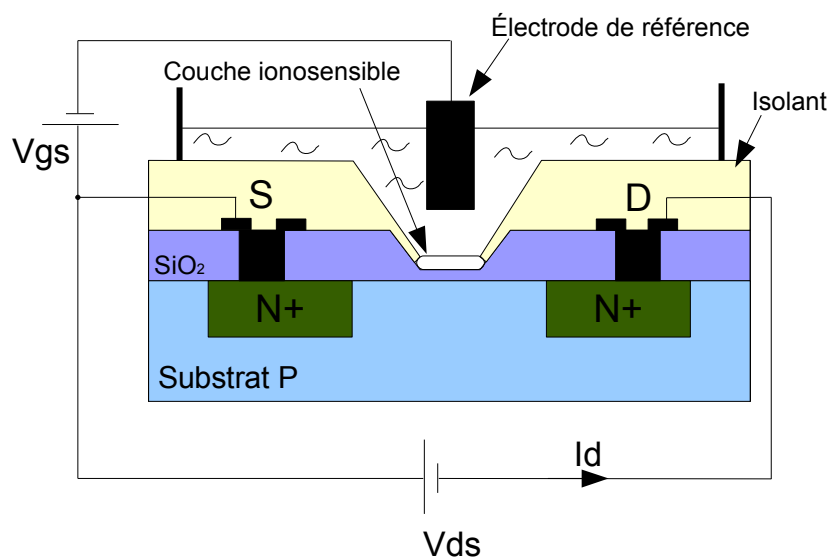


FIG. 1.4: un capteur de type ISFET d'après [Mar00]

Cette plaque est recouverte d'une couche d'oxyde de silicium non conducteur, sur laquelle se trouve la grille. Le transistor - le courant électrique généré entre la source et le drain - est plus ou moins passant sous l'influence de la charge électrique placée sur la grille. Le montage de la puce dans le capteur ISFET est tel que le liquide de mesure constitue la grille. L'isolateur de grille du transistor ISFET, appelé la couche 'ionosensible' (typiquement

Si_3N_4 , Al_2O_3 , ou Ta_2O_5), réagit spécifiquement avec les ions H^+ libres présents dans le liquide qui permettront de générer une charge sur la grille. La charge de la grille sera donc déterminée par la quantité d'ions H^+ libres et déterminera le courant qui passe par le transistor. L'ISFET est raccordé au travers du millivoltmètre à la source de référence et la mesure de la tension de grille peut être convertie en une valeur pH.

1.2.2 Les capteurs optiques

1.2.2.1 Les capteurs à fibre optique

Les capteurs à fibres optiques [Sum05, Wol04] sont issus de la rencontre de deux technologies : les fibres optiques utilisées en télécommunication et l'optoélectronique. L'une et l'autre ont connu un développement extraordinaire ces deux dernières décennies, amélioration des performances, diminution des coûts, miniaturisation. Tout cela a permis l'émergence de ces capteurs dont le champ d'application recouvre entièrement celui des capteurs traditionnels.

La définition donnée par l'AFNOR pour un capteur à fibre(s) optique(s) est : un dispositif dans lequel l'information est créée dans le chemin optique par réaction de la lumière à la grandeur à mesurer, avant d'être acheminée vers le récepteur optique par l'intermédiaire d'une ou plusieurs fibres optiques. Cette définition exclue les assemblages comportant un capteur conventionnel et un système de transmission par fibres optiques. Par contre, l'élément optique sensible à la mesure, le transducteur, peut être ou non la fibre optique. Dans le premier cas, on parlera de capteur intrinsèque, dans l'autre de capteur extrinsèque. Il existe des cas où cette définition est incomplète par exemple quand la mesure se fait à l'interface entre la fibre et le milieu externe. Les mesures peuvent être faites de manière ponctuelle ou répartie. Pour les mesures ponctuelles le phénomène détecté ou mesuré n'est disponible qu'en un seul point. Dans l'autre cas, la grandeur physique peut être décelée sur toute la longueur de fibre, cela avec une bonne précision et une haute résolution spatiale. On distingue également les capteurs actifs et les capteurs passifs. Dans le premier cas, la source de lumière est générée par une source optique. L'onde lumineuse qui se propage dans la fibre est modifiée directement ou indirectement par le phénomène physique dont on veut déterminer la mesure. Dans le second cas, la lumière est générée par le phénomène physique lui-même.

1.2.2.2 L'ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique d'analyse de surface permettant de caractériser les propriétés optiques des matériaux et/ou de l'épaisseur des couches minces.

Comme toutes les méthodes optiques, l'ellipsométrie est basée sur l'interaction entre une onde électromagnétique incidente et la matière. Le principe de base de l'ellipsométrie est la mesure de la modification de l'état de polarisation d'une onde lumineuse après réflexion sur l'échantillon à analyser. Une onde incidente, polarisée linéairement selon les composantes parallèle (p) et perpendiculaire (s), est envoyée en incidence oblique sur un échantillon. Lors d'une réflexion sur la surface de l'échantillon l'état de polarisation du faisceau incident sera modifié, par conséquent les deux composantes de l'onde subiront une variation différente d'amplitude et de phase. L'onde réfléchie est ensuite décomposée par un analyseur.

L'apparition des capteurs à ellipsométrie est très récente et repose sur la mesure de variation d'épaisseur des composés présents à la surface d'un substrat. Ces capteurs sont peu utilisés pour le moment. Cependant, l'équipe de Bae *et al.* est parvenue à obtenir des résultats intéressants pour la détection de bactéries [Bae04]. Cette étude effectue une comparaison avec la méthode de détection par SPR, qui dans leur cas est limitée par le seuil de détection qui se situe autour de 10^6 bactéries/ml. Le seuil de détection descend à 10^3 bactéries/ml en utilisant l'ellipsométrie. Cependant, peu de contrôle ont été effectué dans cette étude, ce qui ne permet pas d'assurer ou d'infirmier la présence des espèces cibles lors d'utilisation avec des échantillons dits "pollués".

1.2.2.3 La Résonance par Plasmon de Surface (SPR)

Le plasmon de surface est une onde à décroissance exponentielle de part et d'autre de l'interface séparant un métal (or, argent...) d'un milieu diélectrique sans perte, parallèlement à laquelle elle se propage.

La figure 1.5 représente le principe de fonctionnement du biocapteur SPR. Celui-ci consiste à générer une onde, de polarisation transverse magnétique (TM), qui traverse d'abord un prisme de verre d'indice de réfraction élevé (mais on pourrait aussi utiliser un réseau de diffraction) et se réfléchit sur l'interface recouverte de métal sous un angle d'incidence supérieur à l'angle critique (condition de réflexion totale). Aux alentours de l'angle de résonance, sont créées des oscillations résonantes dans le plasma constitué par les électrons libres, qui se comportent comme un gaz ionisé, de la bande de conduction du métal. La résonance des plasmons de surface fait chuter le

coefficient de réflexion du métal dû au pic d'absorption d'énergie du faisceau incident près de l'angle de résonance.

Le champ électromagnétique dans le milieu présentant un caractère d'onde évanescente, c'est-à-dire l'amplitude décroissant exponentiellement avec la distance à l'interface, va être modifié lors de la fixation de molécules sur la surface. La mesure de l'angle d'incidence permettant cette résonance va déterminer la présence des molécules fixées en surface [Boo03, Mau06, Dos05].

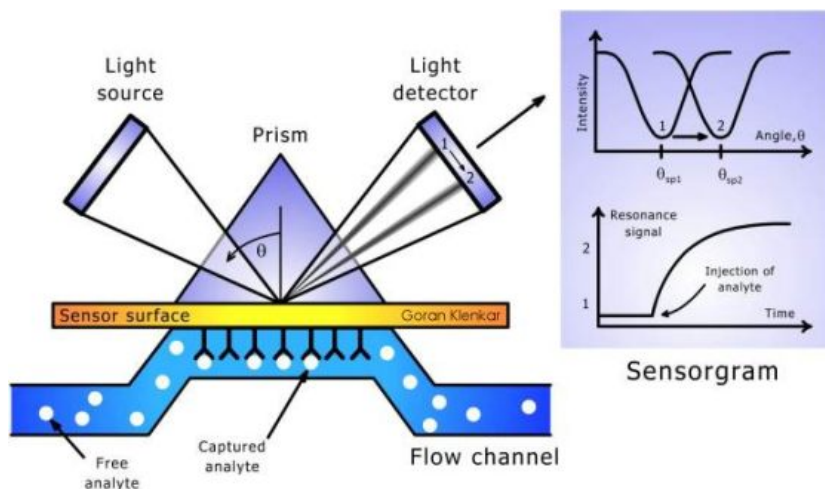


FIG. 1.5: Plasmon à résonance de surface, d'après [Lie]

Les capteurs de type SPR sont parmi les plus performants actuellement. Leur fabrication, leur mise en place ainsi que leur comportement sont bien maîtrisés. Il existe des versions commerciales de capteurs SPR tel que le Biacore[®] qui est très utilisé au cours de travaux de recherche comme ceux décrits par Jiří Homola [Hom03] ou Taylor [Tay05]. L'équipe de Taylor *et al.* a obtenu de bons résultats avec un seuil de détection qui descend à 10^6 cfu¹/ml pour une immobilisation de bactéries entières à la surface du capteur et un seuil de 10^4 cfu/ml avec des bactéries lysées ou mortes dans l'éthanol. L'équipe de Subramanian *et al.* obtient un seuil de détection identique (10^6 cfu/ml) pour une immobilisation directe des bactéries vivantes à la surface du capteur, mais réussit à descendre à 10^3 cfu/ml avec une détection de type sandwich : après immobilisation des bactéries sur le capteur un deuxième anticorps, polyclonal (cf. chapitre 3) dirigé contre la bactérie, est utilisé. Cet anticorps s'immobilise à la surface du capteur, si la bactérie cible est bien présente, et provoque une variation de la réponse du capteur. Ce système, bien que permettant de diminuer le seuil de détection du cap-

¹cfu : colony forming unit ou unité formant une colonie en français

teur, demande un temps d'analyse plus long ainsi qu'une augmentation de la quantité du matériel biologique utilisé.

L'équipe de Baac *et al.* a utilisé avec succès un biocapteur SPR pour la détection de virus [Baa06]. Il s'agit d'une détection spécifique du virus "Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus" (AcMNPV) à un seuil de détection limite de 10^7 pfu²/ml. L'anticorps anti-AcMNPV est immobilisé à la surface par l'intermédiaire du Dithiobis[sulfosuccinimidyl]propionate] (DTSSP) qui crée des liaisons covalentes avec la surface d'or.

Les capteurs SPR sont utilisés pour des détections d'éléments biologiques plus petits tels que les protéines. Par exemple, Hu *et al.* les ont notamment utilisés pour la détection de la protéine pentamère C-reactive (pCRP) [Hu06] d'un poids moléculaire de 115 kDa environ qui est une protéine humaine servant d'indicateur aux troubles cardio-vasculaires. La couche sensible d'anticorps est piégée sur capteur par de la Protéine G, qui est greffée par des liaisons covalentes sur une surface d'or fonctionnalisée avec du 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC). Cet article montre que le seuil de détection de la pCRP est de l'ordre de 1 µg/ml en quelques minutes seulement.

1.2.2.4 Fluorescence

Une molécule fluorescente (fluorophore ou fluorochrome) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Le principe du capteur par fluorescence repose sur l'association de la molécule à détecter avec une autre molécule fluorescente, appelée alors "marqueur" fluorescent. Cette technique est largement utilisée, notamment pour la visualisation de tissus biologiques à l'aide de microscopes fluorescents.

Certains biocapteurs comme les puces à ADN utilisent ce principe [Leh03, Ber06a]. La puce est une plaque de petite taille sur laquelle sont fixés des brins d'ADN, chacun correspondant au brin complémentaire d'un ARN messenger (ARNm). L'ARNm est extrait de la cellule à étudier, puis est marqué par un fluorochrome. On peut fixer et donc étudier l'expression sur cette plaque plusieurs dizaines de milliers de fragments d'ADN.

La puce est ensuite scannée au laser et une image est créée : chaque fois qu'il y a eu hybridation entre l'ADN et l'ARNm, le fluorochrome fixé sur l'ARNm a émis dans la longueur d'onde du laser.

Ce type de capteur ou puce à ADN est déjà disponible commercialement. Cependant d'autres technologies de transduction que la fluorescence sont uti-

²pfu = plaque forming unit

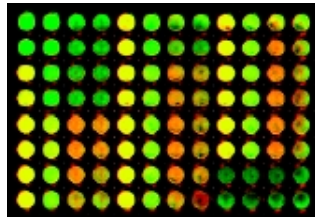


FIG. 1.6: *Exemple de résultat de fluorescence d'une puce à ADN*

lisées pour la détection de brins d'ADN tels que les capteurs électrochimiques ou les capteurs à ondes acoustiques.

1.2.3 Les capteurs électromécaniques

Aujourd'hui un grand nombre de secteurs bénéficient des technologies MEMS (Micro Electro Mechanical Systems ou bien systèmes micro électro mécaniques en Français), qui conjuguent la micro-électronique des semi-conducteurs et la technologie du micro-usinage, permettant ainsi la réalisation de systèmes entiers sur une puce. Cette technologie MEMS a connu ses premiers développements vers 1970. Le déploiement dans des applications commerciales s'est produit au début des années 90, notamment dans des applications automobiles (tels que les capteurs MEMS pour airbag, etc.) et des applications périphériques informatiques (telles que les cartouches d'imprimantes à jet d'encre) ainsi que dans des applications médicales, aérospatiales et de défense. La déclinaison des MEMS a donné de nouveaux termes, tels que, en matière optique MOEMS, signifiant systèmes opto électro mécaniques, ou en matière médicale bioMEMS. Rappelons que les MEMS, ou systèmes micro-électro-mécaniques, ou encore micro-systèmes, sont des systèmes microscopiques, qui associent des éléments mécaniques, optiques, électromagnétiques, thermiques et fluidiques à de l'électronique sur des substrats semi-conducteurs. Ils assurent des fonctions de capteurs pouvant identifier des paramètres physiques de leur environnement (pression, accélération . . .) et/ou d'actionneurs pouvant agir sur cet environnement. Cette technologie permet d'améliorer la performance des produits, d'accroître la rapidité des systèmes, de réduire la consommation d'énergie, de produire en masse, de miniaturiser et d'accroître la fiabilité et l'intégration. La spécificité de la technologie MEMS tient donc à son paradoxe : celui d'offrir de meilleures performances à de moindres coûts tout en miniaturisant. Parallèlement, les MEMS, qui fournissent des solutions performantes dans les applications quotidiennes, ont prouvé leur fiabilité inégalée de fonctionnement dans des conditions extrêmes, et des environnements dits sévères. Ces derniers peuvent être

dûs à de violents chocs thermiques, à une pression importante, un milieu très humide, en allant du corps humain à l'espace. Ces atouts font des MEMS le candidat idéal pour les solutions du futur d'un nombre infini de marchés.

1.2.3.1 Les capteurs résonants : microponts, micropoutres . . .

Les microcapteurs résonants de type microponts ou micropoutres sont très petits et sont des capteurs de force et de masse extrêmement sensibles [Liu03, Koo03]. En ajoutant à leur surface un matériau dit sensible qui va absorber ou accrocher une espèce cible déterminée, une micropoutre par exemple peut être utilisée comme un capteur chimique ou biologique possédant une très grande sensibilité et une très grande sélectivité. Quand la micropoutre entre en contact avec l'espèce cible, une modification mécanique intervient se traduisant par une courbure de la poutre ou une variation de sa fréquence de résonance. Il est possible de mesurer ces deux signaux avec une très grande précision permettant d'identifier ainsi que d'effectuer une détection quantitative de l'espèce cible.

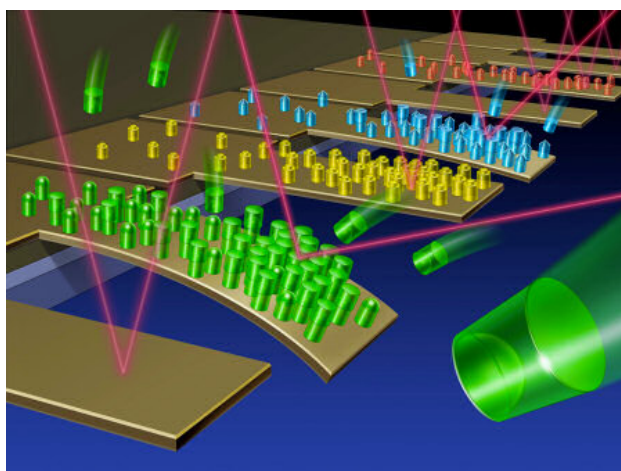


FIG. 1.7: Utilisation en déflexion avec mesure laser d'un réseau de micropoutres, d'après [Soc]

Les micropoutres ou microponts transforment une réaction chimique en mouvement mécanique à l'échelle nanométrique pouvant être directement mesuré, par exemple pour une mesure de courbure de la poutre un faisceau laser est utilisé. De ce fait il n'est pas nécessaire d'utiliser des marqueurs radioactifs ou fluorescents pour la détection de biomolécules comme l'ADN, les protéines ou les bactéries. Cela permet de réduire le nombre d'étapes nécessaires à la préparation et à la détection de biomolécules et permet également

de s'affranchir de l'influence de ces marqueurs sur les résultats. Il est possible de réaliser une batterie compacte de capteurs du fait de leur faible encombrement ainsi que de leur facilité de réalisation. Cela permet de détecter une variété de composés dans une solution chimique complexe en éliminant le temps mis à purifier la solution et séparer les étapes.

Les capteurs de types micropoutres permettent théoriquement d'obtenir des limites de détection très basses. Par exemple Campbell *et al.* [Cam06] affirme obtenir un seuil de détection de $7 \cdot 10^2$ bactéries/ml. L'immobilisation des bactéries s'effectue par l'intermédiaire du 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES) combiné avec du 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) sur une plaque de verre collée à la micropoutre en PZT. En pratique, la présence d'un milieu de test liquide affecte le coefficient de qualité, il en résulte des courbes de détection bruitées et des mesures moins précises.

Cependant, les biocapteurs de type micropoutres sont ceux qui présentent des limites de détection les plus faibles en général. La plupart de ces capteurs sont utilisés en déflexion en mesurant la courbure de la poutre, suite à l'ajout de contraintes en surface, à l'aide d'un laser. L'encombrement des appareils qui composent le banc de manipulation est un des principaux inconvénients de ce type de capteur.

1.2.3.2 Les capteurs à ondes acoustiques

Comme les capteurs de type micropoutre, les capteurs à ondes acoustiques sont des capteurs de type résonant utilisant une transduction mécanique [Ben03, Ric97]. Ils partagent avec ces derniers et les capteurs de type SPR l'avantage de ne pas être obligé de marquer les espèces cibles avec des marqueurs fluorescents par exemple pour valider ou non la présence de l'espèce cible.

Les capteurs à ondes acoustiques et plus particulièrement les capteurs à ondes de Love font l'objet de cette étude. Le paragraphe 1.3 leur est entièrement consacré.

Tout comme les capteurs de type SPR, les capteurs à ondes acoustiques font partie des biocapteurs qui offrent le plus de performances, et en particulier les capteurs à ondes de Love (cf. paragraphe 1.3.3. Cependant, certaines équipes comme celle de Chang *et al.* obtiennent des résultats intéressants avec des capteurs à ondes de volume de type QCM (Quartz Cristal Microbalance). En effet, ils ont reporté dans [Cha06] avoir détecté 10^6 bactéries/ml en 1 heure et descendent à $7 \cdot 10^1$ bactéries/ml, mais avec un temps d'analyse de plus de 15 heures.

Les capteurs à ondes de Love offrent des seuils de détection plus faibles descendant jusqu'à 10^3 spores/ml par l'équipe de Branch *et al.* ([Bra04]). Toutefois, la plupart des travaux publiés sur les ondes de Love reportent des performances comparables au capteur de type SPR. Berkenpas *et al.* affichent des seuils de détection de 10^9 en pratique et prétendent pouvoir descendre jusqu'à 10^6 bactéries/ml en théorie avec des temps d'analyse de l'ordre de l'heure [Ber06b]. Ceux-ci utilisent un système de Biotine et Neutravidine pour accrocher les anticorps en les orientant à la surface du capteur.

Shih *et al.* ont utilisé des capteurs à ondes acoustique de surface à polarisation transverse horizontale (substrat piézoélectrique de tantalate de Lithium (LiTaO_3) pour une coupe YX de 36°) afin de détecter les interactions entre des protéines et leurs anticorps [Cha07]. Pour cela, ceux-ci ont utilisé de l'hémoglobine (64,5 kDa) et de la myoglobine (17,6 kDa) en les immobilisant à la surface du capteur, puis ils ont inséré sur le capteur leurs anticorps respectifs. En immobilisant, à l'aide de fullerène³, composées de 60 carbones (C_{60}), 0,2 μg minimum d'hémoglobine (Hb) ou de myoglobine (Mb) (qui correspondrait au seuil de saturation de leur capteur), ils estiment pouvoir descendre à des limites de détection théoriques de 0,32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 0,035 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cependant leurs résultats expérimentaux ne montrent pas de détection en-dessous de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et d'environ 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement pour l'anti-Hb et l'anti-Mb.

Un système utilisant les capteurs à ondes acoustiques est également commercialisé. Le Biocapteur Nanofilm S-sens[®] K5 utilise 5 capteurs à ondes de Love simultanément sur un substrat et permettrait d'obtenir un seuil de détection de 0,8 pg/mm^2 . L'intérêt de ce système repose dans la versatilité des applications proposées. Cependant, le protocole à utiliser est très différent d'une application à une autre, et nécessite un temps de développement non négligeable. De plus, les liaisons de la couche bioréceptrice sur la surface d'or utilisé, par l'intermédiaire de thiols, est plus fragile que des liaisons covalentes surtout lorsque des solution à pH faible sont utilisées.

1.2.4 Synthèse des immunocapteurs étudiés

Le domaine des biocapteurs est en pleine expansion, ce qui donne lieu à une recrudescence de travaux dans ce domaine provenant d'équipes de recherche qui travaillent à travers le monde entier. Dans la mesure où le biocapteur associe deux éléments : le biorécepteur (anticorps, ADN, etc. . .) et le transducteur, ce qui nous offre un grand nombre de types de biocapteurs différents, nous nous limiterons dans ce paragraphe à l'étude des principaux

³Les fullerènes sont des molécules composées de carbone et pouvant prendre la forme d'une sphère, d'un ellipsoïde, d'un tube ou d'un anneau.

TAB. 1.1: Tableau récapitulatif de différents types d'immunocapteurs étudiés dans le monde

Type de capteurs utilisés	Équipe	Préparation de la surface	Espèce cible	Seuil de détection expérimental	Temps de détection	Référence
Potentiométrique	Yang <i>et al.</i> , Arkansas, USA	ND	<i>Salmonella typhimurium</i>	7,6.10 ¹ cfu/ml 9,3.10 ³ cfu/ml 6,5.10 ⁵ cfu/ml	15 heures 10 heures 6 heures	[Yan03]
	Yang <i>et al.</i> , Arkansas, USA	ND	<i>E. coli</i>	10 ⁶ cfu/ml	quelques minutes	[Yan04]
Ampérométrique	Mittelman <i>et al.</i> , Université de Tel-Aviv, Israel	ND	<i>E. coli</i> ou <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 ³ cfu/ml à 10 ⁷ cfu/ml	ND	[Mit02]
Ellipsométrique	Bae <i>et al.</i> , South Korea	Protéine G	<i>Legionella pneumophila</i>	10 ³ cfu/ml	ND	[Bae04]
Micropoutre	Campbell <i>et al.</i> , Pensilvanie, USA	APTES + EDC	<i>Streptocoque</i>	7.10 ² cfu/ml	< 1heure	[Cam06]
SPR	Hu <i>et al.</i> , Taiwan	liaisons covalentes (EDC) + Protéine G	pCRP	1 µg/ml	quelques minutes	[Hu06]
	Subramanian <i>et al.</i> , Pensilvanie, USA	liaisons covalentes	<i>E. coli</i> directe <i>E. coli</i> sandwich	10 ⁶ cfu/ml 10 ³ cfu/ml	1 heure	[Sub06]
	Taylor <i>et al.</i> , Washington, USA	ND	<i>E. coli</i> vivantes <i>E. coli</i> mortes	10 ⁶ cfu/ml 10 ⁴ cfu/ml	ND	[Tay05]
	Baac <i>et al.</i> , New York, USA et Seoul, Corée	DTSSP	AcMNPV	10 ⁷ pfu/ml	quelques minutes	[Baa06]
	Chang <i>et al.</i> , Taïwan	ND	<i>E. coli</i>	7 10 ¹ cfu/ml 10 ⁶ cfu/ml	15 heures 1 heure	[Cha06]
Ondes de Love	Branch <i>et. al.</i> , Sandia, USA	Protéine G	<i>Bacillus thuringiensis</i>	10 ³ cfu/ml	1 heure	[Bra04]
	Berkenpas <i>et. al.</i> , Maine, USA	Biotine + Neutravidine	<i>E. coli</i>	10 ⁹ cfu/ml	ND	[Ber06b]
	Shih <i>et. al.</i> , Taiwan	fullerène C60	Hémoglobine et Myoglobine	10 µg/ml 0,5 µg/ml	quelques minutes	[Cha07]

ND = données non disponibles

immunocapteurs utilisant les propriétés biologiques de l'interaction entre un anticorps et un antigène (cette propriété sera détaillée au chapitre 3) pour des détection de protéines, virus et même des bactéries.

Dans le domaine des immunocapteurs, la détection de bactéries est souvent étudiée et a donc été plus présentée que les autres espèces tels les virus ou les protéines. Nous avons regroupé dans le tableau 1.1 les principaux résultats obtenus avec divers capteurs déjà présentés précédemment. Nous avons détaillé dans les chapitres précédents les conditions ainsi que les résultats obtenus lors de ces études. Le tableau 1.1 est loin d'être exhaustif, mais représente les principaux résultats obtenus en immunodétection avec les diverses technologies décrites précédemment. Ce rapide descriptif n'est pas le reflet des diverses offres commerciales disponibles pour la biodétection (en effet les produits commerciaux sont à majorité destinés à détecter du glucose ou d'autres enzymes à l'aide de capteurs électrochimiques), mais synthétise les travaux de recherche par domaine.

Les capteurs à ondes acoustiques apparaissent parmi les capteurs offrant les meilleures performances. Ils ont été utilisés comme immunocapteur dans le cadre de ces travaux. Nous en proposons donc une étude détaillée dans le prochain paragraphe.

1.3 Les capteurs à ondes acoustiques

Les ondes élastiques se propagent dans tout milieu matériel : fluide, solide homogène ou inhomogène, isotrope ou anisotrope. Cependant, leur amplitude décroît au cours de la propagation car les liaisons entre atomes ou entre molécules ne sont pas purement élastiques. L'atténuation des ondes est d'autant plus petite que le milieu est ordonné. Ainsi, un solide amorphe ou polycristallin donne lieu à des pertes plus grandes qu'un monocristal. D'autre part, en raison de l'anisotropie des cristaux, certaines directions sont plus favorables que d'autres à la propagation d'un type d'onde.

1.3.1 Principe de fonctionnement

Le principe de génération des ondes acoustiques de surface s'appuie sur les propriétés électroacoustiques des matériaux piézoélectriques (découvert par Pierre et Jacques Curie en 1881) tels que : le quartz, le niobate de lithium (LiNbO_3), le tantalate de lithium (LiTaO_3), le monoxyde de zinc (ZnO), le nitrure d'aluminium (AlN). Ces matériaux peuvent convertir une tension électrique en vibration mécanique et vice versa.

La génération de l'onde se fait à l'aide de deux électrodes métalliques

déposées sur la surface du matériau piézoélectrique. Le champ électrique sinusoïdal appliqué à l'électrode émettrice est converti en onde élastique se propageant à la surface, cette onde sera reconverti en tension électrique par l'électrode réceptrice. L'alternance du signe de la tension électrique induit une alternance de compressions et de dilatations mécaniques sur le substrat. Une onde élastique est alors produite et ses caractéristiques de propagation dépendent de celles du dispositif complet (matériau, géométrie, ...).

Suivant la coupe cristallographique du substrat et l'orientation des électrodes métalliques, on distingue trois types de polarisations : la polarisation longitudinale dans laquelle la particule se déplace dans un mouvement colinéaire au vecteur d'onde, et les deux polarisations transverses (verticales et horizontales), dans lesquelles la particule se déplace orthogonalement au vecteur d'onde.

Suivant la polarisation des ondes générées, les dispositifs à ondes acoustiques sont classés en quatre grands groupes qui seront détaillés par la suite :

- Les dispositifs à ondes de volume (BAW, pour Bulk Acoustic Waves).
- Les dispositifs à ondes de surface (SAW pour Surface Acoustic Wave).
- Les dispositifs à ondes de plaque dans un milieu fini (entre deux surfaces parallèles).
- Les dispositifs à ondes guidées ou Guided SH-SAW (Shear Horizontal-Surface Acoustic Wave).

1.3.2 Historique ou les différents type de capteurs à ondes acoustiques

1.3.2.1 Les capteurs à ondes de volume (BAW)

Le premier type d'onde utilisé dans la réalisation de capteurs à ondes acoustiques est l'onde de volume. Cela consiste à faire vibrer une lame de quartz par application d'un potentiel alternatif sur les électrodes placées sur les deux faces de la lame comme présenté en figure 1.8.

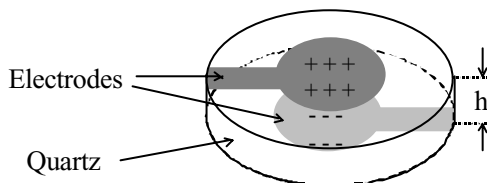


FIG. 1.8: *Un capteur à ondes de volume*

L'application d'une tension sinusoïdale à un dispositif de ce type provoque une vibration selon un mode transversal. Une résonance apparaît à une

fréquence dépendant de la nature, de la coupe cristallographique et des dimensions du matériau piézoélectrique, des paramètres associés aux éventuels matériaux adjacents (couche sensible . . .), ainsi que des paramètres extérieurs tels que la température. Ce dispositif simple a été étudié par Sauerbrey en 1959, qui a établi une équation empirique décrivant l'effet de masse sur la fréquence de résonance [Sau59] :

$$\frac{\Delta f}{f_0} = \frac{-2f_0\Delta m_s}{\sqrt{\mu_q\rho_q}} = \frac{-2\Delta m_s}{\rho_q\lambda_0} \quad (1.2)$$

où Δf est la variation de fréquence due à l'effet de masse (Hz), m_s la masse surfacique (g/m^2), Δm_s la variation de masse surfacique modélisant l'effet de masse (g/m^2), f_0 la fréquence de résonance (Hz), μ_q le module de rigidité élastique transverse du quartz, ρ_q la masse volumique du quartz, et λ_0 la longueur d'onde (m).

La vitesse de phase de l'onde de volume transverse est définie par la relation :

$$V_p = \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}} \text{ avec } \lambda_0 = \frac{V_p}{f_0}$$

La sensibilité à l'effet de masse (définie comme étant le rapport de la variation de vitesse relative à une variation de masse, cf. page 44) du dispositif à ondes de volume est directement proportionnelle à la fréquence de résonance d'après l'équation (1.2). Pour augmenter cette sensibilité, il est donc nécessaire d'augmenter la fréquence, et donc de réduire l'épaisseur du quartz. On est alors rapidement confronté à la fragilité des plaques qui deviennent trop minces. Nous pouvons également considérer l'amélioration de la sensibilité à l'effet de masse du point de vue énergétique. En effet, nous avons indiqué précédemment que l'effet de masse consiste en une perturbation des propriétés de l'onde par un ajout de masse en surface du dispositif, donc plus l'énergie de l'onde est proche de la surface dite sensible, et plus la perturbation sera importante. Or, dans le cas des dispositifs à ondes de volume, l'onde et son énergie sont réparties dans tout le volume du cristal : plus l'épaisseur du cristal est faible, plus l'énergie proche de la surface est importante, et la sensibilité en est améliorée.

Les dispositifs les plus couramment utilisés fonctionnent entre 5 et 15 MHz, et utilisent des quartz de diamètre 10 à 16 mm. Pour une fréquence de résonance de 10 MHz et une surface d'électrode de $0,22 \text{ cm}^2$ la sensibilité à l'effet de masse en phase gazeuse est d'environ 1 Hz par nanogramme [Kin64].

Les dispositifs à ondes de volume présentent des avantages intéressants en termes de robustesse, de stabilité, et de simplicité de réalisation et d'utilisation. Ils ont ainsi été appliqués dans un certain nombre de domaines. On

trouvera notamment des exemples d'applications dans l'état de l'art proposé par Ballantine *et al.* dans l'ouvrage "Acoustic wave sensors" [Bal97]. Cependant, l'inconvénient majeur des dispositifs à ondes de volume qui réside dans leur faible sensibilité due aux limites en fréquence évoquées ci-dessus, a poussé les équipes de recherche à se tourner vers d'autres type d'ondes susceptibles de donner de meilleurs résultats.

1.3.2.2 Les capteurs à ondes de surface (SAW)

Le principe des capteurs à ondes de volume décrit dans le paragraphe précédent a été directement mis à profit pour réaliser des dispositifs à ondes de surface (SAW). La différence fondamentale réside dans la manière de générer l'onde élastique dans le substrat piézoélectrique. On utilise ici la technique des transducteurs interdigités d'une ligne à retard.

Le principe d'une ligne à retard est de générer une onde élastique et de regarder à une distance L_{cc} les caractéristiques de l'onde après propagation comme présenté en figure 1.9. L'onde est produite à la surface d'un substrat piézoélectrique auquel on applique une différence de potentiel sinusoïdale par l'intermédiaire d'électrodes interdigitées (IDT pour InterDigitated Transducers). Les principales caractéristiques des IDTs sont : la distance centre à centre L_{cc} qui les sépare, la distance de répétition du motif (la longueur d'onde qui fixe la fréquence de fonctionnement) et la longueur de recouvrement des doigts W . L'alternance du signe de la tension implique une alternance de compressions et de dilatations mécaniques dans le substrat, une onde élastique est alors produite à la fréquence d'oscillation de la différence de potentiel appliquée aux électrodes. Le retard, qui donne son nom à la ligne, est le temps τ mis par l'onde pour se propager d'un transducteur à l'autre :

$$\tau = \frac{L_{cc}}{V_R}$$

avec V_R la vitesse de propagation de l'onde de Rayleigh.

L'onde générée peut se propager en surface du substrat piézoélectrique, son énergie est alors confinée sur une épaisseur équivalente à environ une longueur d'onde sous la surface. Dans la grande majorité des cas, on entend par onde de surface l'onde dite "de Rayleigh" découverte par Lord Rayleigh en 1887. Il s'agit d'une onde elliptique se propageant dans le plan sagittal (composantes longitudinale et transverse verticale) ou légèrement incliné. Wohltjen a proposé la première application concernant l'utilisation d'un dispositif à ondes de surface comme détecteur de gaz [Woh79]. L'étude théorique

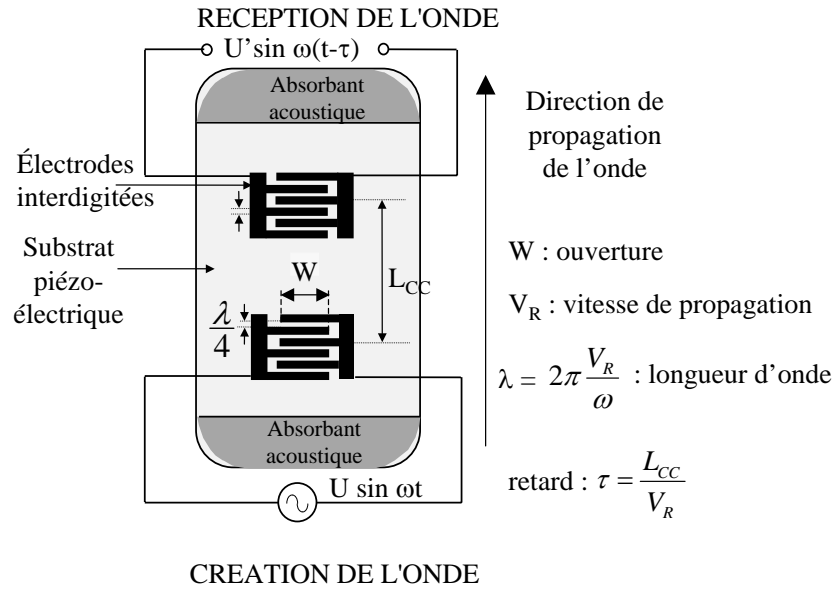


FIG. 1.9: Schéma d'une ligne à retard

de ces dispositifs s'appuie sur une expression simplifiée donnant la variation de fréquence relative à un dépôt de masse sous forme de film mince, obtenue à partir des travaux de AULD [Aul90] concernant l'analyse des perturbations induites par le dépôt du film :

$$\Delta f = (k_1 + k_2) f_0^2 h \rho - k_1 f_0^2 h \frac{4\mu}{V_R} \left[\frac{\lambda + \mu}{\lambda + 2\mu} \right] \quad (1.3)$$

avec f_0 la fréquence fondamentale (Hz), V_R : vitesse de l'onde de Rayleigh (m/s), h l'épaisseur du film (m), λ et μ les constantes de Lamé du film (N/m^2), ρ la masse volumique du film (kg/m^3), k_1 et k_2 les constantes dépendantes du matériau et de la coupe cristallographique.

Les dispositifs à ondes de surface fonctionnant à des fréquences beaucoup plus élevées que les dispositifs à ondes de volume, de l'ordre de la centaine de mégahertz, les variations de fréquence obtenues sont également plus élevées et la sensibilité est bien meilleure. D'autre part, comme nous l'avons décrit plus haut, ici l'énergie de l'onde est fortement confinée en surface et la sensibilité en est donc d'autant améliorée.

Les capteurs à ondes de surface donnent de bien meilleurs résultats que les capteurs à ondes de volume. Cependant, leur limitation vient de l'impossibilité de les utiliser pour des détections en milieu liquide. En effet, l'onde de Rayleigh est une onde de polarisation elliptique qui comporte une composante transverse verticale qui rayonne lors de la présence d'un liquide ad-

jacent ce qui provoque donc une perte du signal. Toutefois, un autre mode, utilisant le cisaillement, peut exister : mode d'onde transversale pour lequel les vibrations des particules s'exercent perpendiculairement à la direction de propagation.

1.3.2.3 Les capteurs à ondes de polarisation transverse horizontale

Nous venons de voir que les capteurs à ondes acoustiques de surface ont des performances satisfaisantes en terme de sensibilité, cependant on se heurte toujours au problème de l'utilisation en milieu liquide. Il est possible d'utiliser un type d'onde qui ne présente pas de composante verticale, c'est le cas des ondes dites transverses horizontales (TH, ou SH pour shear horizontal en anglais). En effet, la polarisation transverse horizontale se caractérise par un déplacement perpendiculaire par rapport à la direction de propagation mais dans un plan horizontal. Ce type d'onde existe dans différents types de structure :

- dans un substrat semi-infini (pour certains matériaux piézoélectriques) : ce sont les ondes de Bleustein Gulyaev (ou SSBW),
- dans une plaque mince : ce sont les ondes dites à modes de plaque transverses horizontales,
- dans une structure multicouche (substrat semi-infini, couche mince) : ce sont les ondes de Love.

Les ondes de Bleustein Gulyaev présentent une polarisation transverse horizontale et ne sont pas fortement confinées en surface du substrat, comme dans le cas des ondes de Rayleigh, mais pénètrent assez profondément limitant ainsi leur sensibilité.

C'est pourquoi un certain nombre d'équipes se sont tournées vers l'étude des dispositifs à ondes de plaques transverses horizontales ou ondes SH-APM (Shear Horizontal Acoustic Plate Mode) pour des applications en milieu liquide [And93, Déj94]. Ces ondes se propagent par réflexion sur les deux faces d'une plaque mince, constituant un système multimode. Comme dans le cas des dispositifs à ondes de volume l'énergie de l'onde est répartie dans toute l'épaisseur de la plaque mince, la sensibilité des capteurs est donc réduite par rapport aux dispositifs à ondes de surface. Pour augmenter la sensibilité, la solution consiste à nouveau à réduire l'épaisseur de la plaque de quartz, on est alors limité par les contraintes technologiques évoquées dans le cas des ondes de volume. Les études menées au laboratoire IMS sur les ondes de Rayleigh [Reb92], puis les ondes SH-APM [Déj94, Est99] nous ont alors conduit à explorer un troisième type d'onde, susceptible de cumuler les avantages d'une onde de surface (forte sensibilité) et d'une polarisation transverse horizontale

(utilisation en milieu liquide). Ce sont les ondes de Love, découvertes dans le cadre des études sur les ondes sismiques.

1.3.3 Les capteurs à ondes de Love

Tout comme les SH-APM, les ondes de Love sont des ondes guidées mais dans une plaque mince déposée sur le substrat piézoélectrique. Les transducteurs interdigités placés sur un substrat semi-infini de quartz parallèlement à l'axe cristallographique X, permettent de générer une onde purement transverse horizontale. L'onde peut être couplée dans la couche mince rigidement liée au substrat et appelée couche guidante (cf. figure 1.10). L'onde se confine dans cette couche guidante et peut être perturbée par l'ajout d'une couche sensible. On retrouve alors le fonctionnement classique des capteurs à ondes acoustiques. L'intérêt par rapport aux capteurs SH-APM réside dans le fait que l'épaisseur de la couche guidante est facilement contrôlable, l'énergie de l'onde peut à nouveau être confinée sur une petite épaisseur, d'où une sensibilité accrue.

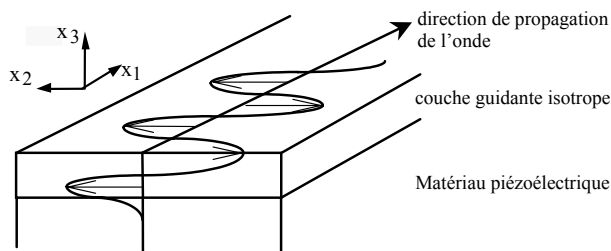


FIG. 1.10: *Polarisation d'une onde de Love*

L'onde de Love devient alors l'onde la plus intéressante car la structure associée est très robuste mécaniquement : le substrat peut être épais, son épaisseur n'étant pas un paramètre de la sensibilité de la structure. La couche guidant l'onde sert également de protection aux IDTs contre l'abrasion et la corrosion. La nature transverse horizontale de l'onde permet le fonctionnement en milieu liquide sans rayonner son énergie dans le volume du liquide.

L'étude de dispositifs à ondes de Love fait l'objet de travaux au sein de plusieurs équipes à travers le monde. Citons principalement Gizeli *et al.* [Giz03], Du *et al.* [Du98], Harding *et al.* [Har97] ou Josse *et al.* [Jos01]. Au sein du Laboratoire IMS plusieurs thèses sur la modélisation de la propagation des ondes de Love et leurs nombreuses applications à la détection de gaz [Zim02a, Maz05], d'espèces biologiques [Tam02], ou de suivi de cinétiques [Raz05] ont déjà été soutenues.

1.3.3.1 Modélisation des capteurs à ondes de Love et sensibilité

Nous nous intéressons dans cette partie à l'étude, par modélisation analytique ou numérique, des propriétés de l'onde propagée dans un capteur à ondes de Love. La figure 1.11 rappelle les différents paramètres de la structure à ondes de Love.

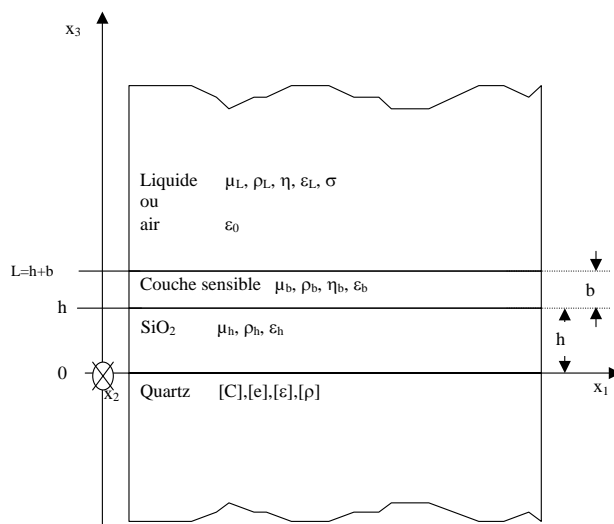


FIG. 1.11: *Schéma multicouche d'un capteur à onde de Love*

Les travaux de B.A. Auld [Aul90] offrent une base permettant d'estimer la sensibilité à l'effet de masse des dispositifs à ondes de Love. Le chapitre 10 de l'ouvrage de B.A. Auld propose une résolution de la propagation des ondes de Love et aboutit à l'équation de dispersion qui permet de calculer la vitesse de phase de l'onde dans un système substrat semi-infini non piézoélectrique, isotrope, couche guidante isotrope. Le chapitre 12 présente la théorie des perturbations qui permet de modéliser l'effet de masse. Le dépôt d'un film mince dont l'épaisseur est très inférieure à la longueur d'onde est considéré comme une perturbation au premier ordre de la propagation de l'onde de Love déjà modélisée précédemment (cf. figure 1.11).

Les travaux de thèse de Céline Zimmermann [Zim02a], menés au sein du Laboratoire IMS, ont permis de mettre au point un modèle utilisant une résolution analytique des équations de propagation pour une structure à ondes de Love composée d'un substrat piézoélectrique, d'une couche guidante ainsi que d'une couche sensible. L'approche a permis de déterminer l'équation de dispersion de la structure qui relie la vitesse de l'onde de Love aux différents paramètres des matériaux. Elle a ainsi pu obtenir des résultats théoriques concernant l'un des principaux mécanismes de détection des capteurs à ondes

acoustiques que représente l'effet de masse. La sensibilité à l'effet de masse est définie comme étant le rapport de la variation relative de vitesse à la masse surfacique due au dépôt d'une couche en surface (définition généralement utilisée) ou due à la modification d'une couche sensible (comme une variation de densité simulant le piégeage d'espèces cibles en milieu gazeux) (équations 1.4).

$$S_m^v = \frac{\Delta V}{V_0} \frac{A}{\Delta m} \quad (1.4a)$$

$$\text{soit } S_m^v = \frac{\Delta V}{V_0} \frac{1}{\rho_b b} \quad (1.4b)$$

$$\text{ou } S_m^v = \frac{\Delta V}{V_0} \frac{1}{\Delta(\rho_b b)} \quad (1.4c)$$

Avec V_0 , la vitesse de phase pour le dispositif non perturbé (sans couche sensible en 1.4b, avec une couche sensible en 1.4c), Δm la variation de masse en surface du dispositif, A la surface concernée, ρ_b la masse volumique de la couche déposée et b l'épaisseur de cette couche, ΔV la variation de vitesse conséquence de la variation de la masse surfacique $\Delta(\rho_b b)$.

Tout au long de cet ouvrage, sauf mention contraire, nous adopterons la notation 1.4c, plus appropriée dans le cas d'un capteur chimique ou biochimique, l'état de référence étant celui avec couche sensible de reconnaissance sans espèce cible immobilisée. Les résultats théoriques de sensibilité à l'effet de masse présentés seront calculés en tenant compte d'une variation de masse surfacique modélisée par une variation de densité de 5%.

Les travaux de thèse d'Ollivier Tamarin [Tam02] ont permis d'appliquer cette modélisation à l'utilisation des capteurs à ondes de Love en milieu liquide. Les caractéristiques physiques d'un liquide sont regroupées en deux catégories : les paramètres mécaniques (densité, viscosité) et les paramètres électriques (permittivité, conductivité). Il a été vérifié notamment que la variation de vitesse de phase de l'onde de Love due aux paramètres électriques reste très faible devant les paramètres mécaniques dans une structure de type quartz/SiO₂. Parmi ces paramètres mécaniques, l'influence de la viscosité s'est avérée prépondérante. La sensibilité à la viscosité $S_{\sqrt{\eta}}^v$ peut être définie par le rapport de la variation relative de vitesse à la variation de viscosité η du liquide (équation 1.5) :

$$S_{\sqrt{\eta}}^v = \left| \frac{\Delta V}{V_0} \frac{1}{\Delta\sqrt{\eta}} \right| \quad (1.5)$$

Avec V_0 , la vitesse de phase pour le dispositif non perturbé, ΔV la variation de vitesse.

Enfin, le travail de thèse de Pierre Mazein [Maz05] a conduit à l'élaboration d'un modèle très complet utilisant une résolution numérique s'appuyant sur la méthode des matrices de transfert qui permet de prendre en compte un grand nombre de paramètres et sans limitation du nombre de couches de la structure. Cette méthode quoique lourde et complexe, ne néglige pas l'effet piézoélectrique du quartz contrairement aux études menées par Céline Zimmermann et Ollivier Tamarin. Le logiciel mis au point par Pierre Mazein lors de sa thèse utilise une interface graphique simple et claire à utiliser, et sera utilisée au cours de ces travaux pour modéliser le capteur.

1.3.3.2 Structure des capteurs à ondes de Love

Le schéma de la figure 1.12 représente une vue de trois quart d'un capteur à ondes de Love. Comme nous l'avons décrit précédemment, celui-ci est composé d'un substrat piézoélectrique (le quartz dans notre cas), de transducteurs interdigités (IDT) métalliques, et d'une couche guidante (SiO_2 ici).

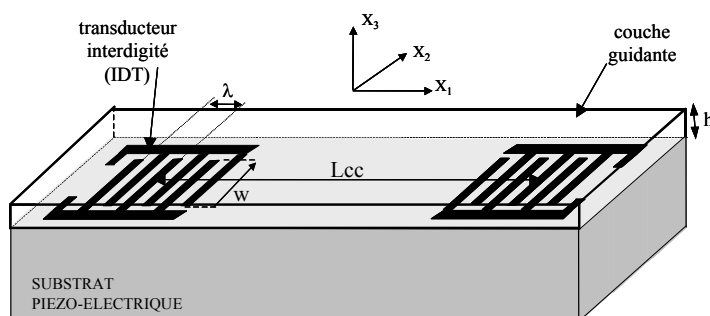


FIG. 1.12: Schéma d'un capteur à ondes de Love

Outre les propriétés mécaniques des matériaux utilisés, la géométrie des IDTs doit être étudiée afin d'obtenir un capteur pourvu d'une sensibilité maximale. Comme nous l'avons vu précédemment, les paramètres importants sont la longueur d'onde λ , l'ouverture W , la distance inter transducteurs L_{cc} , mais aussi la configuration des électrodes. nous utiliserons pour cela des électrodes dites double doigts qui limitent l'effet du triple écho et ainsi améliorent la réponse fréquentielle (cf. chapitre 2).

1.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons décrit le contexte, les enjeux de la biodétection ainsi qu'une partie des multiples applications possibles. Nous avons également décrit le principe de fonctionnement d'un biocapteur et les principales technologies utilisées pour leur mise en œuvre.

Parmi ces technologies, certaines sont commercialement plus utilisées, comme les capteurs électrochimiques par exemple pour la détection de glucose ou d'oxygène. Cependant, il est nécessaire avec ce type de biocapteur de développer l'élément sensible du capteur en fonction de l'application. Cette technologie est bien adaptée à la détection d'enzymes, mais s'avère moins efficace en terme de détection d'autres types d'espèces biologiques tel les protéines, les virus ou même les bactéries.

D'autres technologies plus "polyvalentes" comme la SPR notamment sont déjà commercialisées et permettent de visualiser en temps réel la détection des espèces cibles. Durant ces travaux de thèse, nous nous sommes efforcés de mettre en œuvre un biocapteur à ondes acoustiques de Love qui, comme les capteurs de type SPR, fournit des informations, de façon très sensible, sur la détection de l'espèce cible. Cependant les capteurs à ondes acoustiques permettent de pallier en plus le principal inconvénient des capteurs de type SPR qui est une faible profondeur de pénétration de l'onde dans le liquide, de quelques dizaines de nanomètres seulement.

L'expérience acquise ces dernières années au sein de l'équipe Capteurs du Laboratoire IMS nous a amenés à utiliser des capteurs à ondes acoustiques de Love qui de par leur polarisation transverse horizontale permet un fonctionnement en milieu liquide, et de par le confinement de l'énergie en surface lui confère une grande sensibilité à l'effet de masse surfacique. Nous allons décrire par la suite les caractéristiques des capteurs utilisés pour les appliquer à la détection de diverses, et très différentes, entités biologiques telles que les protéines, les virus ou les bactéries.

Chapitre 2

Le dispositif à ondes de Love

Les premières études concernant les capteurs à ondes acoustiques, réalisées à l'IMS à la fin des années 1980, confèrent à l'équipe Microcapteurs du Laboratoire IMS une forte expérience dans ce domaine. L'étude bibliographique du chapitre 1 nous a confirmé le grand intérêt d'utiliser ce type de transducteur pour détecter des micro-organismes en milieu biologique. Nous détaillerons dans ce chapitre la réalisation des capteurs à ondes de Love utilisés lors de ces travaux, ainsi que le conditionnement électronique permettant la mise en forme d'un signal de mesure efficace. Nous continuerons avec la mise en œuvre de moyens permettant d'augmenter les performances des capteurs existants avec l'utilisation de matériaux polymères.

2.1 Description du dispositif

Le dispositif à ondes de Love a déjà été détaillé dans le chapitre 1 et lors des travaux de thèse qui se sont déroulés au sein du Laboratoire IMS, notamment dans les mémoires de Céline Zimmermann [Zim02a], et Florence Razan [Raz05]. Nous rappelons simplement qu'un capteur à ondes de Love est composé d'un substrat piézoélectrique sur lequel sont déposées des électrodes interdigitées métalliques ainsi qu'une couche permettant de guider l'onde (cf. figure 1.12). Nous décrirons dans ce paragraphe les paramètres des différents éléments qui composent la ligne à retard, ainsi que leurs caractérisations.

2.1.1 Ligne à retard

Le mécanisme de détection d'espèces cibles des capteurs à ondes acoustiques repose sur l'effet de masse. C'est-à-dire sur le fait que tout changement de masse en surface du capteur provoque une perturbation de l'onde acous-

tique et notamment un changement de sa vitesse de phase. La sensibilité de la vitesse de l'onde à l'effet de masse (S_m^v) se définit comme le rapport de la variation relative de vitesse à la masse surfacique due au dépôt de la couche, comme décrit en équation 1.4c.

Les principales caractéristiques d'une ligne à retard à ondes de Love sont les suivantes :

le substrat piézoélectrique permet de générer une onde mécanique (acoustique) à partir d'une stimulation électrique. Nous devons prendre en compte :

- le choix du substrat piézoélectrique,
- la coupe cristallographique qui doit permettre de générer une onde transverse horizontale,
- l'épaisseur pour avoir un substrat semi-infini par rapport à la longueur d'onde,

les transducteurs interdigités métalliques définissent les propriétés physiques de l'onde en fonction des caractéristiques suivantes :

- les matériaux utilisés ne doivent pas être altérés par les espèces chimiques ou biologiques à détecter et doivent garantir une bonne transduction,
- la géométrie :
 - le type de transducteurs utilisés,
 - la longueur d'onde λ ,
 - la longueur du chemin de propagation L_{cc} ,
 - le nombre de paires de doigts N qui joue sur beaucoup de paramètres,
 - l'ouverture W qui correspond à la distance de recouvrement des doigts,

la couche guidante permet de confiner l'onde acoustique à la surface du capteur et ainsi créer l'onde de Love à condition de respecter certaines conditions :

- le choix du matériau pour ses propriétés mécaniques,
- l'épaisseur pour conférer un maximum de densité d'énergie dans la couche guidante,

la couche sensible a pour rôle de piéger sélectivement les espèces cibles, pour cela elle doit satisfaire aux conditions suivantes :

- avoir une bonne affinité et une bonne sélectivité envers l'espèce cible,
- avoir une épaisseur et une rigidité contrôlées pour ne pas apporter trop de pertes mécaniques.

Tous ces paramètres sont à prendre en compte pour conférer au capteur un maximum de sensibilité à l'effet de masse. Les études théoriques menées par Céline Zimmermann ont permis de définir la plupart de ces paramètres. Mais la principale difficulté dans la réalisation de ces capteurs reste les contraintes technologiques qui ne nous permettent pas de concevoir des capteurs ayant une sensibilité maximale. Malgré cela, nous présenterons au cours de ce paragraphe les principaux résultats obtenus, ainsi que les valeurs optimales des caractéristiques du capteur (citées précédemment) compte tenu de ces contraintes technologiques. Puis dans un deuxième temps, nous présenterons des capteurs présentant des performances potentiellement supérieures aux chapitres 2.1.4 et 2.3.

Pour qu'une onde de Love puisse être générée, il faut que la vitesse de l'onde dans le substrat (V_s) soit supérieure à la vitesse de l'onde dans la couche guidante (V_h). La vitesse de phase de l'onde de Love V_p sera donc comprise entre ces deux vitesses, comme décrit dans la relation 2.1.

$$V_s \geq V_p \geq V_h \quad (2.1)$$

Les transducteurs interdigités doivent permettre une utilisation en milieu "agressif" (milieu salin par exemple) sans être attaqués. L'or est connu pour être chimiquement inerte et sera donc utilisé, nous devons cependant utiliser une couche de titane entre le quartz et l'or pour rendre effectif l'accrochage, car l'or ne peut s'accrocher directement sur le quartz. Les capteurs utilisés auront une épaisseur de 20 nm de titane et 80 nm d'or environ. Cette couche métallique est déposée par une technique classique en photolithographie microélectronique, par un procédé additif appelé "lift-off".

Afin de limiter le triple écho (triple réflexion de l'onde sur les transducteurs), nous avons adopté une structure de transducteurs "double doigts" présentée en figure 2.1. Cette structure consiste en la répétition de chaque doigt (de largeur $\lambda/8$) espacés de $\lambda/8$. La longueur d'onde utilisée sera donc déduite de cette structure ainsi que des contraintes technologiques. Toujours d'après la thèse de Céline Zimmermann, la sensibilité à l'effet de masse du capteur à ondes de Love est d'autant plus élevée que la longueur d'onde est faible. La taille minimale de réalisation d'un doigt métallique dans des conditions classiques de laboratoire est de l'ordre de 5 μm , ce qui donne une longueur d'onde fixée à $8 \times 5\mu\text{m} = 40\mu\text{m}$. La distance centre à centre des IDTs Lcc est fixée à 210λ (8.4 mm) et l'ouverture W à 39λ (1.56 mm).

Nous rappelons qu'une onde de Love est une onde de polarisation transverse horizontale (pour fonctionner en milieu liquide) guidée (pour confiner l'énergie à la surface et ainsi augmenter la sensibilité à l'effet de masse). Le

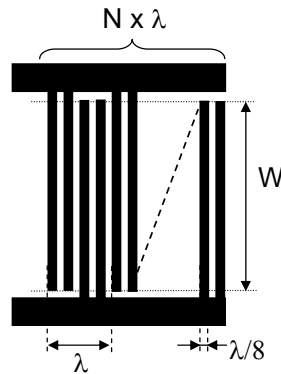


FIG. 2.1: *Transducteurs interdigités à structure double doigts*

quartz est connu pour générer une onde transverse horizontale pure [Aul90], lorsque la direction de propagation est perpendiculaire à l'axe cristallographique X, d'ordre 2. Le substrat piézoélectrique utilisé sera donc du quartz avec des angles d'Euler $(0^\circ, \theta^\circ, 90^\circ)$. Avec une couche guidante en SiO_2 les valeurs de θ comprises entre 80° et 170° permettent de satisfaire la relation 2.1 avec une vitesse de l'onde de volume TH dans le quartz supérieure à celle dans le SiO_2 . Il existe un angle θ pour lequel la sensibilité est maximum ; la figure 2.2 nous indique qu'il s'agit de l'angle 121.5° qui correspond à la coupe AT.

La couche de SiO_2 influence également largement la sensibilité à l'effet de masse du capteur à ondes de Love. De nouveau, une épaisseur optimale de l'ordre de $6 \mu\text{m}$ (figure 2.3), rend maximale la sensibilité à l'effet de masse du capteur à ondes de Love.

Ce dépôt de silice (SiO_2) sur le quartz est typiquement réalisé par PECVD (pour Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) avec une température de l'ordre de 300°C seulement, inférieure à la température de changement de phase du quartz au-delà de laquelle celui-ci n'est plus piézoélectrique. Afin de limiter la rugosité de surface nous utiliserons des capteurs avec une couche guidante d'environ $4 \mu\text{m}$ environ au lieu de $6 \mu\text{m}$. L'uniformité du dépôt de la couche en est grandement améliorée tout en conservant une sensibilité à l'effet de masse suffisamment importante.

La position du maximum de sensibilité dépend plus précisément de l'épaisseur de la couche guidante par rapport à la longueur d'onde h/λ avec une valeur optimale proche de $0,16$ [Zim02a]. De plus, les travaux de Céline Zimmermann nous indiquent que la sensibilité des ondes de Love augmente lorsque λ diminue. Aussi une amélioration du dispositif devrait être obtenue en diminuant ce paramètre, ce à double titre : par effet direct sur la sensibilité et

grâce à un guide d'onde plus fin, assurant une meilleure qualité de dépôt et notamment un meilleur état de surface.

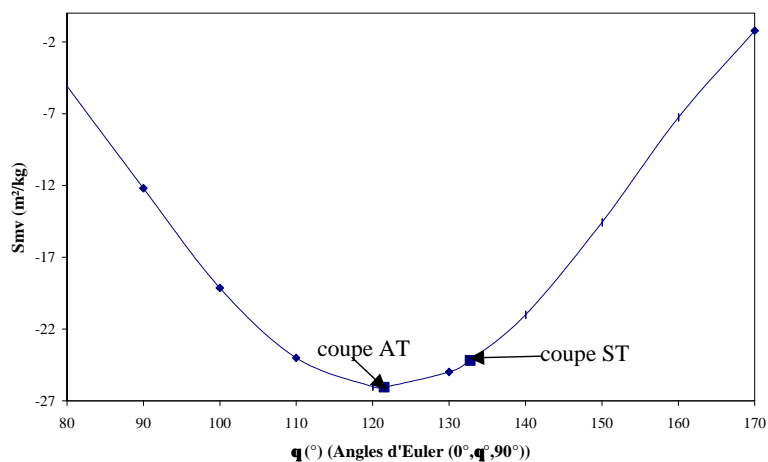


FIG. 2.2: Sensibilité à l'effet de masse en fonction de la coupe du quartz. Caractéristiques : $\lambda = 40 \mu\text{m}$, épaisseur de la couche guidante en SiO_2 $h = 6 \mu\text{m}$, couche sensible de PMMA d'épaisseur $b = 50 \text{nm}$. D'après [Zim02a].

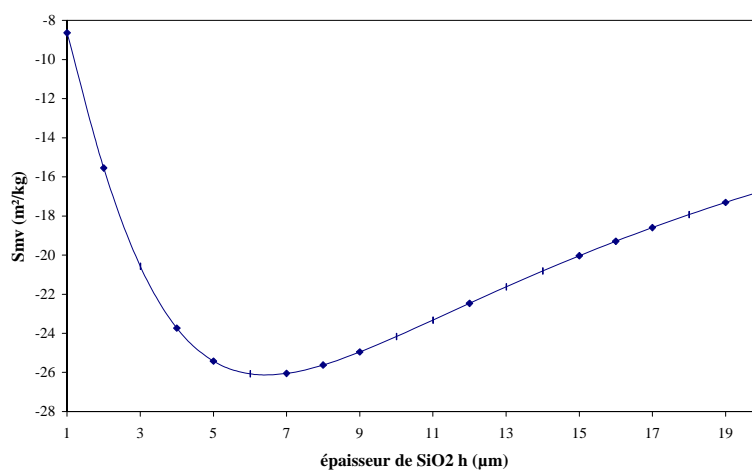


FIG. 2.3: Sensibilité à l'effet de masse en fonction de l'épaisseur de couche guidante. Caractéristiques : $\lambda = 40 \mu\text{m}$, quartz coupe AT, couche sensible de PMMA, épaisseur $b = 50 \text{nm}$. D'après [Zim02a].

Un exemple de capteur à ondes de Love ainsi réalisé est présenté en figure 2.4, avec un zoom sur une partie des IDTs en figure 2.5. Ces dispositifs

ont été réalisés en collaboration avec Véronique Conédéra et Monique Benoît de la plate-forme technologique du LAAS-CNRS (Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes UMR CNRS 8001) à Toulouse dans le cadre du réseau national des grands centres de technologie.

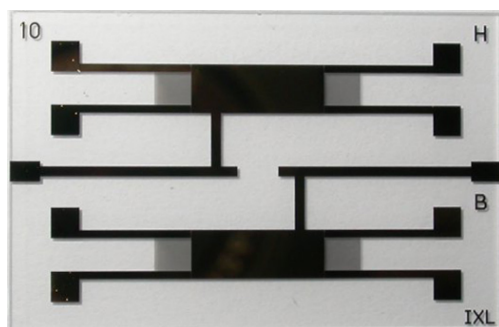


FIG. 2.4: Exemple de capteur réalisé

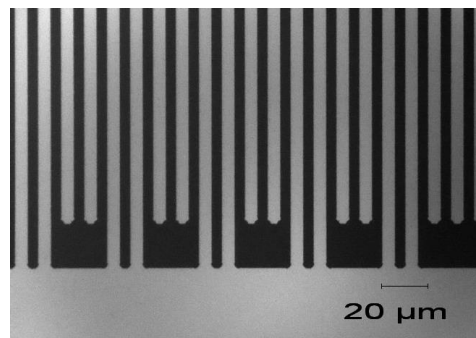


FIG. 2.5: Zoom sur les IDTs

2.1.2 Cellule de mesure

Afin de faciliter la mise en œuvre des dispositifs, une cellule de test métallique a été réalisée par le groupe Capteurs du Laboratoire IMS à partir de la structure proposée par F. Josse et R. Cernosek [San]. La figure 2.6 présente le schéma de structure de ces cellules ainsi que les réalisations.

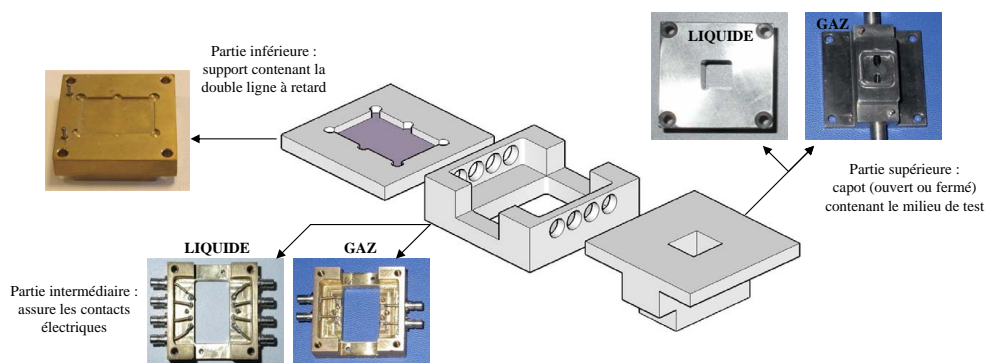


FIG. 2.6: Cellule de mesure

Les lignes à retard sont placées directement sur la partie inférieure de la cellule. L'élément intermédiaire comporte des pointes de touche à ressort venant au contact avec les plots de connexion des capteurs. Ces pointes sont

reliées à des connecteurs radio fréquences de type SMB qui ont un encombrement réduit. La partie haute est en inox avec deux ouvertures sur les côtés pour la circulation de gaz ou de liquides (volume fixé à 150 μL ou 500 μL) ou pour une application dédiée au milieu liquide avec une ouverture traversante de 1 cm^2 percée sur toute la hauteur. Un joint plat en Viton[®] permet de constituer une cavité étanche au-dessus de la double ligne à retard.

Cette cellule entièrement métallique présente plusieurs avantages :

- l'élimination du pic électromagnétique (cf. chapitre suivant) en utilisation en milieu gazeux,
- l'élimination des réflexions de bord (cf. chapitre suivant), grâce au joint en Viton[®],
- une simplicité d'utilisation,
- une robustesse accrue des connexions électriques par l'élimination de câblage des puces par "bonding".

2.1.3 Caractérisation des capteurs à l'analyseur de réseaux

Dans cette partie nous allons nous concentrer sur la caractérisation électrique des lignes à retard ainsi réalisées. Cette caractérisation permet dans un premier temps de vérifier le bon fonctionnement des capteurs, car le procédé de fabrication est complexe et peut entraîner des malfaçons. Dans un second temps, la caractérisation des lignes à retard va nous permettre de concevoir un conditionneur électronique qui permettra de récupérer une information électrique relative à la détection (ce conditionneur électrique est décrit plus loin, au chapitre 2.2).

Les lignes à retard sont électriquement caractérisées par un analyseur de réseaux ANRITSU MS4623B. Un analyseur de réseaux permet de représenter les paramètres S d'un dispositif en transmission (S_{21} et S_{12}) et en réflexion (S_{11} et S_{22}) en fonction de la fréquence. Les réponses en transmission en fonction de la fréquence en gain et en phase, typique d'une ligne à retard possédant les caractéristiques à ondes de Love citées précédemment (quartz coupe AT, $\lambda=40\mu\text{m}$, $h=3,9\mu\text{m}$), sont présentées en figure 2.7.

La réponse en gain nous montre une *fréquence de résonance* voisine de 120 MHz conforme aux attentes. En effet, les études théoriques nous donnent une vitesse de l'onde de Love (avec un capteur possédant de telles caractéristiques) de l'ordre de 4820,57 m.s^{-1} . D'après l'équation 2.2 et avec une longueur d'onde λ de 40 μm , nous obtenons une fréquence de 120,51 MHz.

$$V = \lambda f \quad \text{ou bien,} \quad \lambda = \frac{V}{f} \quad (2.2)$$

Avec, V la vitesse de l'onde, f la fréquence et λ la longueur d'onde.

Les pertes d'insertion, qui sont dues à de nombreux phénomènes tels que les pertes par transduction, les pertes par propagation ou les pertes par réflexion s'élèvent à 30 dB. Les lobes secondaires sont rejetés à des valeurs proches de -30 dB du lobe principal. Enfin, on peut noter la bonne linéarité de la phase dans toute la bande de transmission (ce qui est typique d'une ligne à retard). Le montage dans la cellule permet d'obtenir des réponses très peu bruitées, grâce au boîtier métallique relié à la masse que représente la cellule de mesure, ainsi qu'au joint d'étanchéité qui atténue l'influence des ondes parasites telles les réflexions de bord.

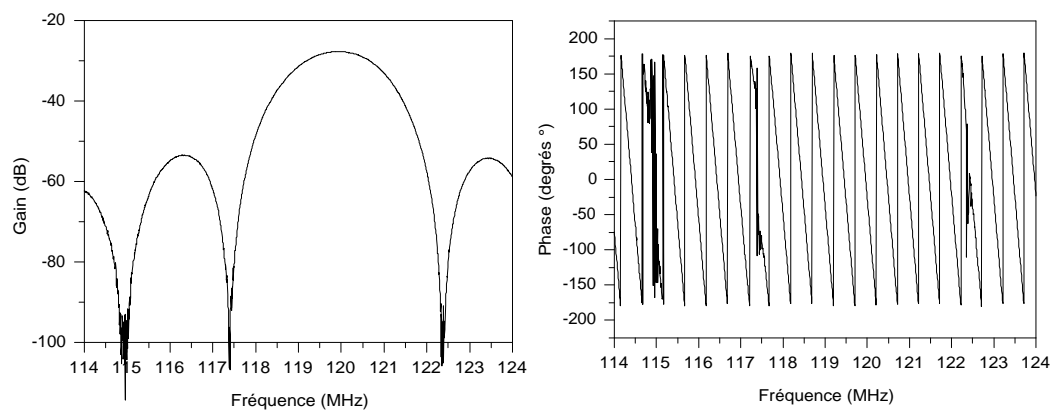


FIG. 2.7: Réponse en Gain et Phase d'une ligne à retard à ondes de Love en fonction de la fréquence

La réponse temporelle en transmission du dispositif de test est obtenue par transformée de Fourier inverse de la réponse fréquentielle à l'aide d'un algorithme de RFFT implémentée dans l'analyseur de réseau. La figure 2.8 présente la réponse temporelle de la ligne à retard de fréquence centrale 118 MHz. L'onde électromagnétique (marqueur 3) se propageant quasi-instantanément par rapport à l'onde acoustique est complètement atténuée du fait de la cellule entièrement métallique reliée à la masse. Le triangle (marqueur 1) représente l'onde acoustique. Ce signal correspond au temps mis par l'impulsion générée par le transducteur d'entrée pour atteindre le transducteur de sortie.

Un autre aspect à prendre en compte lors de la caractérisation électrique de ces dispositifs est le paramètre de réflexion en entrée ou S_{11} , et en sortie ou S_{22} . La ligne à retard étant symétrique, le S_{11} et le S_{22} sont censés être identiques. En figure 2.9 ces paramètres sont représentés sur un abaque de

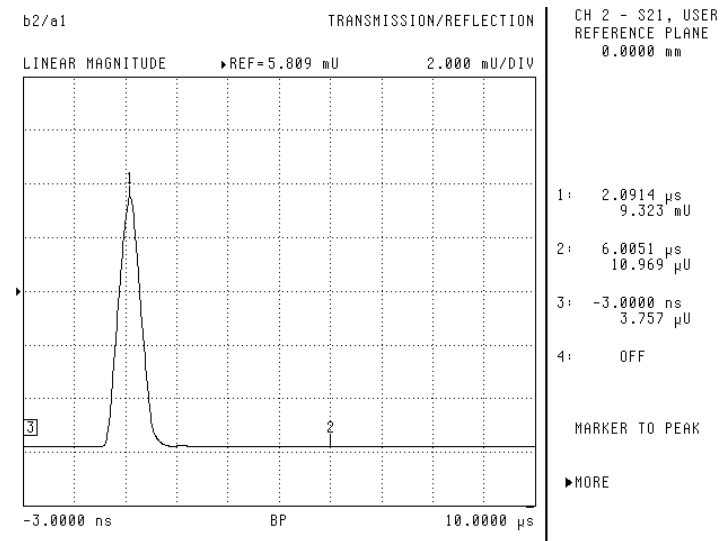


FIG. 2.8: Réponse temporelle d'un capteur à ondes de Love

Smith. On observe tout d'abord que ceux ci indiquent un dispositif de type capacitif, ce qui correspond bien au comportement de peignes interdigués. Nous pouvons également observer une boucle qui correspond à un minimum de réflexion ce qui est caractéristique d'une transmission d'onde. Cependant, cette figure nous montre une désadaptation électrique de la ligne à retard ce qui engendre des pertes supplémentaires, le S11 et le S22 sont supérieurs à -2 dB ce qui montre qu'une quantité importante d'énergie électrique est directement réfléchi et ne sera pas transformée en énergie mécanique. Ces pertes peuvent être un handicap surtout pour une utilisation en milieu liquide ou lors d'utilisation de matériaux de type polymères (cf. 2.3).

2.1.4 Dispositifs faibles pertes

Nous venons de voir les caractéristiques électriques des dispositifs à ondes de Love ainsi réalisés. Nous avons constaté les bonnes spécificités obtenues grâce à la cellule de mesure métallique notamment. Cependant il est possible d'améliorer certains aspects du capteur, et en particulier les pertes d'insertion. Nous venons de voir que la valeur du S11 est très élevée ce qui provoque une réflexion importante de l'énergie électrique. Il est possible de diminuer ce paramètre de réflexion en augmentant la valeur de la capacité des transducteurs interdigués. Pour cela, nous devons étudier les paramètres qui définissent la valeur d'une capacité. Le calcul de capacité plane simple est largement connu, et est représenté en équation 2.3.

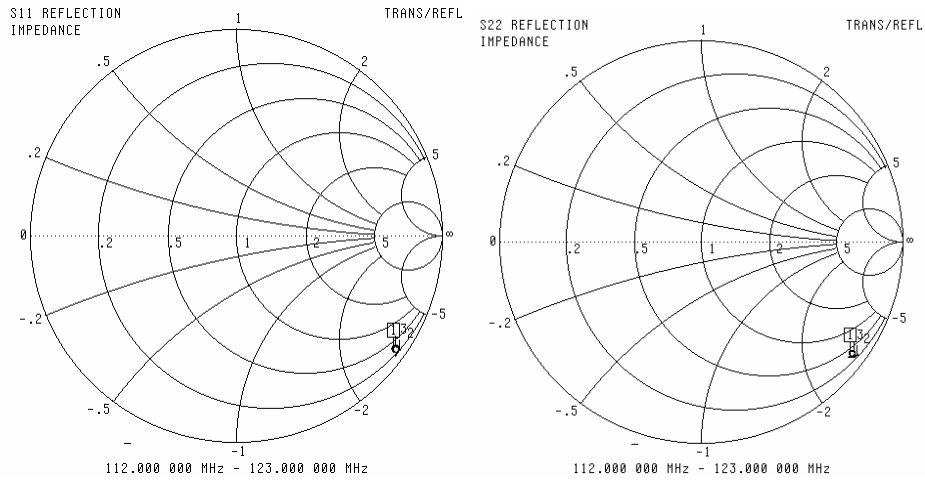


FIG. 2.9: Réponses en réflexion en entrée (S_{11}) et en sortie (S_{22}) d'une ligne à retard à ondes de Love

$$C = \varepsilon_r \varepsilon_0 \frac{S}{d} \quad (2.3)$$

Avec C la capacité en F, ε_r constante diélectrique relative en F/m, S la surface des armatures en m^2 et d la distance entre les armatures (ou épaisseur du diélectrique) en m.

Bien que seul l'espace entre chaque électrode interdigitée représente une capacité plane, la formule décrite dans l'équation 2.3 permet de définir les principales caractéristiques influent sur la valeur d'une capacité. Les paramètres influents des IDTs sont :

- la constante diélectrique qui est propre au matériau inter électrode, qui dans notre cas est le SiO_2 ,
- la distance inter électrode qui est liée à la longueur d'onde,
- la surface des armatures qui est liée à l'épaisseur de métal et à l'ouverture des IDTs : W .

La longueur d'onde (de $40 \mu\text{m}$), l'épaisseur de métallisation ($\approx 100 \text{ nm}$) et le matériau servant de couche guidante (SiO_2) sont des paramètres difficiles à modifier ou à changer pour augmenter la valeur de la capacité. Par contre il est plus facile d'augmenter la valeur de l'ouverture qui n'influe pas trop sur les propriétés de l'onde ainsi que sur la sensibilité à l'effet de masse du capteur. De plus il est important de rappeler que la capacité totale des IDTs correspond à la somme de toutes les capacités simples précédemment calculées. Pour cela, il suffit de multiplier la valeur d'une capacité simple par le nombre de paires de doigts (N). Il n'existe pas de valeur optimale pour

ces paramètres, plus W et N sont élevés, et plus la valeur de la capacité sera élevée. Pour permettre de graver 88 paires de doigts sur la même surface disponible (et dans le but d'augmenter la sensibilité) la longueur des dispositifs ayant cette géométrie sera réduite à $32\ \mu\text{m}$, ce qui a pour effet d'augmenter la fréquence de fonctionnement à 144 MHz environ pour une épaisseur de SiO_2 de $3,65\ \mu\text{m}$ environ, conformément à la relation 2.2.

Un nouveau masque de photolithographie pour la réalisation des électrodes interdigitées a été réalisé. L'ouverture W passe ainsi de $1,56\ \text{mm}$ à $3,168\ \text{mm}$ (un gain d'un rapport 2), et le nombre de paires de doigts N passe de 44 à 88 (un gain d'un rapport 2 également), soit un gain d'un rapport 4 sur la valeur de la capacité des IDTs. Les côtes précises du masque réalisé sont données en annexe A. Ce nouveau masque a tout d'abord été utilisé sur des capteurs à ondes de Rayleigh. Les pertes ont été considérablement diminuées, passant typiquement de 35 dB à 22 dB. Ces performances nous ont amenés à utiliser ce masque pour des capteurs à ondes de Love. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent les pertes typiques attribuées aux capteurs à ondes de Love utilisés jusque là au Laboratoire IMS sont de l'ordre de 30 dB. Les nouveaux dispositifs présentent des pertes typiques de l'ordre de 25 dB en utilisant les mêmes conditions de mesure, soit un gain de 5 dB qui peut s'avérer important notamment lors de l'utilisation de capteurs à couches guidantes polymères spécialement en milieu liquide (cf. chapitre 2.3).

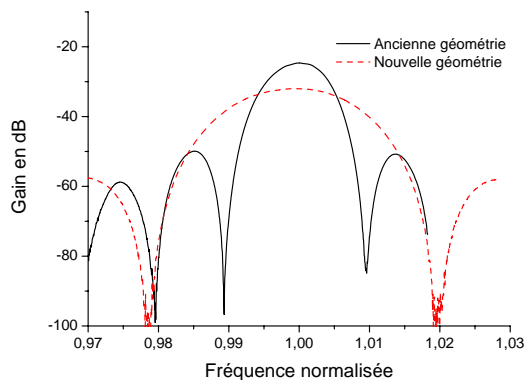


FIG. 2.10: Comparaison des gains avec le nouveau et l'ancien masques

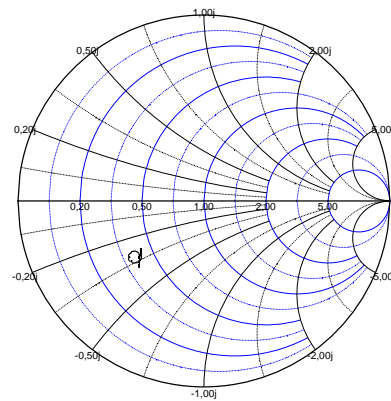


FIG. 2.11: Paramètre S_{11} pour un dispositif ayant été réalisé avec le nouveau masque

On observe sur la figure 2.10 les réponses en gain en fonction de la fréquence normalisée des capteurs réalisés avec le nouveau masque (en ligne continue noire) et avec l'ancienne géométrie (en pointillés rouge). On ob-

serve très nettement l'amélioration apportée au niveau des pertes d'insertion du capteur nu, ainsi qu'une largeur de bande passante plus étroite pour la nouvelle géométrie. On pouvait s'y attendre compte tenu de la relation 2.4 [Bal97], qui précise que la bande passante est inversement proportionnelle au nombre de paires de doigts N .

$$B = \frac{2}{N} f_0 \quad (2.4)$$

Avec f_0 la fréquence centrale de la ligne à retard en Hz, et N le nombre de paires de doigts.

De plus la nouvelle géométrie bénéficie d'un Lcc moins grand que l'ancienne géométrie qui a pour conséquence de diminuer, en valeur absolue, la pente de phase (cf. paragraphe suivant) en fonction de la fréquence comme décrit dans [Bal97].

La figure 2.11 montre également l'amélioration du S11, en comparaison avec la figure 2.9. Cependant, comme nous le verrons au chapitre 2.2.5 le fonctionnement des capteurs en milieu liquide requiert l'utilisation de "baluns", transformateurs à point milieu de rapport de transformation unitaire pour travailler en mode différentiel à l'entrée des lignes à retard. Leur comportement inductif a pour effet de faire "pivoter" sur l'abaque de Smith la réponse en réflexion, et dans cette configuration la valeur du gain s'en retrouve détériorée par rapport à la géométrie utilisée précédemment. Cette nouvelle géométrie devrait donc améliorer, pour une utilisation en milieu gazeux exclusivement. Ils ne seront donc pas utilisés dans le cadre de ces travaux.

2.1.5 Influence de la géométrie sur la pente de phase

L'étude de la pente de phase de la ligne à retard peut être très intéressante. En effet, nous verrons au chapitre suivant que le signal de mesure est la fréquence d'oscillation d'un oscillateur constitué de la ligne à retard mise en rétroaction avec une électronique amplificatrice. Le principe de la variation de la fréquence d'oscillation repose donc sur une variation de phase de la ligne à retard due au retard de l'onde lors d'un ajout de masse à la surface.

Comme nous travaillons à phase constante (la phase de l'électronique ne varie pas), toute modification de phase de la ligne à retard entraînera une variation de la fréquence d'oscillation passant ainsi de la fréquence f_0 à la fréquence f_1 , comme cela est illustré en figure 2.12.

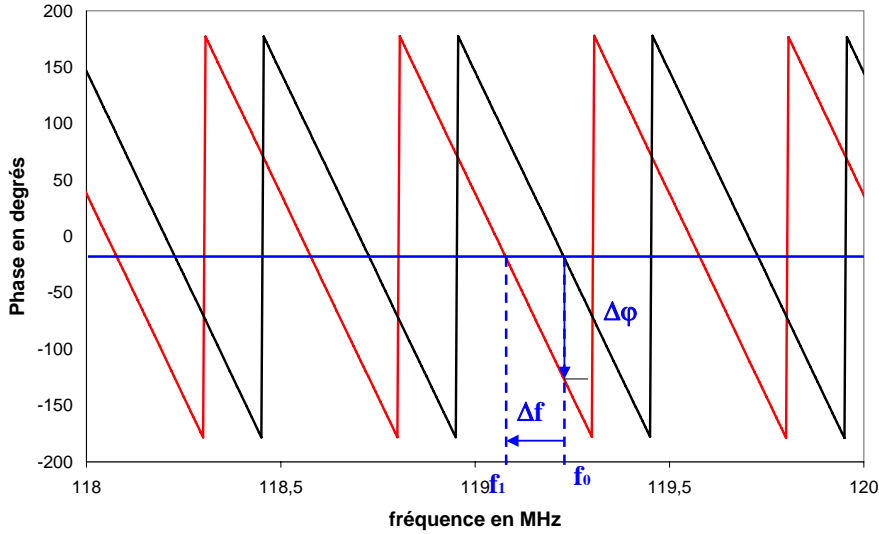


FIG. 2.12: Décalage de la réponse de phase en transmission suite à un ajout de masse sur le capteur.

Nous pouvons donc en déduire que, pour une même variation de phase à une fréquence donnée, plus la pente de phase en fréquence est faible en valeur absolue, plus la variation de fréquence sera importante. Or d'après [Bal97], la phase de la ligne à retard en fonction de la fréquence satisfait la relation 2.5.

$$\varphi(f) = kL_{cc} = \frac{2\pi f L_{cc}}{V_p} \quad (2.5)$$

Avec f la fréquence en Hz, L_{cc} la distance centre à centre des IDTs en m, et V_p la vitesse de phase de l'onde en m/s.

La dérivée de l'équation 2.5 nous indique que la pente de phase $\frac{d\varphi}{df}$ est proportionnelle au rapport $\frac{L_{cc}}{V_p}$, où V_p , la vitesse de phase de l'onde, est égale au produit de la longueur d'onde λ par la fréquence.

Nous avons comparé expérimentalement plusieurs géométries de transducteurs à notre disposition, puis mesuré la pente de phase correspondante. Les résultats sont représentés dans le tableau 2.1.

La figure 2.13 représente la pente de phase mesurée en fonction du rapport $\frac{L_{cc}}{\lambda \times f_0}$. Nous observons une bonne corrélation de proportionnalité entre le

TAB. 2.1: Étude de la pente de phase de la ligne à retard en fonction de ses caractéristiques

λ en μm	Lcc en mm	f_0 en MHz	N	W^1 en mm	Lin ² en mm	$\frac{Lcc}{\lambda \times f_0}$ $\times 10^{-6}$	Pente de Phase mesurée en $^\circ/\text{MHz}$
40	4,92	119	43	1,56	3,11	1,03	-400,59
52	6,50	87	50	2,60	4,42	1,44	-587,31
32	7,36	144	88	3,17	4,55	1,62	-635,97
40	8,32	119	43	1,56	6,51	1,75	-678,26
40	8,37	119	44	1,56	6,57	1,76	-721,16
32	6,64	98	70	3,00	5,00	2,12	-775,00

rapport $\frac{Lcc}{\lambda \times f_0}$ et la pente de phase mesurée comme le décrit la dérivée de l'équation 2.5. Les autres paramètres (N, W et Lin) n'ont pas d'influence sur la pente de phase.

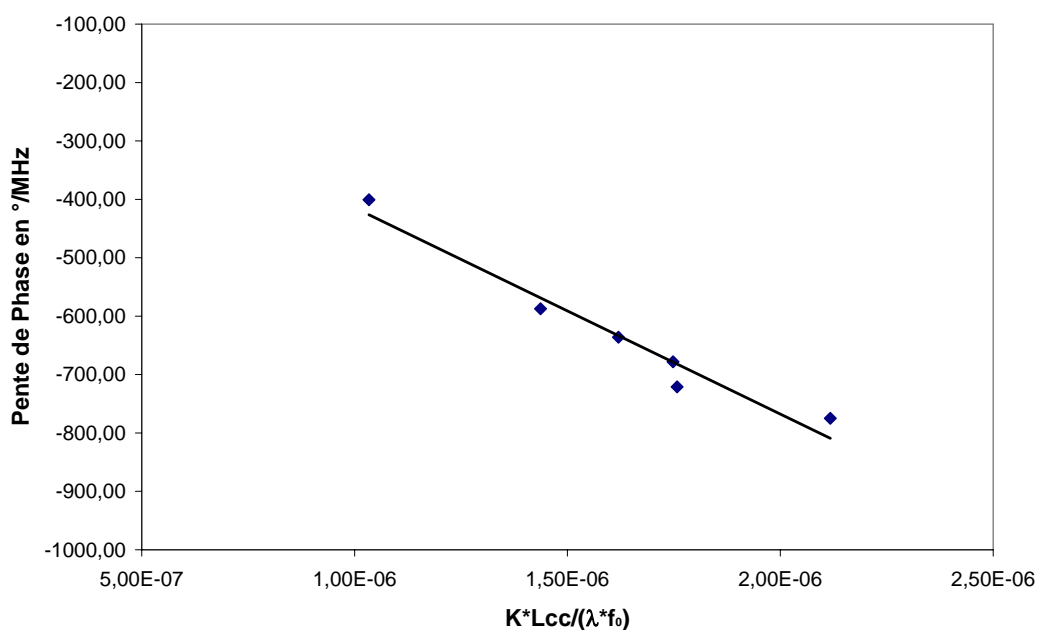


FIG. 2.13: Mesure de la pente de phase en fonction du rapport $\frac{Lcc}{\lambda f_0}$

¹W = ouverture des IDTs.

²Lin = la distance entre la fin du transducteur émetteur et le début du transducteur récepteur.

Pour obtenir une variation de la fréquence d'oscillation plus importante à une variation de phase donnée, il faut concevoir des lignes à retard avec une pente de phase faible. Pour cela, il faut soit augmenter la vitesse de l'onde (ce qui résulte en une diminution de la sensibilité en vitesse), soit diminuer la longueur L_{cc} centre à centre des IDTs.

Cependant, comme nous venons de l'évoquer et nous le détaillerons au chapitre suivant, la ligne à retard à ondes de Love est insérée dans une boucle de rétroaction avec un amplificateur de manière à constituer un oscillateur. La stabilité d'un oscillateur dépend de la dérivée de la phase en fréquence, et le fait de réduire la valeur absolue de la pente de phase peut détériorer la stabilité du signal. La réduction du chemin permet d'augmenter la variation de fréquence pour une même variation de phase, mais au détriment de la stabilité du signal de mesure. Il faut faire un compromis entre ces deux aspects de façon à optimiser la réponse du capteur.

2.2 Conditionneur électronique

2.2.1 Principe du conditionneur

Le but du conditionneur électronique est de rendre l'information sous forme de signal électrique facilement mesurable. Nous avons vu que le principe de détection des capteurs à ondes acoustiques repose sur la variation de vitesse de l'onde lors d'un ajout de masse à sa surface. Cette variation de vitesse se traduit électriquement par un retard dans le domaine temporel, et donc un décalage de la phase de la ligne à retard à fréquence fixée.

Il existe deux méthodes principales pour effectuer cette mesure de variation de phase. La première méthode consiste à transmettre un signal très stable en fréquence, à la fréquence de résonance du capteur, en entrée de la ligne à retard et de contrôler la valeur du déphasage en sortie de la ligne à retard. Cette méthode relativement simple à mettre en œuvre présente plusieurs inconvénients dont la résolution de mesure en phase (0.001° au mieux pour une phase variant de -180° à 180°), la nécessité d'utiliser des équipements de haute technicité (synthèse de fréquence ultra stable, appareil de mesure de phase très précis) ainsi que le fort encombrement des appareils.

La méthode que nous avons choisie réside en la constitution d'un oscillateur ultra stable dans lequel s'insère la ligne à retard. Le principe est de compenser les pertes d'insertion du capteur avec un amplificateur et de reboucler sur la ligne à retard de façon à auto-entretenir le signal électrique. Toute

variation de phase à l'intérieur de cette boucle va entraîner une variation de la fréquence d'oscillation du système. La phase de la partie amplificatrice est supposée constante dans le temps, une variation de fréquence traduira donc une variation de phase de la ligne à retard donc une variation de la vitesse de l'onde (c'est à dire une variation de masse à la surface du capteur). L'avantage de cette méthode réside dans son faible encombrement ainsi que dans sa très bonne résolution de mesure (1 Hz pour une fréquence d'oscillation proche de 120 MHz).

Le fonctionnement de l'oscillateur repose plus précisément sur les conditions de Barkhausen, avec une partie amplificatrice et une partie réactive.

$$G_{\text{ligne à retard}} + G_{\text{amplificateur}} + G_{\text{autres éléments}} = 0^+ dB \quad (2.6)$$

L'équation 2.6 donne la condition d'oscillation en gain, tandis que l'équation 2.7 donne celle de la phase et détermine la fréquence de l'oscillateur :

$$2\pi f_0 \frac{L_{cc}}{V_p} + 2\Phi_{IDT} + \Phi_E = 2n\pi \quad (2.7)$$

Avec, $2\pi f_0 \frac{L_{cc}}{V_p}$ le déphasage introduit par la ligne à retard, où f_0 est la fréquence d'oscillation, L_{cc} la distance centre à centre des transducteurs et V_p la vitesse de phase de l'onde de Love, Φ_{IDT} le déphasage introduit par un transducteur, Φ_E le déphasage introduit par la chaîne amplificatrice, et n un entier naturel.

2.2.2 Relation entre les sensibilités en vitesse et en fréquence

La grandeur mesurée expérimentalement est ainsi la fréquence d'oscillation de l'oscillateur à onde de Love. Tous les résultats feront donc apparaître des variations de fréquence. La sensibilité à l'effet de masse du capteur peut se mettre sous la forme d'une sensibilité en fréquence dont la formule est décrite en équation 2.8. La sensibilité à l'effet de masse en fréquence du capteur à onde de Love est liée à la sensibilité à l'effet de masse en vitesse d'après la formule 1.4c donnée dans le chapitre 1.3.3.1 par la relation 2.9 [Zim02a].

$$S_m^f = \frac{\Delta f}{f_0} \frac{1}{\Delta(\rho_b b)} = \frac{\Delta f}{f_0} \frac{A}{\Delta_m} \quad (2.8)$$

Avec f_0 la fréquence du dispositif, $\Delta f = f_1 - f_0$, et f_1 la fréquence pour le dispositif avec couche sensible, $\Delta(\rho_b b)$ la modification de la masse volumique

ainsi que de l'épaisseur de la couche, A la surface sur laquelle la couche a été déposée et Δ_m la variation de masse sur le capteur.

$$S_m^f = \frac{Vg}{Vp} S_m^v \quad (2.9)$$

Avec Vg la vitesse de groupe, Vp la vitesse de phase, S_m^v la sensibilité à l'effet de masse en vitesse, et S_m^f la sensibilité à l'effet de masse en fréquence.

2.2.3 Caractéristiques de l'électronique

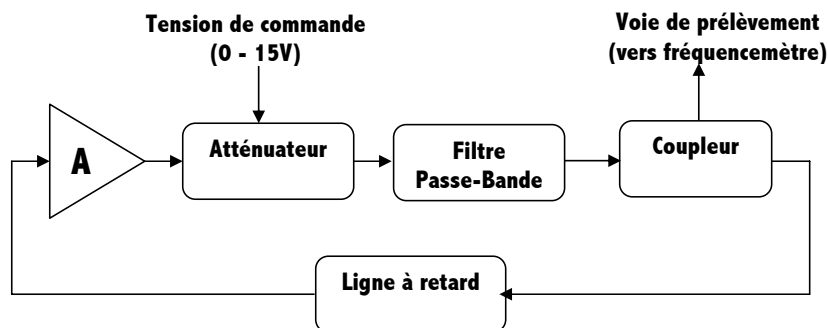


FIG. 2.14: Schéma synoptique de la chaîne d'oscillation

Le schéma de l'électronique est présenté en figure 2.14. Nous en détaillons dans cette partie la conception, ainsi que le choix des composants. Le gain de l'amplificateur doit être calculé de façon à pouvoir compenser les pertes dans la ligne à retard. Les pertes d'insertion d'un capteur à un autre peuvent varier, et il est difficile de réaliser un amplificateur variable à la fréquence de travail (≈ 120 MHz). Nous insérons alors dans la boucle un atténuateur variable, qui permet de régler le gain dans le but d'avoir un gain de boucle ouverte le proche possible de 1^+ (ou 0^+ dB). Le coupleur sert à prélever le signal sans trop perturber la boucle d'oscillation pour connaître la fréquence d'oscillation. Le filtre Passe-Bande atténue les harmoniques de la fréquence d'oscillation. Enfin la ligne à retard (le capteur) introduit un déphasage et des pertes.

2.2.3.1 L'amplificateur

Les pertes d'insertion d'une ligne à retard nue s'élèvent à 30 dB en moyenne mais peuvent atteindre jusqu'à 35 dB. Donc pour assurer une oscillation lors d'une détection, un gain minimum de 35 dB est requis pour l'amplificateur. Or un amplificateur est un composant actif et de ce fait apporte

du bruit supplémentaire; il est donc nécessaire d'utiliser des amplificateurs de type LNA (Low Noise Amplifier). Il est difficile pour un amplificateur d'avoir à la fois un gain élevé et un faible bruit aux fréquences de fonctionnement souhaitées. Nous devons donc cascader plusieurs amplificateurs afin d'obtenir les caractéristiques souhaitées. Pour n quadripôles en cascade, chacun des quadripôles étant caractérisé par son gain propre disponible G_n et par son facteur de bruit F_n , le facteur de bruit résultant est donné par la relation de FRIIS présentée dans l'équation 2.10 :

$$F = F_1 + \frac{F_2 - 1}{G_1} + \dots + \frac{F_n - 1}{G_1 \dots G_{n-1}} \quad (2.10)$$

Cette relation implique que l'amplificateur placé en tête doit être celui qui présente le facteur de bruit le plus faible. De plus, le facteur de bruit total F est d'autant moins influencé par les étages suivants que le premier étage présente un gain disponible élevé. C'est en revanche le dernier étage qui fixe la puissance de sortie du dispositif, c'est donc ce dernier qui devra présenter un point de compression à 1 dB (P1 dB), ainsi qu'un point d'intermodulation du troisième ordre (IP3) les plus élevés possibles.

C'est pourquoi, nous avons choisi d'utiliser en premier étage un amplificateur M/A-COM SMA75-3, qui possède un gain de 20,5 dB, présente un facteur de bruit de l'ordre de 1,7 dB, et un point de compression à 1dB de l'ordre de +9dBm. En deuxième étage, nous utiliserons un amplificateur M/A-COM SMA82 dont le gain est de 25 dB, le facteur de bruit de 2,8 dB et un point de compression à 1dB de l'ordre de +20 dBm.

La succession de ces deux amplificateurs qui sont tous deux adaptés à 50 Ω nous donne donc un amplificateur équivalent qui possède les caractéristiques suivantes :

- Gain : 45,5dB,
- Facteur de Bruit : 1,78 dB,
- Fréquence : $f_{min} = 20$ MHz et $f_{max} = 250$ MHz,
- Puissance de sortie en régime linéaire : =+20 dBm,
- IP3 : +31 dBm,

2.2.3.2 L'atténuateur

L'atténuateur permettra d'ajuster le gain de l'amplificateur de façon à rester à la limite d'oscillation : gain en boucle ouverte = 0^+ dB. Sa bande de fréquence est la même que celle de l'amplificateur et son atténuation devra présenter un maximum supérieur à 30 dB et un minimum inférieur à 5 dB. La puissance d'entrée maximale tolérée devra être supérieure à la puissance

de sortie de l'amplificateur. L'atténuateur variable M/A-COM SMG1 répond à ces conditions.

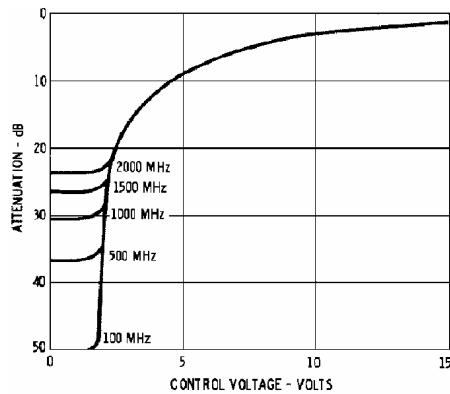


FIG. 2.15: Atténuation en fonction de la tension de contrôle [MAC]

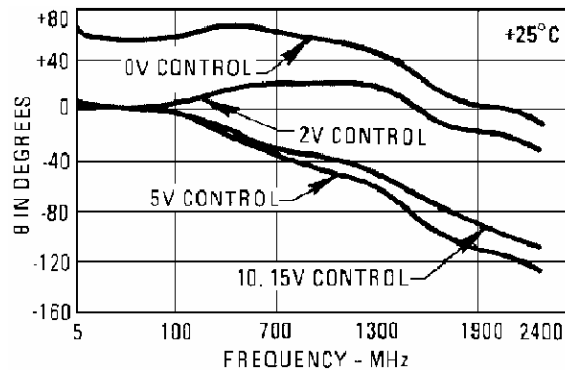


FIG. 2.16: Déphasage en fonction de la tension de contrôle et de la fréquence [MAC]

On notera sur la figure 2.15 une atténuation qui ne varie pas linéairement avec la tension de contrôle. Pour une fréquence de fonctionnement de 100 MHz, l'atténuation maximale est de l'ordre de 50 dB pour une tension de contrôle minimum de 2 V environ. Cependant, la plage utilisable de variation de gain de l'électronique est plutôt limitée à 30 dB, due à une variation très rapide de l'atténuation en fonction de la tension de contrôle autour de 2 V.

On notera également sur la figure 2.16, une phase qui varie en fonction de la tension de contrôle et de la fréquence. De ce fait, chaque variation de la tension de contrôle apporte un déphasage au montage, donc un changement de la fréquence d'oscillation. Aussi après réglage du gain (avec une marge suffisante pour assurer l'oscillation pendant toutes les phases de test) et une fois la fréquence stabilisée, les tests de détection sont menés à gain constant.

2.2.3.3 Le filtre

Un filtre Passe-Bande de type de Tchebitchev a pour but d'atténuer les harmoniques de la fréquence d'oscillation pour une meilleure stabilité de l'oscillateur. Il s'agit d'un filtre Passe-Bande passif de Tchebitchev du 3ème ordre avec une très faible atténuation (environ 0,01 dB) dans la Bande-Passante (75 MHz-130 MHz) de manière à ne pas perturber le gain en fonction de la fréquence. Le schéma idéal et les caractéristiques théoriques sont données en figure 2.17.

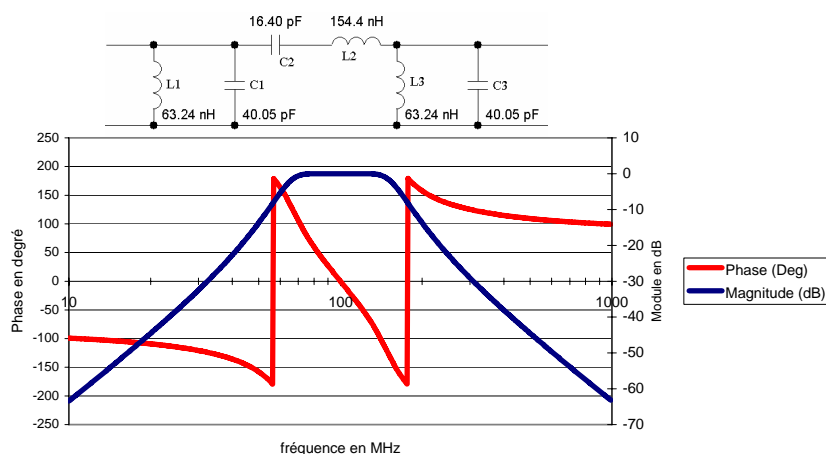


FIG. 2.17: Schéma et Réponse du filtre Passe Bande de Tchebychev du troisième ordre

Les valeurs normalisées les plus proches des capacités sont : 15 pF et 39 pF, et pour les inductances : 68 nH et 150 nH. Ces valeurs approchées vont légèrement modifier la réponse du filtre sans pour autant perturber le fonctionnement du montage final (cf. figure 2.22).

Pour un fonctionnement en oscillateur des capteurs avec une géométrie permettant de réduire les pertes (cf. chapitre 2.1.4) il est nécessaire d'agrandir la bande passante du filtre entre 75 MHz et 160 MHz. De ce fait, les nouvelles valeurs normalisées des capacités sont respectivement 12 pF et 47 pF, et 39 nH et 150 nH pour les inductances.

2.2.3.4 Le coupleur

Le but du coupleur (cf. figure 2.18) est de prélever une très faible partie du signal pour mesurer la fréquence d'oscillation sans perturber le montage. Le coupleur doit apporter des pertes minimales entre les ports A et C, doit isoler les ports A et D et les ports B et C entre eux. Pour cela, il doit avoir un coefficient de couplage le plus faible possible tout en permettant d'obtenir une puissance suffisamment élevée au niveau du compteur de fréquence. Un coupleur 20 dB (PULSAR C4-04-A) assurera un bon compromis.

2.2.4 Limitation du bruit

Le dispositif électronique ainsi réalisé permet d'obtenir des variations de fréquences qui reflètent les variations de phase, dans une grande plage de pertes en transmission, avec ou sans liquide, et pour différentes viscosités par

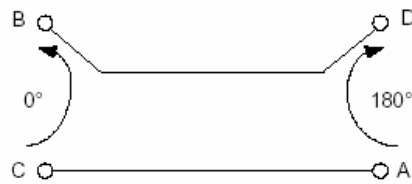


FIG. 2.18: *principe de fonctionnement d'un coupleur électromagnétique*

exemple. Un contrôle automatique du gain (CAG), qui permettrait de limiter la distorsion (bruit d'amplitude et de phase) du signal en évitant d'atteindre la saturation des amplificateurs, perturberait le signal de façon non contrôlée pendant les phases de détection.

Pour garantir un minimum de variation de phase de l'électronique de contre-réaction et augmenter la stabilité de l'oscillateur ainsi réalisé, il est important de limiter tous bruits extérieurs qui pourraient perturber la réponse du système. Nous avons utilisé des amplificateurs de type LNA pour limiter le bruit apporté par l'électronique, il faut de même prendre en compte l'adaptation d'impédance des composants. Les composants actifs utilisés lors de cette étude sont tous adaptés à 50Ω . L'adaptation d'impédance en entrée et en sortie des lignes à retard représente, en termes de développement et surtout en réglage, une étape longue et spécifique pour chaque type de ligne et en fonction de son environnement de fonctionnement (gaz ou liquide). En revanche, il sera intéressant de contrôler l'impédance caractéristique des lignes de transmission du signal électrique sur le circuit électronique, afin de limiter les réflexions de signaux.

Nous utiliserons des lignes en guide d'onde coplanaire qui incluent un plan de masse tout autour des lignes de transmission pour mieux s'affranchir encore des parasites. Un schéma représentant les guides d'onde coplanaires est présenté en figure 2.19.

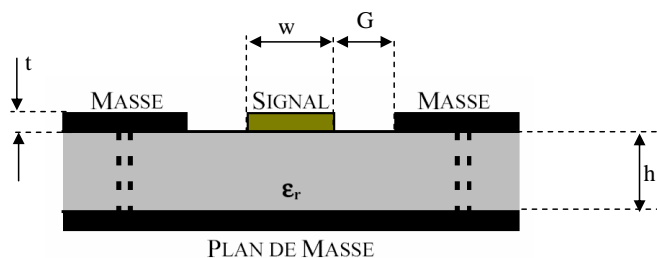


FIG. 2.19: *Schéma d'un guide d'onde coplanaire, avec le signal entouré par un plan de masse*

Les paramètres importants pour garantir une impédance caractéristique de 50Ω sont la constante diélectrique du substrat ϵ_r (4,7 pour de l'époxy), son épaisseur h (0,8 mm), l'épaisseur de cuivre t ($35 \mu\text{m}$), la largeur de la ligne de transmission w ($1170 \mu\text{m}$) et la distance séparant la ligne de transmission et le plan de masse G ($450 \mu\text{m}$).

Enfin, l'électronique est placée dans un boîtier métallique HF Pyrecap AGO4-2-CB afin de limiter le rayonnement du dispositif et la réception d'ondes parasites (CEM).

2.2.5 Spécificité de l'électronique en milieu liquide

Comme nous l'avons vu au chapitre 1.3.3, un des intérêts des capteurs à ondes de Love réside dans leur possible utilisation en milieu liquide du fait de l'absence de composante verticale de l'onde. Mais le passage d'un milieu gazeux à un milieu liquide ne va pas sans quelques modifications. L'électronique telle qu'elle a été conçue ne convient pas à une utilisation en milieu liquide. La première modification à apporter concerne le gain de l'électronique de contre réaction. En effet un liquide a une viscosité plus élevée que l'air (ou un autre gaz) et entraîne une augmentation des pertes d'insertion, pour de l'eau déionisée celles-ci augmentent de 13 dB environ. Les pertes s'élèvent donc à 43 dB et risquent de s'accroître en cas d'immobilisation de la couche sensible puis de l'espèce cible. Le gain maximum disponible par l'électronique devient donc trop faible et ne permet pas de compenser les pertes du capteur pour assurer une oscillation stable. Il est donc indispensable d'augmenter le gain de l'électronique, ce qui est effectif par l'insertion en début de la chaîne amplificatrice d'un autre pré-amplificateur SMA75-3. Bien entendu c'est l'amplificateur qui présente le moins de bruit qui sera placé en premier (formule de FRIIS (équation 2.10)). Le schéma synoptique est représenté en figure 2.20, cela résulte en un gain maximum disponible de 65 dB avec un facteur de bruit légèrement plus faible de l'ordre de 1.71 dB.

Cependant l'électronique ainsi réalisée ne peut être directement utilisée pour des applications en milieu liquide. En effet comme cela a été décrit dans la thèse d'Ollivier Tamarin [Tam02], la réponse fréquentielle en gain du capteur à ondes de Love est perturbée quand un liquide adjacent, et en particulier conducteur, est présent à sa surface. Lorsque l'on se place dans le domaine temporel on observe très nettement l'importance du niveau du pic électromagnétique. L'eau, qui possède une constante diélectrique élevée (≈ 80), mais surtout les liquides conducteurs favorisent la propagation de ce pic électromagnétique dans une configuration où les IDTs sont excités électriquement par rapport à la masse. L'utilisation de baluns (transformateurs Radio Fréquence) permet de pallier ce problème en symétrisant le signal électrique

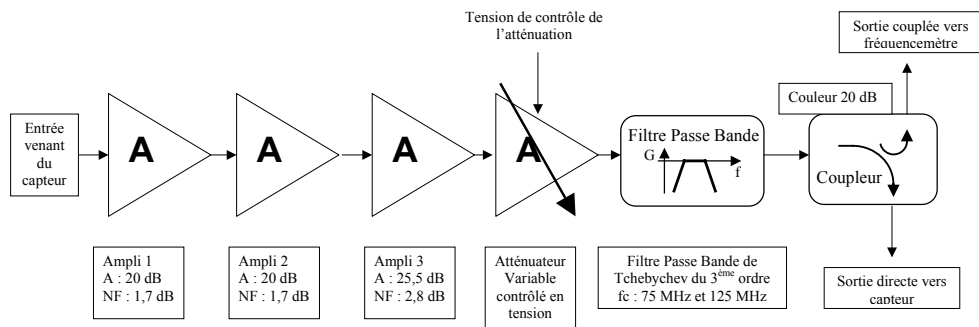


FIG. 2.20: Schéma de l'électronique pour des applications en milieu liquide

par rapport à la masse comme cela est présenté en figure 2.21. Un balun est un circuit électrique utilisé pour effectuer une liaison entre une ligne de transmission symétrique (ligne bifilaire par exemple) et une ligne de transmission asymétrique (câble coaxial par exemple) et inversement. Le terme balun vient des mots anglais **BAL**anced (équilibré) et **UN**balanced (déséquilibré).

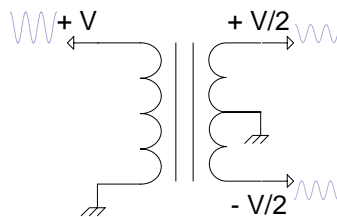


FIG. 2.21: Schéma d'un balun

Il est possible d'expliquer la diminution du pic électromagnétique par la symétrie des signaux électriques. En effet, sur un même transducteur un signal sinusoïdal est transmis sur une électrode, alors que son opposé est transmis sur la deuxième électrode. Chacune de ces électrodes va générer un signal électromagnétique, celui-ci va avoir tendance à s'annuler du fait de l'opposition de phase des signaux.

2.2.6 Caractérisation électrique

Nous avons caractérisé électriquement l'électronique de contre-réaction destinée à des applications en milieu gazeux à l'aide d'un analyseur de réseaux. Le résultat est présenté en figure 2.22 pour différentes tensions de contrôle. On observe bien une variation croissante du gain du dispositif pour une augmentation de la tension de contrôle. Le gain disponible maximum est

de 45 dB, celui-ci s'élève à environ 60 dB dans le cas d'une électronique destinée à un usage en milieu liquide (résultats non montrés). La bande passante est comprise entre 75 MHz et 145 MHz.

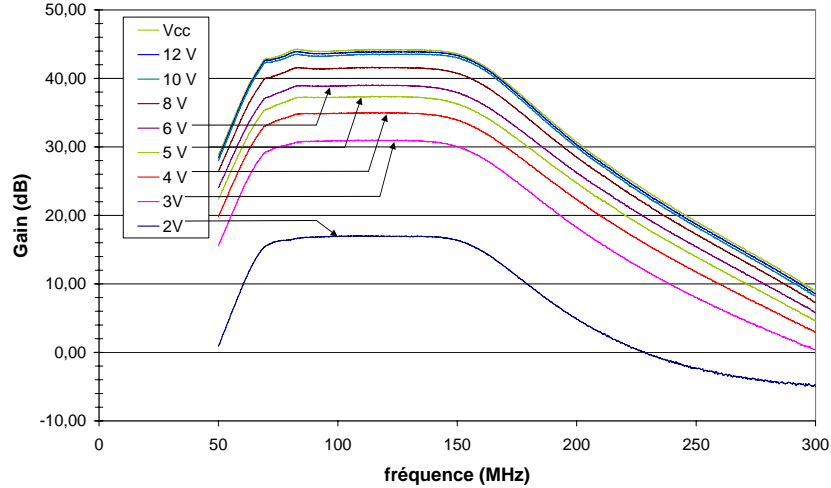


FIG. 2.22: réponse en S_{21} de l'électronique

On retrouve également sur cette figure 2.22 la plage de variation du gain d'une électronique de conditionnement destinée à un usage en milieu gazeux, environ 30 dB (cf. paragraphe 2.2.3.2, p.64).

Les caractéristiques de l'électronique ainsi réalisée nous permettent d'obtenir de très bonnes stabilités à court-terme. La stabilité à court terme est définie comme étant le rapport entre la différence de deux échantillons successifs de fréquence et la période d'échantillonnage (relation 2.11).

$$N^f = \frac{f_n - f_{n-1}}{\Delta_t} \quad (2.11)$$

Avec N^f la stabilité à court-terme (le bruit à court-terme), f_n et f_{n-1} les échantillons de fréquence n et $n-1$, et Δ_t la période d'échantillonnage entre deux mesures.

Nous avons mesuré cette stabilité à court terme au cours d'une expérience qui a duré une semaine dans une atmosphère stabilisée en température après une période de stabilisation. Les résultats sont inscrits dans le tableau 2.2. On observe que plus de 99,96% des mesures sont inférieure à 1 Hz/s. Ce tableau nous montre que 99% des mesures restent inférieure à 0,5 Hz/s. On obtient donc une très bonne stabilité typique inférieure à 1 Hz/s pour une fréquence de fonctionnement de 110 MHz.

TAB. 2.2: *Distribution de la stabilité à court-terme sur une journée entière après stabilisation du matériel électrique*

N^f en Hz/s	$\leq 0,2$	$\leq 0,3$	$\leq 0,4$	$\leq 0,5$	≤ 1	≤ 2
Distribution de la stabilité à court-terme	77,97%	93,86%	98,18%	99,39%	99,96%	99,99%

Cette stabilité joue un rôle important sur le seuil de détection du capteur. En effet, si l'on considère l'expression de la sensibilité en fréquence du capteur (cf. équation 2.8), et une plus petite variation de fréquence significative égale à 3 fois le bruit en fréquence, on obtient un seuil de détection par l'équation 2.12. Pour un S_m^f théorique typique de $30 \text{ m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ et un bruit en fréquence de 1 Hz, nous obtenons un seuil de détection surfacique $\frac{\Delta_{m_{min}}}{A}$ de $1 \text{ } \mu\text{g}/\text{m}^2$ ou $1 \text{ pg}/\text{mm}^2$.

$$\Delta_{m_{min}} = \frac{3N^f}{f_0} \frac{A}{S_m^f} \quad (2.12)$$

Notons que ce seuil, basé sur le bruit à court-terme, suppose la détection d'un échelon par rapport à un milieu de référence.

2.2.7 Le banc de mesure

Le banc de mesure complet est présenté en figure 2.23. Il est situé au Laboratoire d'Immunologie et de Parasitologie de l'Université Bordeaux 2 Victor Segalen. C'est dans ce laboratoire en effet que sont réalisées les expériences de greffage de la couche sensible d'anticorps à la surface des capteurs et la détection d'espèces biologiques (cf. chapitres 3 et 4).

Le banc se compose de plusieurs parties :

- la partie qui contient les capteurs dans leur cellule ainsi que l'électronique de rétroaction,
- le bloc d'alimentation de l'électronique,
- les fréquencemètres qui mesurent la fréquence d'oscillation,
- et un ordinateur d'acquisition qui permet d'enregistrer les données, sauf mention contraire toutes les acquisitions seront réalisées en échantillonnant un point de mesure toutes les 5 secondes.

Deux configurations de fonctionnement sont possibles pour effectuer ces expériences : en dynamique, ou en statique.

La configuration dynamique (figure 2.24) présente l'avantage de pouvoir fonctionner de manière presque autonome grâce à l'utilisation de pompes

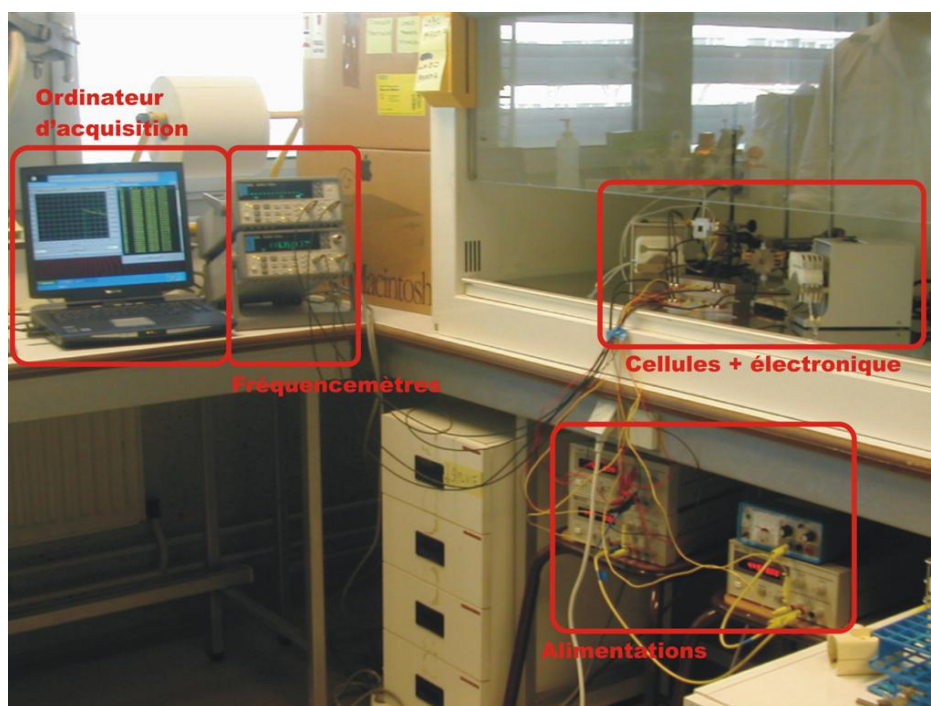


FIG. 2.23: Banc de mesure complet

péristaltiques et de vannes qui permettent de faire circuler les fluides à l'intérieur de la cellule sans modifier le volume de liquide au dessus du capteur. L'inconvénient de cette configuration réside en l'utilisation d'un volume de solution très important (plusieurs millilitres) dû à la longueur des tubes.

Dans un premier temps et dans le cadre de ces travaux, nous avons choisi d'utiliser la configuration statique avec un capot de cellule ouvert (figure 2.25), qui utilise 500 μl de solution, même si l'utilisation d'une pipette pour interchanger les solutions peut perturber la fréquence du capteur.

2.3 L'apport des matériaux polymères

Un polymère est une substance en général organique (parfois partiellement inorganique) liquide ou solide à température ambiante qui est constituée de macromolécules ayant la même nature chimique. Le mot polymère vient du grec "polus" plusieurs et "meros" parties, ce qui signifie qu'il s'agit d'une structure le plus souvent linéaire ou bi ou tridimensionnelle constituée par l'enchaînement d'unités chimiques de répétitions ou motifs unitaires. Ces motifs unitaires proviennent de la polymérisation de monomères. Les poly-

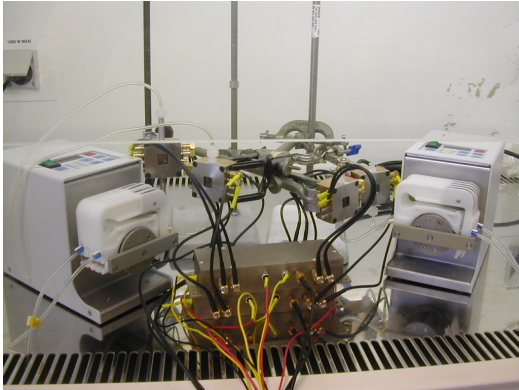


FIG. 2.24: *Configuration en dynamique*

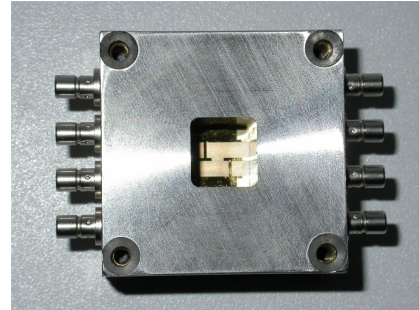


FIG. 2.25: *Configuration en statique*

mères sont utilisés dans la fabrication d'un nombre très important d'objets pour lesquels ils ont souvent remplacé des substances naturelles. Les propriétés chimiques et physiques des polymères font qu'ils sont de plus en plus présents dans les domaines de l'industrie et de la recherche. Il font notamment apparition dans les MEMS et permettent d'augmenter leurs performances.

2.3.1 Couche guidante

Les travaux de thèse de Pierre Mazein [Maz05] ont permis entre autres de mettre au point un simulateur numérique qui permet de prévoir les performances des capteurs à ondes de Love en fonction des caractéristiques des matériaux notamment. Lors de ses travaux, celui-ci a mis théoriquement en évidence l'intérêt d'utiliser de nouveaux matériaux pour remplacer la couche guidante actuelle en SiO_2 comme le montre la figure 2.26.

En effet l'utilisation de matériaux polymères, par exemple, permettrait d'augmenter la sensibilité à l'effet de masse des capteurs à ondes de Love. Cependant, les résultats apparaissant sur cette figure ne prennent pas en compte les pertes par propagation. Or il apparaît que les matériaux présentant les sensibilités les plus élevées ont un module transverse de pertes (modélisable par une partie imaginaire de la rigidité transverse) élevé, et donc des pertes par propagation plus importantes.

Bien que ces résultats préliminaires ne tiennent pas compte des pertes par propagation et soient purement théoriques, les polymères apparaissent comme potentiellement intéressants en ce qui concerne l'augmentation de la sensibilité liée à l'écartement des vitesses de l'onde entre le substrat et la couche guidante. De plus des expériences menées par Josse *et al.* [Jos01]

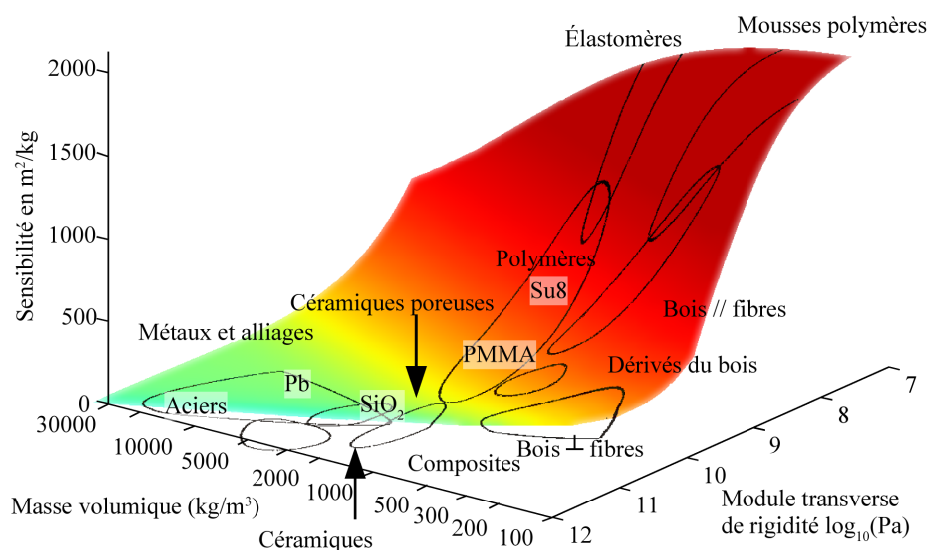


FIG. 2.26: Sensibilité en fonction du module de rigidité et de la masse volumique. D'après [Maz05].

ou Gizeli [Giz00] et [Giz97] ont montré la bonne sensibilité des capteurs possédant une couche guidante polymère pour des détections en milieu liquide notamment. Le procédé de dépôt des couches polymères par "spin-coating" est décrit en Annexe D. Ce type de dépôt présente plusieurs avantages par rapport au dépôt du SiO₂ par PECVD : la facilité de dépôt tant au niveau du temps de réalisation qu'au niveau du coût du matériel, un bon contrôle de l'épaisseur de polymère déposé sur le capteur, ainsi qu'une rugosité de surface relativement faible.

2.3.1.1 Choix des matériaux

La figure 2.26 réalisée par Pierre Mazein montre que des polymères très utilisés dans le domaine des microtechnologies comme la SU8¹ et le PMMA (polyméthacrylate de méthyle ou PolyMethyl MethAcrylate en anglais) pourraient offrir de très bonnes sensibilités à l'effet de masse. Ces polymères sont commercialement disponibles, simples d'utilisation, et semblent être de parfaits candidats pour ces expériences.

Une étude théorique, utilisant le logiciel développé lors de la thèse de Pierre Mazein et donc toujours avec la réserve de la non prise en compte

¹ingrédients de fabrication disponibles à l'adresse internet <http://www.cise.columbia.edu/clean/msds/su-8resist.pdf>

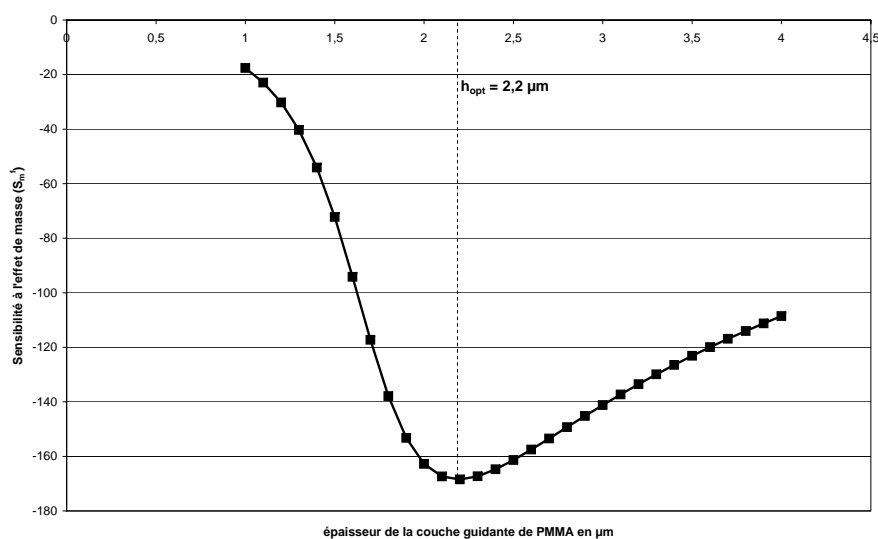


FIG. 2.27: Sensibilité à l'effet de masse en fonction de l'épaisseur de PMMA. Caractéristiques : $\lambda = 40 \mu\text{m}$, coupe du quartz AT, variation densité couche sensible PMMA de 50 kg/m^3 .

des pertes, a été menée et confirme entre autres l'intérêt d'utiliser, comme avec une couche guidante en SiO_2 , un quartz de coupe AT pour conférer au capteur un maximum de sensibilité. La figure 2.31, représente la sensibilité à l'effet de masse en fonction de l'épaisseur de la couche guidante en PMMA en utilisant un quartz de coupe AT. Il en ressort qu'une épaisseur optimale de $2,2 \mu\text{m}$ (d'après la figure 2.27) permettrait d'obtenir une sensibilité à l'effet de masse de $170 \text{ m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ au lieu de $27 \text{ m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ pour un capteur avec une couche guidante en silice d'épaisseur optimale (cf. figure 2.3 au chapitre 2.1.1), pour une même longueur d'onde $\lambda = 40 \mu\text{m}$.

2.3.1.2 Réalisation des capteurs à couche guidante polymère

Les polymères SU8 et PMMA semblent de bons candidats et comme nous l'avons vu précédemment se déposent très facilement par spin coating. La documentation de ces polymères fournit un abaque qui permet de définir une épaisseur visée en fonction de la vitesse de rotation de la tournette. Pour obtenir une épaisseur $2 \mu\text{m}$ de PMMA il faut une vitesse de rotation de $1300 \text{ tours} \cdot \text{min}^{-1}$ pendant 30 secondes, puis une température de recuit sur plaque chauffante pour évaporer les solvants de 180°C pendant 60 à 90 secondes. La figure 2.28 représente la réponse fréquentielle expérimentale d'une ligne à retard réalisée avec un quartz de coupe AT sans couche guidante avant et après dépôt d'un film de $1,8 \mu\text{m}$ de PMMA.

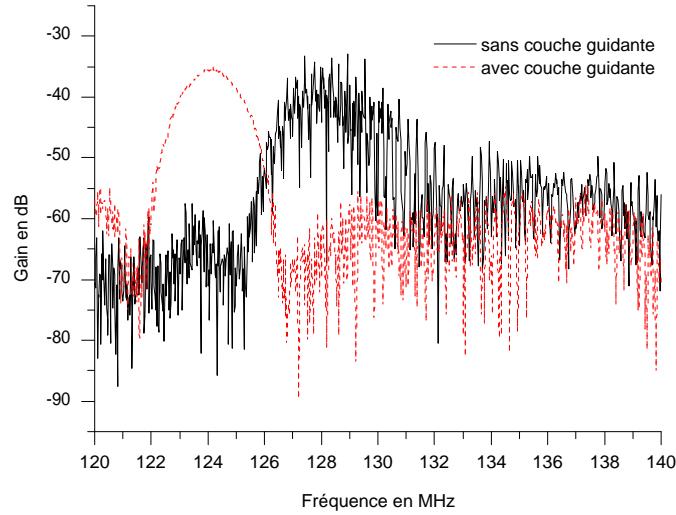


FIG. 2.28: Réponse fréquentielle en transmission d'une ligne à retard avant et après dépôt de couche guidante en PMMA.

Nous observons bien sur cette figure le décalage en fréquence (Δf) dû au dépôt de la couche guidante, mais peu de variation sur le gain maximum (Δgain), car la couche guidante confine l'énergie acoustique, et donc en dessous d'une certaine épaisseur diminue (ou en tout cas n'augmente pas) les pertes d'insertion de la ligne à retard.

2.3.1.3 Utilisation en milieu liquide

Il est indispensable de vérifier le fonctionnement en milieu liquide des capteurs ainsi fabriqués avec une couche guidante en PMMA. La figure 2.29 montre les réponses fréquentielles en gain d'un capteur avec une couche guidante en PMMA avec et sans eau au-dessus. Nous observons des pertes de l'ordre de 30 dB pour un capteur nu, alors que celles-ci s'élèvent à plus de 70 dB en présence d'eau, soit une différence de 40 dB. Avec une couche guidante en SiO_2 la différence était de 13 dB environ seulement.

Nous avons essayé de comprendre la différence des pertes d'insertion dues à l'ajout d'eau à la surface du capteur entre une couche guidante en SiO_2 et une couche guidante polymère comme le PMMA. Des tests ont montré qu'il ne s'agissait pas d'une perméabilité supérieure du polymère qui pourrait ainsi beaucoup plus perturber l'onde. Hormis les caractéristiques mécaniques des matériaux utilisés, la principale différence entre une couche guidante en silice et en polymère réside dans l'épaisseur de cette couche. Celle-ci est

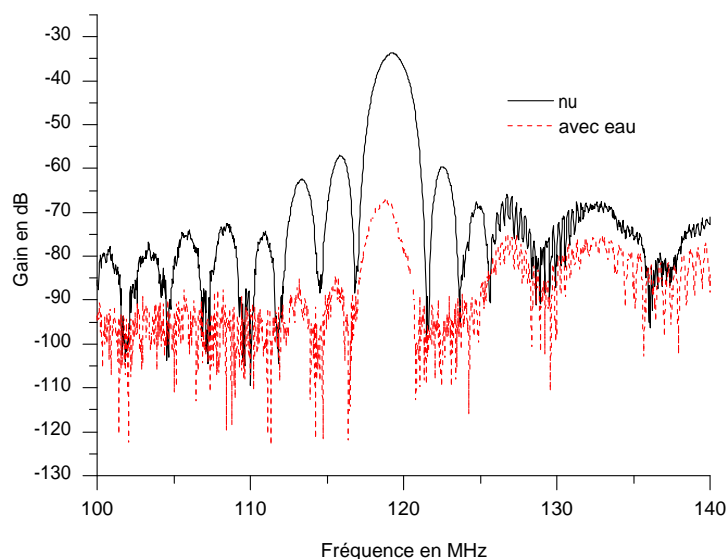


FIG. 2.29: Réponse fréquentielle en transmission d'un capteur à ondes de Love avec une couche guidante PMMA sous air et en présence d'eau déionisée.

comprise entre 4 et 6 μm pour la silice et entre 1 et 2 μm pour les polymères utilisés et est choisie afin de conférer au capteur une sensibilité théorique maximale. Une simulation par éléments finis à l'aide du logiciel FEMLAB 3.1[®] (devenu COMSOL Multiphysics à ce jour) a permis d'apporter une réponse à ce phénomène. Les logiciels utilisant une résolution par éléments finis permettent de résoudre de manière discrète une équation différentielle partielle dont on cherche une solution approchée "suffisamment" fiable.

Les figures 2.30 (a), (b) et (c) représentent les résultats d'une simulation, dans laquelle nous désirions calculer la valeur du potentiel électrique dans le capteur. Nous ne nous sommes intéressés qu'à la région proche des IDTs. Un potentiel électrique arbitraire de +10 V et -10 V a été appliqué sur les IDTs à structure doubles doigts (cf. chapitre 2.1.1) en respectant une alternance potentiel positif, potentiel négatif. Les niveaux de gris représentent les potentiels : 10 V pour le clair et -10 V pour le foncé.

La figure 2.30(a) représente une vue en coupe de 4 paires de transducteurs métalliques ($\lambda=40 \mu\text{m}$) déposés sur du quartz avec une couche guidante de PMMA de 2 μm d'épaisseur sur laquelle une épaisseur considérée comme semi-infinie d'eau ($\epsilon_r = 80$) est déposée. La figure 2.30(b) représente la même configuration de transducteurs interdigités avec une couche guidante de 5 μm de SiO_2 recouverte d'eau. La figure 2.30(c) représente la même configuration que la figure 2.30(a) mais sans eau au dessus des transducteurs interdigités.

Cette dernière figure montre qu'en présence d'air ($\epsilon_r = 1.001$), le poten-

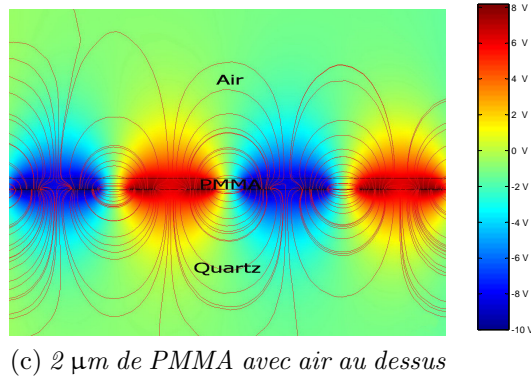
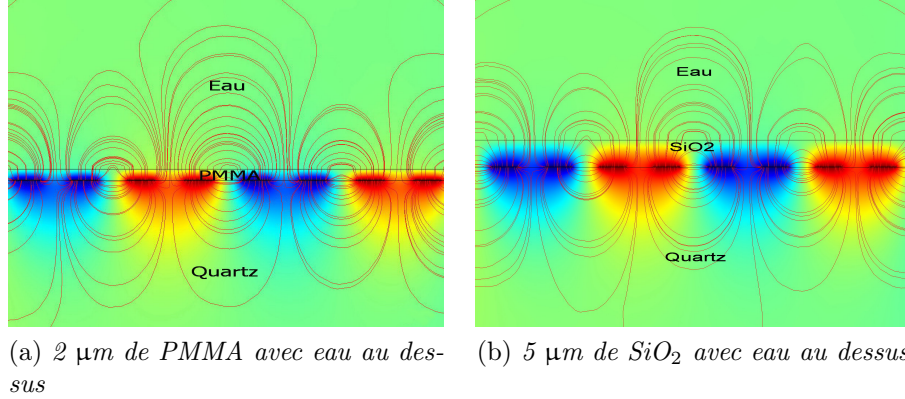


FIG. 2.30: Simulation du potentiel électrique des IDTs avec une couche guidante en PMMA de $2\ \mu\text{m}$.

tiel décroît uniformément en fonction de la distance aux IDTs indépendamment (ou presque) de l'épaisseur de la couche guidante. On observe sur les figures 2.30(a) et (b) que le potentiel décroît très rapidement à l'intérieur de la couche guidante, jusqu'à devenir nul dans l'eau. La forte valeur de la constante diélectrique de l'eau modifie le potentiel électrique et le champ électrique dans l'environnement proche des IDTs, et donc modifie la valeur de la capacité des IDTs. La modification de la capacité est d'autant plus importante que l'épaisseur de la couche guidante est faible.

Ce phénomène est visible également sur la figure 2.31 qui représente le paramètre en réflexion S_{11} d'un capteur avec couche guidante en polymère avec et sans eau. Cette désadaptation limite l'énergie transmise par la ligne à retard, et augmente donc les pertes en transmission jusqu'à rendre inutilisable ces capteurs en fonctionnement en oscillateur.

Plusieurs adaptations peuvent être envisagées pour résoudre ce problème majeur. L'une d'elle consisterait à augmenter l'épaisseur de PMMA pour

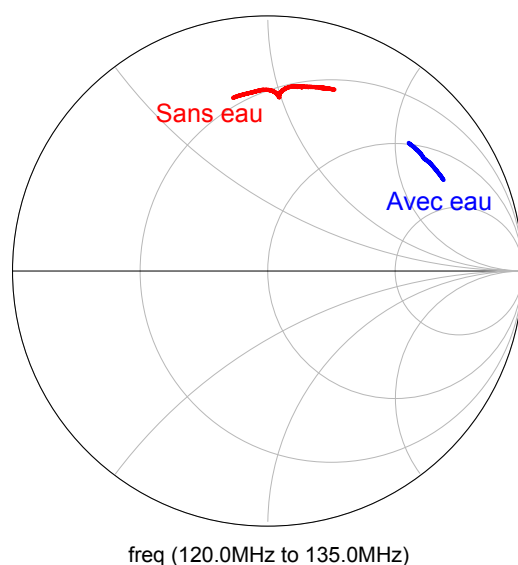


FIG. 2.31: Paramètre S_{11} d'un capteur avec couche guidante SU8 $2\ \mu\text{m}$ avec et sans eau

se rapprocher de celle de la silice, mais au détriment d'une sensibilité a priori plus faible, et cela augmenterait surtout le niveau des pertes par visco-élasticité dans le polymère qui deviendraient prohibitives.

Une seconde solution consiste à limiter la zone de contact entre la surface du capteur et l'eau à la zone de propagation de l'onde entre les IDTs uniquement. Ce système présente plusieurs avantages : comme nous venons de le voir le premier est de limiter les pertes en transmission en présence de milieu liquide et ainsi favoriser l'utilisation des capteurs avec une couche guidante en polymère, qui doivent présenter une sensibilité accrue par rapport aux capteurs avec une couche guidante en silice. Un deuxième avantage est de concentrer les espèces cibles à détecter sur la zone la plus sensible du capteur. En effet, la conception actuelle des cellules de test en milieu liquide confère une surface de contact entre le liquide et le capteur de $121\ \text{mm}^2$ (taille du joint approximée à un carré de $11\ \text{mm}$ par $11\ \text{mm}$), alors que la surface sensible au niveau du chemin de propagation du capteur est de seulement $11\ \text{mm}^2$ environ, avec une sensibilité moindre au niveau des transducteurs.

Cela est possible grâce à l'utilisation de cellules micro-fluidiques en polymère tel que le PDMS.

2.3.2 Cellule fluïdique

Le PDMS (Polydimethylsiloxane) est un polymère à base d'huile silicone organique très utilisé, il est particulièrement bien connu pour ses propriétés rhéologiques. Le PDMS est optiquement transparent, et est généralement considéré comme inerte, non toxique et non inflammable.

De plus des cellules microfluidiques en PDMS seront biocompatibles, peu coûteuses, rapides à concevoir, mais ont une courte durée de vie, car elles absorbent les solvants.

Le PDMS est très largement utilisé pour la fabrication de microcanaux [Wu03, Fuj02] (cf. Annexe D.2).

2.3.2.1 Application

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'utilisation de cellules en PDMS doit nous permettre de limiter la surface d'interaction du capteur avec le liquide à la zone inter-IDTs. Cette zone ne devra donc pas être recouverte de PDMS et permettra un accès au liquide avec l'utilisation de micro-pipette. Le reste de la surface du capteur devra être recouvert de PDMS afin d'assurer la fixation de la cellule à l'exception des IDTs. En effet, Le PDMS est un matériau relativement mou et présente donc une forte atténuation des ondes acoustiques. Il est alors nécessaire de protéger les IDTs en créant une cavité d'air d'une hauteur de $50\mu\text{m}$ par exemple.

La figure 2.32 représente les masques superposés qui vont servir au dépôt de la résine SU8 sur le wafer de silicium. La zone hachurée représente la surface inter IDTs et son épaisseur devra être au minimum de 3 mm , qui représente la hauteur d'eau à partir de laquelle toute modification du volume n'influe plus sur la réponse du capteur (cf. chapitre 3.4.1).

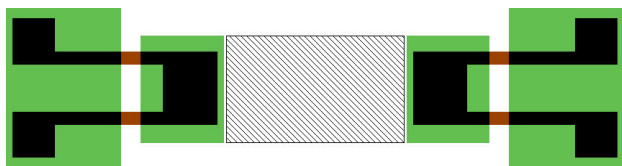
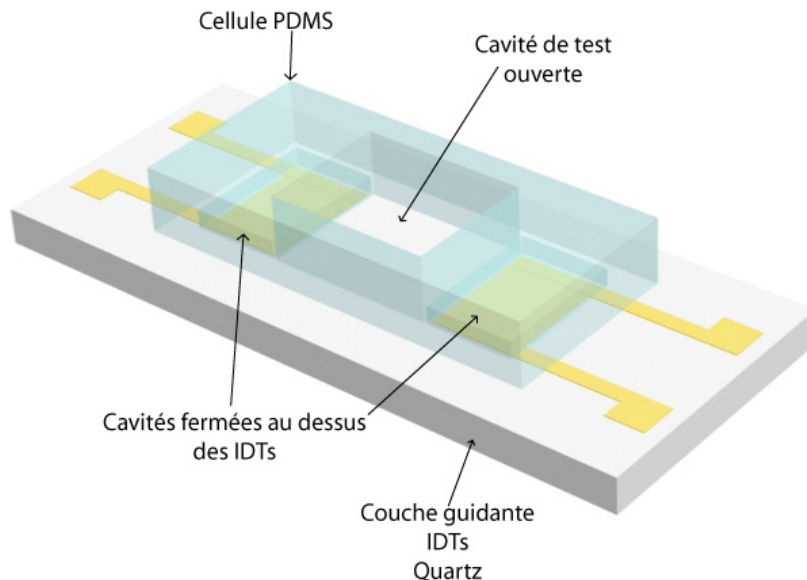


FIG. 2.32: Schéma du masque de photolithographie pour la fabrication des cellules PDMS

De part et d'autres, deux zones sont destinées à protéger les IDTs, une épaisseur de SU8 de $50\ \mu\text{m}$ suffit. Un mur de PDMS sépare ces deux type de zones afin d'assurer l'étanchéité et ainsi éviter la présence d'eau sur les transducteurs. Deux masques sont nécessaires à la réalisation de cette cellule dont une représentation en 3D est proposée en figure 2.33.

FIG. 2.33: *cellule PDMS*

A moyen terme, il serait intéressant de travailler en circulation, donc d'utiliser une cellule complètement fermée. Ces dispositifs sont plus simples à réaliser dû à la plus faible hauteur de SU8 ($\approx 100 \mu\text{m}$).

Les cellules microfluidiques en PDMS peuvent être classiquement fixées sur une surface de silice par une activation des groupes SiOH par UV/O₃. Or, cette étape fragilise la couche de liaison (cf. chapitre 3) entre le capteur et la couche sensible d'anticorps et risquerait donc d'empêcher l'accrochage de la couche sensible. De plus l'assemblage sur des surfaces différentes, comme les polymères en cours d'étude pour jouer le rôle de milieu guidant nécessitent la recherche de traitements de surface adaptés et spécifiques. Enfin, l'adhésion permanente de la cellule PDMS sur le capteur n'est pas aisément compatible avec une régénération complète du biocapteur. Pour l'ensemble de ces raisons, il est préférable d'utiliser un dispositif en PDMS amovible qui serait maintenu sur le capteur par pression assurant ainsi une bonne étanchéité.

2.4 Conclusion

Nous nous sommes concentrés dans ce chapitre sur la description des dispositifs à ondes de Love qui ont été utilisés dans ces travaux en précisant les différents paramètres qui permettent d'obtenir un maximum de sensibilité

à l'effet de masse.

Nous avons vu que le signal de mesure est la fréquence d'un oscillateur composé de la ligne à retard à ondes de Love et une électronique faible bruit de contre réaction. Celle-ci a été conçue de façon à favoriser la stabilité du signal dont dépend la limite de détection du dispositif. Cependant l'utilisation des capteurs à ondes Love en milieu liquide apporte de nouvelles difficultés (une augmentation des pertes notamment). Il est donc nécessaire de concevoir une électronique adaptée à cette utilisation, en augmentant le gain de cette électronique et en ajoutant des baluns qui permettent de limiter l'influence de la conductivité des liquides sur la réponse fréquentielle en transmission des capteurs.

Nous avons également montré qu'il était possible d'améliorer les performances de ces capteurs par divers procédés : en étudiant la géométrie des transducteurs interdigités et leur influence sur le niveau des pertes ou de la pente de phase, ou en remplaçant le SiO_2 de la couche guidante par des matériaux polymères ou hybrides par exemple. Cependant l'utilisation en milieu liquide de ces capteurs apporte de nouvelles difficultés encore, empêchant, pour le moment, leur utilisation dans ce cadre. La mise en place de cellules en PDMS permettra à terme de surmonter ces difficultés et ainsi de permettre leur utilisation. Cela permettrait d'augmenter la gamme de fonctionnement des capteurs et d'augmenter la sensibilité à l'effet de masse d'après le logiciel de simulation développé par Pierre Mazein, même si ce logiciel ne prend pas en compte les pertes par propagation.

Pour la suite de ces travaux nous nous focaliserons sur le greffage de la couche sensible sur le capteur puis la détection d'espèces cibles en utilisant des dispositifs à couche guidante de silice fonctionnant à une fréquence voisine de 120 MHz avec la cellule métallique en configuration capot ouvert.

Chapitre 3

Stratégie d'Immobilisation à la Surface du Capteur

3.1 Introduction

Les premières expériences ont été basées sur les résultats obtenus lors de la thèse d'Ollivier Tamarin [Tam02], qui avait développé un capteur à ondes de Love fonctionnant en milieu liquide. Celui-ci utilisait le DTSP (pour Dithio-bis(propionic acid N-hydroxysuccinimide ester)) comme intermédiaire liaison, et avait obtenu de premiers résultats en terme de faisabilité d'un biocapteur à ondes acoustiques. A partir de cette base, un premier objectif pour nous était d'obtenir une couche sensible la plus dense, uniforme et reproductible possible.

Dans ce chapitre, nous décrirons tous les choix et les étapes qui permettent d'obtenir une telle couche sensible. Il est nécessaire de choisir le biorécepteur à utiliser, ainsi que la manière de l'accrocher sur le capteur. Il est pour cela nécessaire de rappeler que le biocapteur à réaliser doit être le plus générique possible, c'est-à-dire utiliser un protocole de détection proche quelle que soit l'espèce cible à détecter (protéines, virus, bactéries, etc.).

3.2 Le biorécepteur

Le biorécepteur, l'élément de reconnaissance biologique, est le premier maillon du biocapteur. C'est un élément très important car responsable de la sélectivité et en partie de la sensibilité du dispositif. Nous pouvons différencier 4 catégories de biorécepteurs qui fonctionnent par des procédés enzymatiques, par affinité antigénique, par hybridation (dans le cas de l'ADN), et plus récemment par reconnaissance moléculaire.

Il permet l'identification de l'espèce à détecter grâce à son site sélectif en assurant la reconnaissance moléculaire, associée ou non à la transformation de l'espèce.

3.2.1 Les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques (ou biocatalyseurs), et permettent d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques. Elles sont les plus utilisées et les plus commercialisées. Elles possèdent de nombreux avantages comme la reproductibilité des lots, des caractéristiques et une durée de vie connue mais aussi des inconvénients dont une instabilité au niveau de leur fonctionnement, un caractère non générique (une enzyme est spécifique pour une application) [Iwa01].

De plus dans certains systèmes, il est nécessaire d'utiliser plusieurs enzymes. Ce sont des capteurs multienzymatiques [Bon01] et pour exploiter au mieux leur potentiel, un compromis est essentiel au niveau des conditions optimales de fonctionnement des différentes enzymes.

3.2.2 Hybridation de l'ADN

L'hybridation de l'ADN est une technique de génie génétique qui permet de déterminer la ressemblance entre les séquences de deux brins d'ADN. Les deux chaînes d'une molécule d'ADN sont complémentaires, des liaisons de faible énergie (liaison hydrogène) s'établissant entre leurs bases azotées. Ce principe est donc utilisé pour la détection de molécules d'ADN. Ainsi, la chaîne complémentaire de la séquence d'ADN à détecter est immobilisée sur le biocapteur puis l'ADN à analyser va s'hybrider selon le principe d'hybridation moléculaire sur cette molécule.

3.2.3 La reconnaissance moléculaire (Les MIPs)

De nouveaux supports sélectifs appelés polymères à empreintes moléculaires (ou MIPs en anglais pour Molecularly Imprinted Polymers) ont été développés. Les MIP possèdent des sites récepteurs spécifiques d'une molécule cible. L'extraction est donc basée sur un mécanisme de reconnaissance moléculaire. La synthèse est généralement réalisée dans un solvant aprotique et peu polaire (dichlorométhane) en présence de monomères préalablement choisis pour leur capacité à développer de fortes interactions non covalentes (liaisons hydrogènes) avec la molécule empreinte. Après polymérisation autour de cette molécule, son élimination conduit à la présence de cavités spécifiques. Ainsi, lors de la détection d'un échantillon, le MIP retient sélective-

ment la molécule empreinte et des composés de structure proche. Le potentiel des MIP pour l'extraction sélective de composés dilués dans un solvant organique, de préférence proche du solvant de polymérisation, a largement été démontré, comme par exemple par Hayden *et al.* [Hay01].

3.2.4 Affinité antigénique

Un anticorps ou immunoglobuline est une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes comme les bactéries et les virus. Les anticorps sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B, les plasmocytes, et reconnaissent des antigènes de manière spécifique.

Cette dernière propriété est exploitée par les biocapteurs, de ce fait appelés immunocapteurs, pour immobiliser l'espèce cible de manière spécifique. La plupart des antigènes sont des protéines, des polysaccharides et leurs dérivés lipidiques. Ces molécules composent la plupart des micro-organismes et de ce fait les anticorps sont capables de reconnaître une grande variété d'espèces cibles, de la petite molécule à la bactérie, en passant par les protéines ou les virus.

Cette grande diversité associée à la très bonne affinité et spécificité du système anticorps/antigène permet de rendre leur application plus générique tout en assurant une bonne reconnaissance de l'espèce cible, et nous a conduits à utiliser ce type de biorécepteur sur le capteur à ondes de Love.

3.3 Le couple Antigène/Anticorps

3.3.1 L'anticorps

3.3.1.1 Constitution

Les anticorps sont des glycoprotéines formées de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes (H pour heavy, en violet sur la figure 3.1) et 2 chaînes légères (L pour light, en vert) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures (en rouge) assurant une flexibilité de la molécule, et qui forment une structure en Y.

Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant et d'un domaine variable ; les chaînes lourdes sont composées d'un fragment variable et de 3 ou 4 fragments constants. Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères.

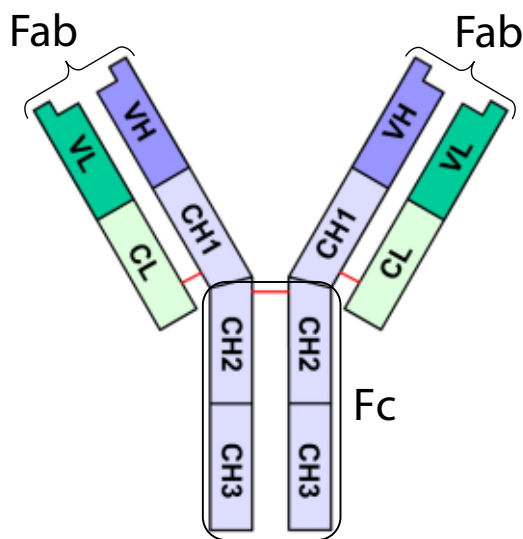


FIG. 3.1: Schéma d'un anticorps

Domaines constants : Les domaines constants (ou Fc pour fragment cristallisable) sont caractérisés par une séquence en acides aminés très proche d'un anticorps à l'autre. Chaque chaîne légère en possède un exemplaire noté CL. Les chaînes lourdes comportent, selon la classe d'anticorps, trois ou quatre domaines constants CH1, CH2, CH3 et CH4. Les domaines constants ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, mais interviennent dans l'activation du système du complément. Ils possèdent également des sites de liaison aux cellules immunitaires.

Domaines variables : Une immunoglobuline (Ig, dont l'IgG qui est une immunoglobuline de type G) possède quatre domaines variables (Fab) situés aux extrémités des deux bras du Y. L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde (VH) et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère (VL) constitue le site de reconnaissance (ou paratope) de l'antigène. Ainsi, une molécule d'immunoglobuline possède deux sites de liaison à l'antigène, un au bout de chaque bras. Ces deux sites sont identiques, d'où la possibilité de lier deux molécules d'antigène par anticorps.

3.3.1.2 Liaison à l'antigène

Les immunoglobulines ont la capacité de reconnaître et de se fixer de manière spécifique sur un antigène. Cette spécificité est conférée par la présence de domaines extrêmement variables aux extrémités des anticorps. La

reconnaissance entre antigène et anticorps est par exemple mise à profit dans la lutte contre les toxines bactériennes. Ces toxines agissent en se fixant sur des récepteurs présents à la surface des cellules de l'organisme, ce qui provoque des dérèglements importants de l'activité cellulaire. En se fixant sur ces toxines, les anticorps anti-toxine les neutralisent et préviennent les liaisons avec les récepteurs cellulaires.

De la même manière, de nombreux virus et bactéries n'exercent leur pathogénicité qu'après fixation aux cellules de l'organisme. Les bactéries utilisent des adhésines qui sont des molécules d'adhésion aux membranes cellulaires et les virus possèdent des protéines de fixation sur leur enveloppe externe. Les anticorps anti-adhésines et anti-protéines de la capsid virale bloquent l'action de ces agents pathogènes en se liant sur les molécules de fixation.

3.3.1.3 Anticorps monoclonaux et polyclonaux

Un agent pathogène (bactérie, virus, etc.) est reconnu par le système immunitaire par l'intermédiaire d'antigènes. Un antigène possède généralement plusieurs épitopes différents qui sont autant de sites de liaison aux anticorps. On peut classer une population d'anticorps selon sa capacité à reconnaître un seul ou plusieurs épitopes. On parle alors respectivement d'anticorps monoclonaux et polyclonaux.

Anticorps monoclonaux : Les anticorps monoclonaux sont des anticorps extrêmement spécifiques. En laboratoire, ils sont produits à partir de clones d'une cellule appelée hyybridome. C'est pourquoi ils s'appellent "monoclonaux" : chaque anticorps produit par cette cellule est exactement identique.

Les cellules hybridomes sont créées par la fusion de deux cellules, une cellule productrice d'anticorps (lymphocyte B) obtenue à partir d'une souris de laboratoire et une cellule tumorale appelée cellule myélomateuse. Les cellules tumorales confèrent à l'hybridome leur propriété de se multiplier plus rapidement que les cellules normales du corps productrices d'anticorps. Ainsi après sélection et multiplication dans un milieu de culture approprié, ces cellules hybridomes produisent des anticorps monoclonaux, très purs et en quantités importante.

Anticorps polyclonaux : Les anticorps polyclonaux sont un mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné. Au cours de la réponse immunitaire, un organisme synthétise des anticorps dirigés contre plusieurs épitopes d'un antigène : la réponse est dite polyclonale.

3.3.2 L'antigène

Un antigène est une macromolécule naturelle ou synthétique reconnue par des anticorps ou des cellules du système immunitaire et capable d'engendrer une réponse immunitaire. Les antigènes sont généralement des protéines, des polysaccharides et leurs dérivés lipidiques.

Les antigènes, en tant que marqueurs des agents étrangers à l'organisme, sont à la base de la réponse immunitaire. C'est la reconnaissance de l'antigène par les cellules immunocompétentes, directement ou via les cellules présentatrices d'antigène (CPA), qui active le système immunitaire.

Dans le cas d'antigènes protéiques, on nomme épitope ou déterminant antigénique la partie de l'antigène reconnue par un anticorps ou un récepteur lymphocytaire. Un même antigène peut comporter plusieurs épitopes (identiques ou différents) et ainsi induire une réponse immunitaire variée. Il existe des épitopes séquentiels, correspondant à une séquence d'acides aminés, et des épitopes conformationnels, liés à la structure de la protéine et donc sensibles à la dénaturation. La reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes dépend de la nature de l'épitope.

Il existe plusieurs méthodes pour accrocher les anticorps comme biorécepteur sur la surface du capteur. Les deux méthodes les plus utilisées étant la chimisorption et l'accrochage par des liaisons covalentes. Nous détaillerons dans le chapitre suivant le greffage des anticorps sur la surface du capteur en utilisant différents agents de liaison.

3.4 Préparation de la surface et greffage de la couche sensible d'anticorps

3.4.1 Protocole de test permettant de s'affranchir de la dépendance au volume de liquide

L'épaisseur de liquide au dessus de la surface du capteur influe sur la fréquence du capteur. En effet les modèles théoriques, en particulier celui développé lors de la thèse de Pierre Mazein, nécessitent que l'épaisseur de liquide au dessus des transducteurs soit semi-infinie. Une épaisseur semi-infinie n'est physiquement pas réalisable, mais on peut considérer qu'à partir d'une certaine épaisseur de liquide le comportement du capteur est identique à celui de la théorie. Nous devons donc déterminer expérimentalement le volume (donc l'épaisseur si on connaît la surface de contact) minimum d'eau à partir duquel l'onde n'est plus modifiée.

3.4 Préparation de la surface et greffage de la couche sensible . . . 89

Nous avons obtenu un volume compris entre 300 et 400 mm³ (ou µl) pour une surface de contact de 121 mm², soit une épaisseur comprise entre 2,5 mm et 3,3 mm. Nous avons donc décidé de toujours utiliser au minimum 400 mm³ de liquide au dessus du capteur. Ainsi lorsque nous désirons obtenir sur le capteur une solution d'anticorps avec une concentration souhaitée, il suffit de rajouter 100 mm³ de solution contenant les anticorps à une concentration 5 fois plus élevée que celle désirée au volume de 400 mm³ de liquide (PBS ou eau) déjà présent. Par la suite, les concentrations des solutions annoncées seront données en "équivalent sur le capteur" (après ajout dans le liquide de référence).

Cette méthode évite que les variations de fréquence observées soient dues à une modification du volume de liquide au dessus du capteur (obligatoire lors d'un changement de solution).

3.4.2 Nettoyage de la surface

Afin de s'assurer d'un bon greffage de la couche sensible sur le capteur, nous devons procéder à un nettoyage de sa surface. Le protocole de nettoyage a évolué, et est différent en fonction de l'agent de liaison utilisé (cf. paragraphe 3.4.3). Nous différencierons donc le protocole de nettoyage utilisé lors de l'utilisation de la Protéine G et du DTSP de celui utilisé pour le greffage du GPTS.

En ce qui concerne la Protéine G et le DTSP, nous utilisons au début le protocole issu des travaux précédents [Tam02]. Celui-ci consiste en un nettoyage à l'acide sulfurique (H₂SO₄) pendant 10 minutes, suivi de 3 rinçages à l'eau de 10 minutes, puis de 2 bains successifs d'acétone et d'éthanol de 10 minutes chacun. Pour finir, 3 bains de PBS(Phosphate Buffer Saline) pH 7.2 permettent de rincer de nouveau et de préparer la ligne de base du capteur.

Dans le cadre du greffage du GPTS sur le capteur, le Laboratoire ISM (Institut des Sciences Moléculaires - UMR 5255 CNRS) a mis au point un protocole de nettoyage des capteurs plus adapté afin d'éviter l'utilisation de l'acide sulfurique qui risque de détériorer la couche guidante de silice. Celui-ci consiste à rincer le capteur avec des solvants, puis à le plonger dans une solution de chloroforme dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes avant de le mettre à l'UV/O₃ pendant 30 minutes par face.

3.4.3 Les agents de couplage

Un agent de couplage chimique permet de créer une liaison stable entre la surface du capteur en SiO₂ et la couche sensible d'anticorps. Nous avons

comparé plusieurs agents de couplage afin de déterminer celui qui offre les meilleures performances en termes d'uniformité et de reproductibilité du dépôt de la couche sensible. Pour cela nous avons testé le DTSP, la Protéine G et le GPTS.

3.4.3.1 Le DTSP

Le Dithio-bis(propionic acid N-hydroxysuccinimide ester) (DTSP), représenté en figure 3.2, est un agent de couplage chimique généralement utilisé sur des surfaces d'or. Cette molécule symétrique se scinde en deux au niveau de la liaison disulfide et crée des liaisons par chimisorption entre le soufre et l'or. Puis les groupements amines (NH_2 ou S), d'une protéine par exemple, réagissent avec cette molécule de liaison afin de créer une liaison covalente. En fin de réaction il reste notamment le groupement hydroxy-succinimide, présenté en figure 3.3. Cet agent de couplage a déjà été utilisé pour accrocher une enzyme (HorseRaddish Peroxidase) sur une surface d'or [Dar99], ainsi que dans la thèse d'Ollivier Tamarin [Tam02] comme agent de liaison entre la surface de SiO_2 du capteur à ondes de Love et les anticorps.

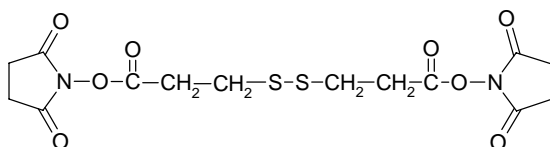


FIG. 3.2: DTSP

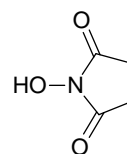

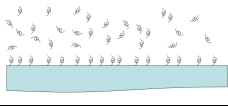
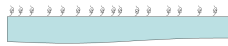
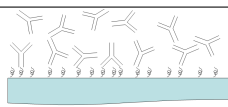
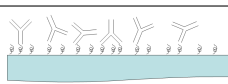
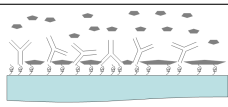
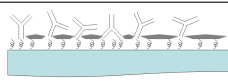


FIG. 3.3: *groupement hydroxy-succinimide*

Le capteur est préalablement rincé à l'eau distillé et dégraissé et nettoyé par des lavages successifs à l'acétone et à l'éthanol 95% comme décrit précédemment. Le protocole d'accrochage de l'anticorps à la surface du capteur utilisant cet agent chimique est décrit dans le tableau 3.1. Après rinçage de la surface avec un tampon salin (PBS), l'intermédiaire de fixation DTSP est déposé sur le capteur afin de promouvoir l'immobilisation de la couche sensible. Pour cela, la surface est incubée pendant 45 minutes avec 500 μl d'une solution de DTSP à 0,2% en milieu organique de DMSO (dimethyl sulfoxide). Après plusieurs rinçages au PBS, la surface est incubée pendant 3 heures avec une solution d'anticorps monoclonal (ici des anticorps anti-M13 à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans du PBS pour la figure 3.4). Les sites de liaison non spécifiques sont ensuite saturés pendant 45 minutes avec une solution de BSA (Bovine Serum Albumin) à 0,1%. Le système est finalement rincé au PBS avant mise en contact avec l'espèce cible.

3.4 Préparation de la surface et greffage de la couche sensible . . . 91

TAB. 3.1: *Protocole de greffage des anticorps à la surface du capteur avec le DTSP comme agent de couplage.*

Désignation	Quantité	Temps	Schéma
Rinçage au PBS	3 x 500 μ L	10 min.	
DTSP	1 x 500 μ L	45 min.	
Rinçage au PBS	3 x 500 μ L	10 min.	
Anticorps	1 x 500 μ L	2 heures.	
Rinçage au PBS	3 x 500 μ L	10 min.	
Agent saturant (BSA)	1 x 500 μ L	45 min.	
Rinçage au PBS	3 x 500 μ L	10 min.	

La figure 3.4 représente les variations de fréquence d'un capteur à onde de Love, fonctionnalisé avec le DTSP, après l'introduction d'anticorps anti-M13 à 50 μ g/ml. On observe une variation finale de fréquence moyenne de l'ordre de 28 kHz, mais avec un écart type qui s'élève à \pm 10 kHz. Cette énorme dispersion des résultats ne nous permet pas de garder cet agent de liaison pour accrocher la couche sensible d'anticorps, car son greffage n'est pas reproductible. Une même quantité d'anticorps introduit à la surface du capteur peut entraîner une variation de fréquence allant du simple au triple rendant difficile, voire impossible, toute appréciation de la qualité de la couche sensible obtenue. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le DTSP est censé créer des liaisons, et s'accrocher, sur une surface d'or. Or la surface du capteur est en silice et cela empêche la molécule de se lier fortement à la surface du capteur ; de simples liaisons électrostatiques faibles interviennent dans cette configuration n'assurant donc pas une uniformité et une reproductibilité de ce film de DTSP.

Il s'est donc avéré nécessaire de rechercher d'autres agents de liaison qui permettraient d'améliorer l'uniformité et la reproductibilité de la couche sensible d'anticorps en augmentant la force des liaisons avec la surface, voire d'orienter les anticorps pour optimiser l'interaction future avec l'antigène.

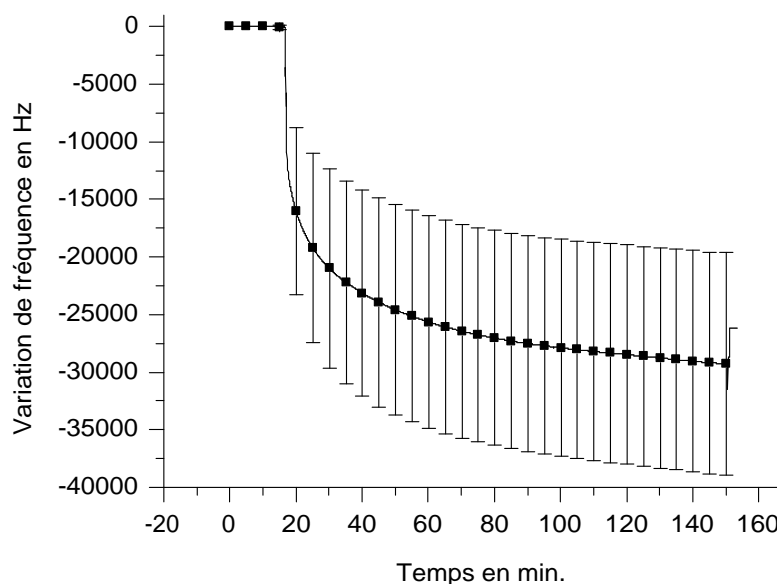


FIG. 3.4: Réponse moyenne avec écart type des capteurs à ondes de Love suite à l'insertion de $50 \mu\text{g/ml}$ d'anticorps anti-M13 en utilisant le DTSP comme agent de liaison. Dispositifs utilisés : Quartz coupe AT, $\lambda = 40 \mu\text{m}$, épaisseur $\text{SiO}_2 = 3,9 \mu\text{m}$. Acquisition : 1 mesure toutes les 5 secondes.


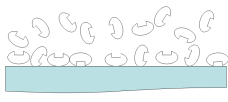

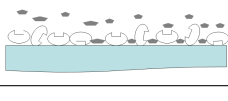

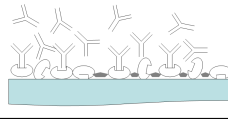

3.4.3.2 La Protéine G

La protéine G (nom d'une abréviation de l'anglais guanine nucleotide binding proteins) est une molécule de nature protéique qui permet le transfert d'informations à l'intérieur d'une cellule biologique. La protéine G ($\approx 40 \text{ kDa}$), représentée en figure 3.5, est une protéine d'origine bactérienne qui possède la propriété de lier les anticorps (Ig type G) par l'intermédiaire de son fragment cristallisable Fc (cf. figure 3.1), et ce avec une forte affinité. Les liaisons générées sont faibles mais nombreuses, ce qui donne au complexe formé une grande stabilité. L'utilisation de la protéine G comme agent de liaison avec la surface du capteur présente par ailleurs l'intérêt de donner à la couche sensible une orientation favorable à l'interaction avec l'antigène.

Le protocole de greffage des anticorps à la surface du capteur avec la Protéine G est très proche de celui utilisé avec le DTSP. La principale différence réside en la saturation de la surface avec de la BSA avant l'introduction des anticorps afin d'éviter un simple dépôt des anticorps sur la surface du capteur comme décrit dans le tableau 3.2.

3.4 Préparation de la surface et greffage de la couche sensible . . . 93

TAB. 3.2: *Protocole de greffage des anticorps à la surface du capteur avec la Protéine G comme agent de couplage.*

Désignation	Quantité	Temps	Schéma
Rinçage au PBS	3 x 500 μ L	10 min.	
Protéine G	1 x 500 μ L	45 min.	
Rinçage au PBS	3 x 500 μ L	10 min.	
Agent saturant (BSA)	1 x 500 μ L	2 heures.	
Rinçage au PBS	3 x 500 μ L	10 min.	
Anticorps	1 x 500 μ L	45 min.	
Rinçage au PBS	3 x 500 μ L	10 min.	

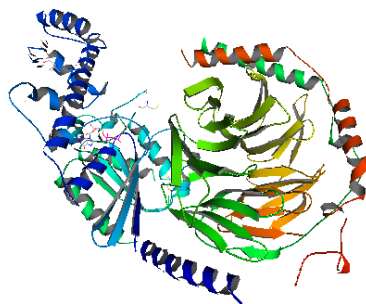


FIG. 3.5: *Protéine G*

Un exemple de réponse fréquentielle du capteur à ondes de Love suite à l'accrochage de la Protéine G en surface est représenté en figure 3.6. On observe que la variation de fréquence suite à l'introduction de la Protéine G à la surface du capteur est très faible, de l'ordre de 4 kHz. Cela montre un faible taux de recouvrement de la surface de silice par la protéine, comme le confirme immunologiquement des tests de type ELISA. Cette observation est en cohérence avec la forte variation de fréquence observée ensuite (12 kHz soit 3 fois plus que pour la Protéine G) lors de la saturation avec la BSA qui occupe les sites restés libres en surface. De ce fait, peu d'anticorps peuvent se greffer sur le capteur, et la variation de fréquence suite à leur introduction est d'environ 3 kHz seulement. Même si la Protéine G a l'avantage d'orienter les anticorps de façon à rendre optimum la liaison avec l'antigène, sa propre non-orientation et son faible pouvoir d'accrochage ne permettent pas d'obtenir une couche sensible dense et suffisamment stable pour conférer au capteur une réponse forte et reproductible.

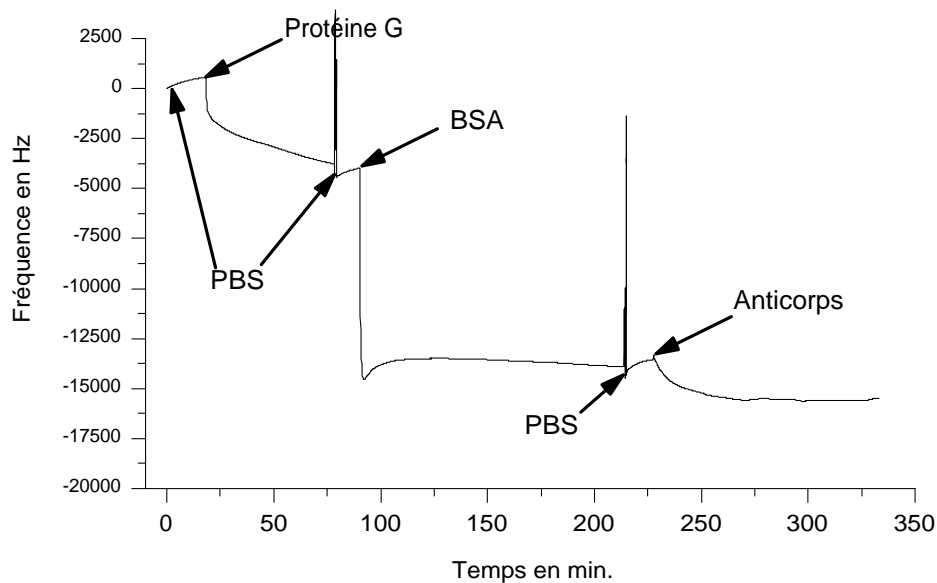


FIG. 3.6: Réponse typique d'un capteur à ondes de Love suite à l'insertion de Protéine G à 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de BSA à 0,1%, puis de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'anticorps anti-bactériophage M13. Dispositifs utilisés : Quartz coupe AT, $\lambda = 40 \mu\text{m}$, épaisseur $\text{SiO}_2 = 3,9 \mu\text{m}$. Acquisition : 1 mesure toutes les 5 secondes.

3.4.3.3 Le GPTS

Suite aux résultats obtenus avec le DTSP et la Protéine G, il est apparu nécessaire d'améliorer le greffage des anticorps à la surface du capteur afin d'obtenir une liaison plus forte et plus dense. Un bras chimique assurant des liaisons covalentes, d'une part avec la surface de SiO_2 du capteur, d'autre part avec l'anticorps, a ainsi été recherché. En effet, en chimie, une liaison covalente est une liaison chimique très forte dans laquelle chacun des atomes liés met en commun un ou plusieurs électrons de ses couches externes. C'est ce qui produit l'attraction mutuelle entre atomes. La liaison covalente implique généralement le partage équitable d'une seule paire d'électrons appelé doublet liant : chaque atome fournit un électron, la paire d'électrons est délocalisée entre les deux atomes.

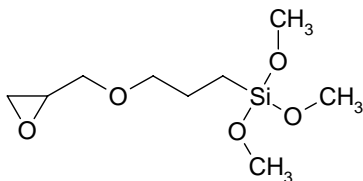


FIG. 3.7: GPTS

Le (3-Glycidyloxypropyl)triméthoxysilane (GPTS), représenté en figure 3.7, est un agent de couplage chimique pour surface siliciée. Il se compose de deux parties distinctes séparées par une chaîne carbonée composée de 5 atomes de carbone et 1 atome d'oxygène. Le GPTS crée des liaisons covalentes sur un substrat de SiO_2 par une réaction entre les groupements silanol de la surface et les groupements alcoxysilane hydrolysés du GPTS [Tsu99]. L'autre partie de la molécule est composée d'un groupement époxy qui réagit avec des groupements amines qui composent essentiellement les protéines et donc les anticorps [Kus03]. Le principe idéal de greffage des anticorps sur le SiO_2 par l'intermédiaire du GPTS est représenté en figure 3.8.

Sur la figure 3.9 est représentée une réponse en temps réel typique du capteur suite à l'introduction de $50 \mu\text{g/ml}$ d'anticorps monoclonal anti-*E. coli* sur un capteur à onde de Love fonctionnalisé au GPTS. La variation de fréquence en régime permanent est proche de 28 kHz. Nous pouvons observer ensuite une variation de fréquence de moins de 2 kHz suite à l'introduction de la BSA qui joue le rôle d'agent saturant, ce qui indique un bon taux de recouvrement des anticorps à la surface du capteur, contrairement aux résultats obtenus avec la protéine G. Ces bons résultats ont été confirmés par des essais immunologiques de type ELISA. Cependant, les anticorps se greffent par des liaisons covalentes sur la partie époxy du GPTS par un

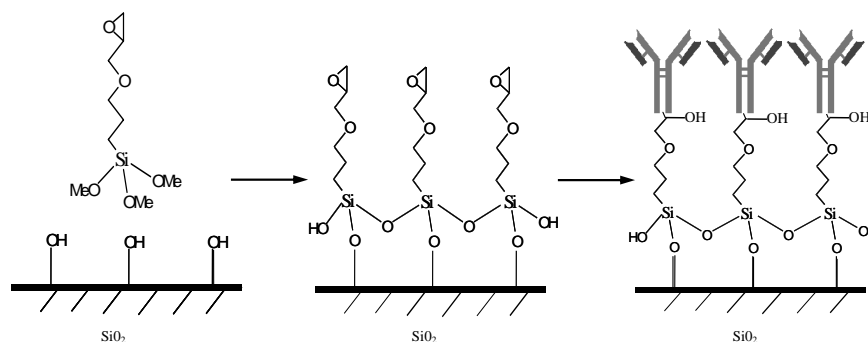


FIG. 3.8: Principe idéal simplifié de greffage des anticorps sur le SiO_2 par l'intermédiaire du GPTS

groupement amine qui peut se situer aussi bien sur le fragment cristallisable (Fc) que sur le site spécifique de reconnaissance de l'antigène. De ce fait le GPTS ne permet pas d'orienter l'anticorps. Ce phénomène n'est peut être pas d'une grande importance pour la détection ultérieure d'organismes de grande taille comme les bactéries (facteur d'échelle supérieur à 100), à condition que l'affinité entre l'espèce cible et les anticorps bien orientés en surface soit suffisante. Par contre, cela peut s'avérer un facteur limitant la sensibilité du capteur pour l'immobilisation d'espèces plus petites telles que des protéines ou des toxines.

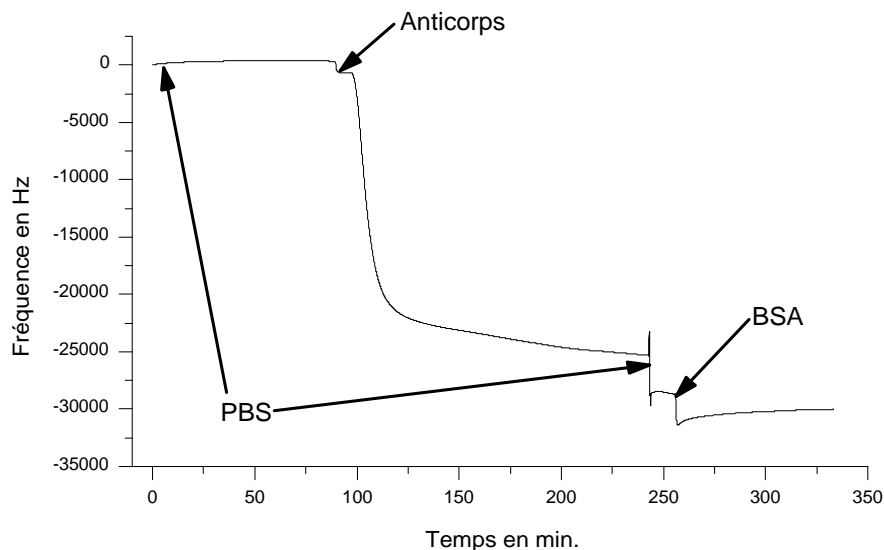


FIG. 3.9: Réponse typique d'un capteur à ondes de Love suite à l'insertion de $50 \mu\text{g/ml}$ d'anticorps anti-bactériophage M13, puis de BSA à 0,1%.

3.4 Préparation de la surface et greffage de la couche sensible . . . 97

La figure 3.10 met en évidence la bonne reproductibilité du greffage des Ac obtenue grâce à l'utilisation du GPTS. En effet, elle représente la réponse typique d'un capteur à onde de Love fonctionnalisé au GPTS suite à l'introduction d'une solution de 40 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps anti-*E. Coli* : on observe une variation de fréquence finale de l'ordre de 30 kHz avec un écart type de ± 2 kHz. Le GPTS comme agent de liaison entre la surface de silice du capteur et la couche sensible d'anticorps améliore ainsi fortement la reproductibilité, comparé au DTSP (cf. figure 3.4). Cela s'explique par la nature de la liaison qui dans ce cas est covalente et doit donc améliorer l'accrochage, l'uniformité et la densité de la couche sensible.

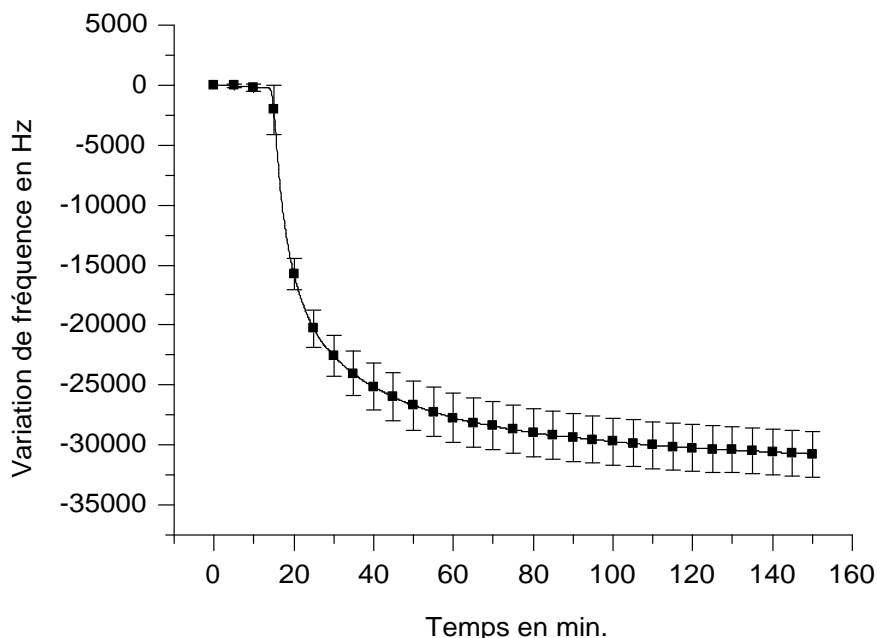


FIG. 3.10: Réponse moyenne avec écart type des capteurs à ondes de Love suite à l'insertion de 50 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps GAM-PO en utilisant le GPTS comme agent de liaison.

Il est possible de réutiliser un capteur qui a déjà servi en le régénérant. Cette étape consiste à "enlever" les éléments organiques du capteur (anticorps, bactéries, agent de liaison) afin de retrouver la surface de silice nue. Nous utilisons donc le même protocole servant au nettoyage lorsque le GTPS est utilisé comme agent de liaison. Celui-ci consiste à rincer le capteur avec des solvants (acétone, éthanol), puis de le plonger dans une solution de chloroforme dans un bain à ultrason pendant 10 minutes avant de le mettre 30 minutes à l'UV/O₃.

3.5 Validation par imagerie de surface et influence de la nature de l'anticorps

3.5.1 Influence de la nature de l'anticorps

Lors des premières expériences de greffage de la couche sensible à la surface du capteur, nous nous sommes rendus compte que la variation de fréquence observée lors du greffage de la couche sensible d'anticorps et donc la quantité d'anticorps greffés, dépendait du type d'anticorps, ou plus précisément du fait qu'ils soient couplés ou non à une protéine. Nous avons ainsi comparé :

- des anticorps de chèvre anti-souris (GAM pour Goat Anti Mouse en anglais),
- des anticorps GAM-PO de type GAM couplés à la peroxydase (Horse-radish peroxidase), enzyme (ou glycoprotéine) utilisée avec un chromogène pour la révélation au cours de tests immunoenzymatiques comme l'ELISA,
- et des anticorps GAM-FITC (pour Fluorescéine Iso Thio Cyanate) de type GAM couplés à une molécule fluorescente, la fluorescéine.

La figure 3.11 représente les variations de fréquence en temps réel superposées, au cours du greffage de ces différents anticorps à la surface du capteur. Nous observons une stabilisation des signaux autour de 6 kHz, 10 kHz et 35 kHz pour respectivement 50 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps GAM, 40 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps GAM-FITC et 40 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps GAM-PO.

Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres anticorps comme des IgG de souris qui ont donné une variation de fréquence de l'ordre de 6 kHz, et une variation de l'ordre de 25 kHz pour d'autres anticorps couplés à la peroxydase. Une partie de cette forte variation de fréquence peut être attribuée au poids moléculaire de la peroxydase, qui s'élève à 44 kDa, soit un peu moins d'un tiers d'un anticorps (environ 150 kDa). En comparaison le poids moléculaire du FITC est de 389 g/mol (sachant que 1 g/mol est équivalent à 1 Da).

Mais l'effet de masse supplémentaire induit par ces 2 molécules peroxydase et FITC, ne peut expliquer à lui seul la variation de fréquence observée, dans la mesure où l'on peut s'attendre à un effet de proportionnalité entre la variation de fréquence du capteur à ondes de Love et la masse ajoutée à sa surface [Zim02a, Zim02b]. De ce fait, nous pouvons supposer que les molécules couplées à l'anticorps, et en particulier la peroxydase, permettent d'augmenter la quantité d'anticorps greffés sur le capteur en tant que couche

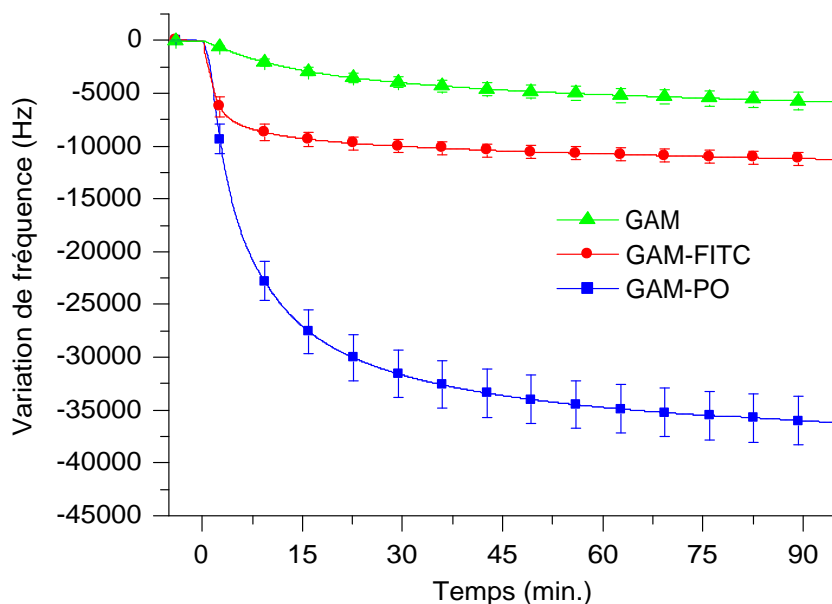


FIG. 3.11: Comparaison des réponses du capteur à ondes de Love suite au greffage sur le GPTS d'anticorps GAM couplés ou non à la peroxydase et à une molécule fluorescente. Dispositifs utilisés : Quartz coupe AT, $\lambda = 40 \mu\text{m}$, épaisseur $\text{SiO}_2 = 3,9 \mu\text{m}$. Acquisition : 1 mesure toutes les 5 secondes.

sensible, donc leur densité. Une des hypothèses qui permettrait d'expliquer ces observations est que les groupements amines de la peroxydase doivent être plus facilement accessibles et de ce fait permettraient d'augmenter la probabilité de greffage avec le GPTS.

3.5.2 Validation par immunofluorescence

La fluorescence exploite la capacité qu'ont certaines molécules d'émettre de la lumière à une certaine longueur d'onde quand on les éclaire avec une lumière de longueur d'onde différente. Les colorants fluorescents en rouge les plus connus sont des dérivés de la rhodamine comme le TRITC (Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate).

Nous avons utilisé la microscopie par fluorescence afin de déterminer le recouvrement de surface du capteur par des anticorps. Les paramètres de densité et d'homogénéité de recouvrement nous permettent de comparer différentes méthodes de greffage des anticorps, ou différents agents de couplage. Pour cela nous avons utilisé le TRITC comme molécule fluorescente qui absorbe les radiations vertes (max 541nm) et restitue une fluorescence rouge (max 572nm). Cette molécule a été utilisée avec un anticorps de lapin anti-

chèvre (RAG-TRITC), qui reconnaît une IgG de chèvre (le GAM greffé sur le capteur) comme antigène. Le protocole utilisé est présenté en figure 3.12.

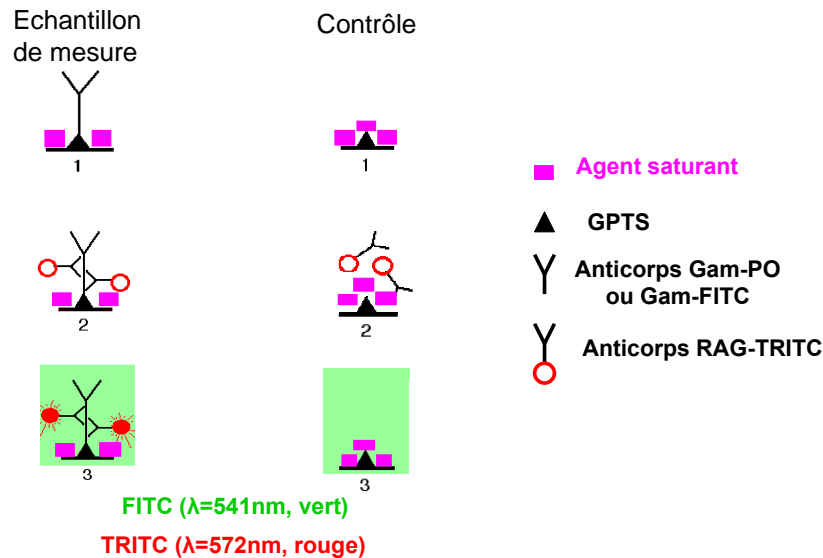


FIG. 3.12: Protocole utilisé utilisée en microscopie par immunofluorescence

Pour toutes les expériences effectuées, la concentration finale d'anticorps fluorescents RAG-TRITC est de $20 \mu\text{g/ml}$. Afin de préparer l'analyse par fluorescence et après une incubation à 37°C pendant 2 heures, la surface du capteur est rincée avec du PBS dans le but d'enlever les anticorps fluorescents non accrochés sur la couche sensible.

Un contrôle négatif a été réalisé en utilisant un agent de blocage (SBBB) directement sur la surface afin de la saturer, avant l'incubation avec les anticorps fluorescents.

Les mesures par microscopie à épifluorescence ont été réalisées à la Plateforme d'Imagerie Cellulaire de l'Institut des Neurosciences (PICIN) de l'Université Bordeaux 2. Le microscope utilisé est un Leica DMR, avec une lampe au mercure (103 W). Les filtres d'émission (BP555/28) et de sortie (617/73) de lumière du microscope ont été utilisés et sont conçus pour exciter et détecter la Rhodamine aux longueurs d'ondes appropriées. Les images ont été obtenues à l'aide d'une caméra CCD à amplificateur de photons (modèle coolsnap HQ, Roper Scientific) reliée à un ordinateur.

La figure 3.13 de gauche montre une image par épifluorescence préparée de la façon suivante : anticorps GAM-PO, saturation au SBBB puis anticorps fluorescents RAG-TRITC sur un capteur fonctionnalisé au GPTS. Nous pouvons observer une répartition homogène de la fluorescence à la sur-

face avec quelques points plus brillants, ce qui correspond à quelques agrégats d'anticorps fluorescents. La présence des anticorps fluorescents montre indirectement la présence d'anticorps GAM-PO sur la surface du capteur. La figure 3.13 de droite est une représentation en 3D de cette image et montre clairement une intensité de fluorescence homogène des pics de luminosité avec une dispersion régulière sur la surface considérée. Ces résultats permettent de conclure qu'un film d'anticorps GAM-PO a été greffé de manière homogène sur la surface du capteur.

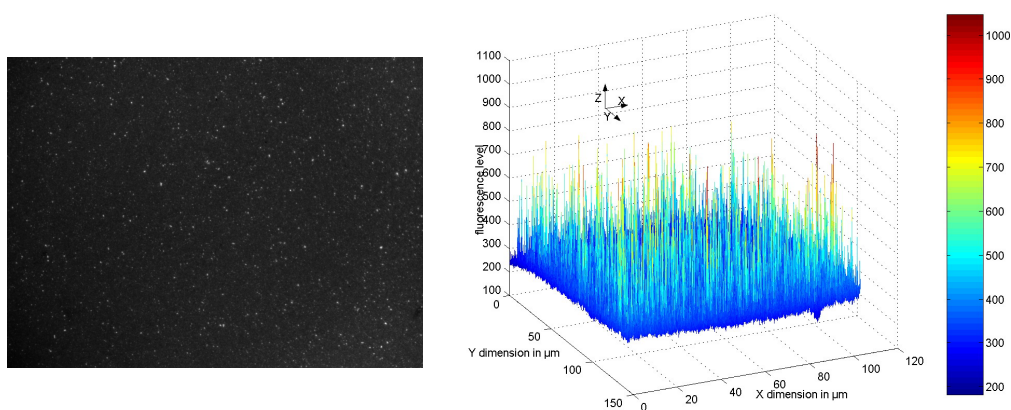


FIG. 3.13: Image par fluorescence d'un capteur à ondes de Love recouvert de GAM-PO puis de RAG-TRITC à gauche et sa représentation 3D à droite.

La figure 3.14 est une projection sur les axes X et Z de la représentation 3D de l'expérience précédente et d'un contrôle négatif (surface GPTS + SBBB (agent de saturation) + RAG-TRITC) réalisé dans les mêmes conditions.

Sur cette figure, nous retrouvons les nombreux pics de luminosité (niveaux relatifs de fluorescence entre 300 et 1000) sur le capteur fonctionnalisé avec les anticorps GAM-PO. De plus, il apparaît clairement ici que le niveau de fluorescence est toujours largement supérieur (minimum 230 sur la quasi totalité de la surface) à celui du contrôle négatif. En effet, ce contrôle négatif montre un faible niveau de fluorescence (environ 130, proche de celui du bruit de fond) indiquant un greffage non spécifique faible.

La même étude que celle décrite sur la figure 3.14a a été réalisée en remplaçant le GAM-PO par le GAM-FITC. Les images obtenues (non présentées) montrent un niveau de fluorescence faible indiquant un taux de recouvrement du GAM-FITC sur la surface de SiO_2 du capteur faible par rapport au GAM-PO, en totale cohérence avec les résultats obtenus en temps réel avec les capteurs à ondes de Love (cf. figure 3.11).

En conclusion, cette méthode est un bon outil de caractérisation qualitative de la bio-fonctionnalisation de la surface des capteurs. Cela nous a permis de vérifier que nous obtenons un taux de recouvrement de la surface du capteur meilleur et plus homogène lorsque les anticorps greffés au GPTS sont couplés à la peroxydase.

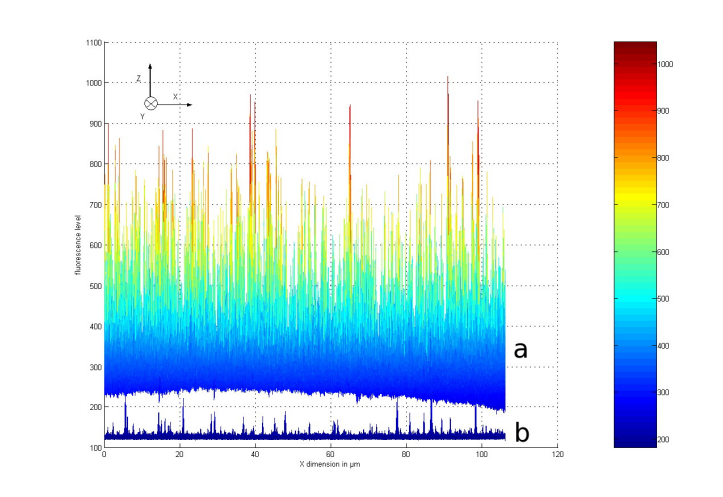


FIG. 3.14: *Vue de côté des représentations 3D de la fluorescence sur deux capteurs : a) traitement GPTS + anticorps GAM-PO + saturant SBBB + anticorps RAG-TRITC b) contrôle négatif : traitement GPTS + saturant SBBB + anticorps RAG-TRITC.*

Nous évaluerons au chapitre 4 l'importance de ces observations ainsi que les performances des immunocapteurs à ondes de Love ainsi fonctionnalisés au GPTS et aux anticorps GAM-PO, notamment lors de la détection de bactéries vivantes.

3.6 Conclusion

Du choix du biorécepteur va dépendre la sélectivité du dispositif, mais aussi en partie sa sensibilité et sa facilité d'utilisation. L'affinité antigénique, entre un anticorps et un antigène, en plus des avantages cités précédemment, a la particularité d'offrir une large gamme quant au choix de l'espèce cible.

L'interface entre ce biorécepteur et le capteur est tout aussi important. De cela va dépendre la réponse des capteurs tant au niveau de leurs amplitudes que de leur reproductibilité. Nous avons vu que l'accrochage de la couche sensible d'anticorps par chimisorption (DTSP, Protéine G), bien que

simple à mettre en œuvre, n'offre pas de bonnes performances (reproductibilité, amplitude des réponses). Par contre, un greffage covalent entre la couche guidante de silice du capteur à ondes de Love et l'anticorps, grâce aux molécules siliciées avec une terminaison époxy (GPTS) développées par l'ISM, permet de pallier ces problèmes. Cet agent de liaison nous permet d'obtenir une couche sensible plus uniforme et plus dense qu'avec le DTSP ou la Protéine G.

Cependant, en fonction de la nature de l'anticorps (s'il est couplé ou non avec une protéine par exemple), la réponse du capteur est plus ou moins importante. Nous avons noté que l'utilisation d'un anticorps de type GAM-PO offre des amplitudes de réponse plus importantes qu'un même anticorps non marqué à la peroxydase. Le poids de cette protéine permettrait d'expliquer en partie cette augmentation du signal, mais pas entièrement. Des expériences en fluorescence ont montré qu'à concentration égale ou légèrement inférieure les anticorps de type GAM marqués à la peroxydase étaient présents en quantité plus importante à la surface du capteur à ondes de Love fonctionnalisé au GPTS.

Grâce à l'utilisation du GPTS comme agent de liaison, la couche sensible d'anticorps est plus uniforme et plus dense, préparant ainsi le capteur à ondes de Love à la détection des espèces cibles recherchées. Dans la mesure du possible, un anticorps marqué à la peroxydase sera donc utilisé comme couche sensible.

Chapitre 4

Application à la détection d'espèces cibles

4.1 Présentation des espèces cibles

Le biocapteur à ondes de Love développé est un capteur gravimétrique comme la plupart des capteurs à ondes acoustiques. Cela lui confère un caractère générique car la même plateforme, composée du capteur et de sa cellule de mesure, peut être utilisée aussi bien pour des détections en milieu gazeux qu'en milieu liquide. Dans ce dernier cas, c'est la couche sensible d'anticorps qui va déterminer les espèces biologiques cibles susceptibles d'être détectées.

Or les anticorps sont capables de reconnaître des espèces différentes allant de la "simple" toxine de quelques nanomètres, aux bactéries de plusieurs micromètres de long. La plateforme générique que constitue le capteur à ondes de Love doit donc permettre de détecter, dans les limites de ses performances, tout type d'espèces cibles biologiques : toxines, protéines, virus et même bactéries, possédant des formes et des tailles différentes (cf. tableau 4.1).

Dans ce chapitre, nous étudierons les réponses du capteur à ondes de Love en utilisant des modèles biologiques pour ces différents éléments qui seront présentés dans les paragraphes à venir.

4.1.1 Les protéines, les toxines (de petites tailles)

Une toxine est un poison produit par les activités métaboliques de certains être vivants, et plus particulièrement des bactéries. Certains animaux, ainsi que certaines plantes sont aussi capables d'en produire. Certaines bactéries sécrètent des toxines dans les tissus qu'elles colonisent : ce sont les toxines vraies. D'autres bactéries conservent en elles-mêmes la plus grande partie

TAB. 4.1: Poids moléculaire et taille estimée de différents types d'espèces cibles potentielles

Agent	Taille estimée	Poids moléculaire
Toxine tétanique	< 10 nm	180 000 Da
Toxine Botulique	< 10 nm	150 000 Da
Venins de vipère ou de scorpion	< 10 nm	100 000 Da
Toxine T-2	< 10 nm	466 g/mol
Anticorps	< 10 nm	150 000 Da ou $250 \cdot 10^{-6}$ fg
Peroxydase	< 10 nm	44 000 Da
BSA	< 10 nm	66 430 Da
Bactériophage M13	10 nm de large sur 800 nm de long	3 fg
Virus de la grippe	entre 80 et 120 nm de diamètre	$250 \cdot 10^6$ Da ou 0,4 fg
Bactérie Mycoplasmes	$\approx 0,3 \mu\text{m}$	ND
Bactérie <i>Epulopiscium fishelsoni</i>	$\approx 500 \mu\text{m}$	ND
Bactérie <i>E. coli</i>	1 à 3 μm de long pour 0.6 μm de large	0,7 pg
Bactérie <i>Pseudomonas</i>	1 à 3 μm de long pour 0.6 μm de large	0,7 pg

ND = données non disponibles

des composés toxiques, qui ne sont libérés que lors de la lyse cellulaire, sous l'action de moyens chimiques, physiques ou mécaniques. Parmi les toxines les plus importantes qui affectent l'Homme, on trouve celles du botulisme, de la dysenterie, du tétanos et de la diphtérie. En raison de leur grande sensibilité aux facteurs chimiques et physiques, tels que la lumière ou la chaleur, les toxines sont difficiles à isoler et les connaissances que nous en avons ont été obtenues par l'observation des lésions et des symptômes qu'elles provoquent lorsqu'elles sont injectées à des animaux.

Une protéine, parfois appelée protide, est une macromolécule composée par une chaîne (ou séquence) d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient plus de 100 acides aminés. La fonction des protéines est conférée par leur structure tridimensionnelle, c'est-à-dire la manière dont les acides aminés sont agen-

cés les uns par rapport aux autres dans l'espace. Les anticorps, en sont un exemple, et leur nombre est estimé à plusieurs milliards d'immunoglobulines différentes.

La plupart des toxines et des protéines font moins de 10 nm. Afin de simuler la détection de protéines avec le capteur à ondes de Love, un anticorps de souris (cf. tableau 4.1 et Annexe C.1) a été choisi comme modèle.

4.1.2 Les bactériophages ou virus (de moyennes tailles)

Un virus (figure 4.1) se caractérise par son incapacité à se reproduire par division et nécessite pour cela d'utiliser une cellule hôte : un virus est un parasite intracellulaire obligatoire. Il est composé d'une molécule d'acide nucléique (soit d'ADN soit d'ARN, simple ou double brin) entourée d'une coque de protéines appelée la capside et parfois d'une enveloppe. Il ne possède aucune enzyme pouvant produire de l'énergie. Les virus sont le plus souvent de petite taille (comparée à celle d'une bactérie par exemple), en règle générale inférieure à 250 nanomètres.

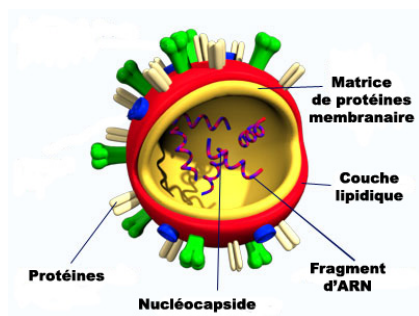


FIG. 4.1: *Virus de la grippe aviaire H5N1 [vir]*

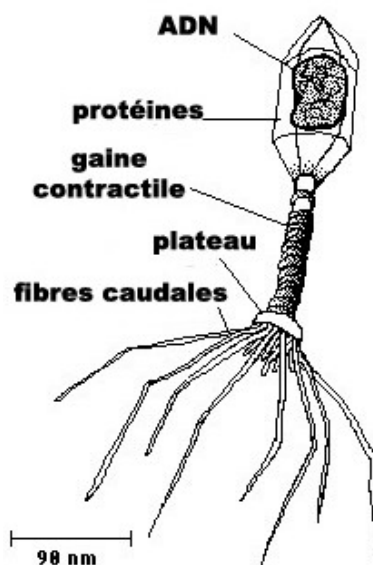


FIG. 4.2: *bactériophage T4 [bac]*

Pour servir de modèle, nous avons choisi de conserver le bactériophage M13, déjà utilisé lors des travaux de thèse d'Ollivier Tamarin [Tam02], car ce bactériophage est bien connu et facilement disponible. Un bactériophage (ou

phage) (cf. figure 4.2) est un virus n'infectant que des bactéries. En grec, phageon signifie "manger", on les appelle également virus bactériens. Le phage M13 est un bactériophage filamenteux à ADN simple brin de 6400 bases qui infecte les souches d'*E. Coli* en pénétrant par le pilus sexuel, et contient une protéine de surface PIII. Cette protéine PIII (généralement 5 copies par particule phagique) est responsable de l'attachement du bactériophage sur le pilus F de bactéries *E. coli* mâles.

4.1.3 Les bactéries (de grandes tailles)

Les bactéries (Bacteria) sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes, caractérisés par une absence de noyau et d'organites¹. Les bactéries présentent une grande diversité de tailles et de formes. Les cellules bactériennes typiques ont une taille comprise entre 0,5 et 5 μm de longueur. La plupart sont soit sphériques, les coques (cocci, du grec *kókkos*, grain), soit en forme de bâtonnet, les bacilles (baccili, du latin *baculus*, bâton) (cf. figure 4.3).

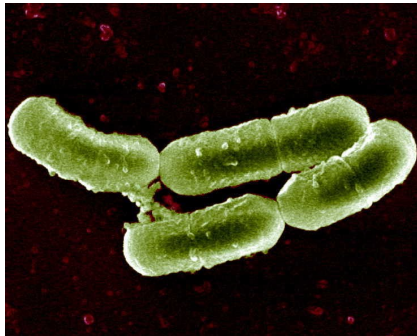


FIG. 4.3: *Lactobacillus sakei* en culture [INs]

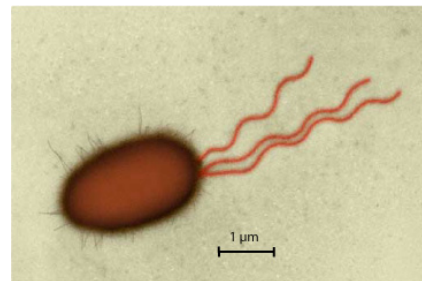


FIG. 4.4: *Escherichia coli* [Kun]

Escherichia coli (*E. coli*, figure 4.4) est un bacille gram négatif de la famille des entérobactéries. C'est un hôte commun de la flore intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Nous utiliserons cette bactérie, sous une forme non pathogène, pour valider la détection de bactéries à l'aide du capteur à ondes de Love.

¹En biologie cellulaire, le terme organite désigne différentes structures spécialisées contenues dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et délimitées par une membrane.

4.2 Optimisation de la couche sensible : Détermination de la concentration optimale d'anticorps à utiliser

Afin d'économiser le matériel biologique nécessaire au greffage de la couche sensible d'anticorps, nous avons voulu déterminer la concentration minimum d'anticorps assurant une saturation de la surface du capteur. Un simple calcul permet de déterminer qu'une quantité de $0,3 \mu\text{g}$ d'anticorps² suffirait à saturer la surface du capteur. Cependant ce calcul suppose un arrangement parfait des anticorps sur la surface du capteur, et ne prend en compte ni les imperfections de la couche de GPTS utilisé comme agent de liaison, ni le fait que seuls les anticorps se trouvant à proximité de la surface pourront se greffer, tandis qu'un grand nombre restera en solution. Une mesure pratique de ce seuil s'impose donc.

Des anticorps de type GAM-PO ont été utilisés au cours de cette étude comme couche sensible (donc greffés sur le capteur par l'intermédiaire du GPTS). Afin de simuler la détection d'une espèce cible, nous avons saturé la surface avec du SBBB (StartingBlock™ Blocking Buffer utilisé comme agent saturant), puis injecté une solution d'IgG de souris à une concentration supérieure à celle utilisée pour le greffage de la couche sensible, mais toujours supérieure à $20 \mu\text{g/ml}$.

Les réponses en fréquence du capteur pour le premier et le deuxième anticorps ont été comparées et sont présentées dans le tableau 4.2. Pour les fortes concentrations de GAM-PO la variation de fréquence du capteur en régime permanent est identique (environ -30 kHz 2 heures après l'injection), ce qui traduit un effet de saturation de la surface par un film d'anticorps. Ce seuil de saturation est atteint à partir d'une concentration de $20 \mu\text{g/ml}$. Pour les concentrations inférieures à ce seuil la variation de fréquence finale diminue jusqu'à devenir presque nulle pour des concentrations inférieures à $2 \mu\text{g/ml}$.

Les variations de fréquence dues à l'immobilisation des IgG de souris sur la couche sensible correspondent sensiblement aux variations de fréquence observées lors du greffage du premier anticorps sur le capteur. Le même phénomène de saturation est observé pour des concentrations de GAM-PO supérieures à $20 \mu\text{g/ml}$, avec une diminution de fréquence en régime permanent

²en prenant une surface de capteur de 121 mm^2 , une longueur et une largeur d'anticorps de 10 nm et un poids d'anticorps de $2,5 \cdot 10^{-19} \text{ g}$.

TAB. 4.2: Réponses des capteurs au greffage de GAM-PO et à l'immobilisation d'IgG de souris

Concentrations de GAM-PO	Variation moyenne de fréquence pour le GAM-PO*	Variation moyenne de fréquence pour l'IgG de souris**
50 µg/ml	-30 kHz	-5 kHz
40 µg/ml	-30 kHz	-5 kHz
20 µg/ml	-30 kHz	-5 kHz
10 µg/ml	-23 kHz	-3 kHz
7.5 µg/ml	-20 kHz	-2.5 kHz
5 µg/ml	-5 kHz	-0.6 kHz
2 µg /ml	-2.5 kHz	0 kHz

* 2 heures après injection

** 30 minutes après injection

(30 minutes après l'injection) de l'ordre de 5 kHz. Pour une concentration de GAM-PO de 2 µg/ml, la variation de fréquence due à l'IgG de souris est quasiment nulle.

Nous pouvons donc en déduire que pour une surface de silice fonctionnalisée au GPTS, une concentration minimum de 20 µg/ml est requise pour saturer la surface du capteur. Afin d'assurer une bonne uniformité, nous décidons d'utiliser des solutions de 40 µg/ml d'anticorps (couche sensible), soit le double du seuil de saturation.

4.3 Détection par une approche classique

Le bactériophage M13, décrit plus haut, et déjà utilisé lors des essais préliminaires dans le cadre des travaux de thèse d'Ollivier Tamarin [Tam02], a été conservé comme modèle afin de valider l'immobilisation puis la détection d'espèces cibles biologiques par le capteur à ondes de Love. Des essais comparatifs ont été réalisés en utilisant le DTSP, la protéine G puis le GPTS comme agent de liaison entre la silice et la couche sensible d'anticorps (cf. chapitre 3). Puis, afin d'estimer plus généralement les performances des capteurs, une IgG de souris a servi de modèle pour les espèces de plus petites tailles (≈ 10 nm) comme les protéines ou les toxines. Dans un dernier temps nous nous sommes focalisés sur la détection d'espèces de plus grandes tailles comme les bactéries, avec une souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*) comme modèle.

4.3.1 Les bactériophages

Nous avons comparé la réponse des capteurs à ondes de Love suite à l'introduction d'une solution contenant des bactériophages M13 à une concentration de 10^{12} pfu/ml sur la surface du capteur préalablement recouvert d'une couche sensible d'anticorps anti-M13, en utilisant les agents de liaison décrits dans le chapitre 3. La figure 4.5 représente, superposées, les réponses de capteurs en utilisant la Protéine G (carrés noirs), le DTSP (ronds rouges), le GPTS (triangles verts) ainsi qu'un contrôle négatif (triangles bleus) suite à l'introduction de cette solution de bactériophages. Nous observons une augmentation de la fréquence (ce qui est l'inverse de l'effet souhaité a priori s'agissant d'un effet de masse) lorsque la Protéine G est utilisée. Les problèmes d'homogénéité et d'accrochage des anticorps observés lors du greffage de la couche sensible par cet agent de liaison permettent d'expliquer les difficultés à accrocher, et donc à détecter, les bactériophages sur le biocapteur.

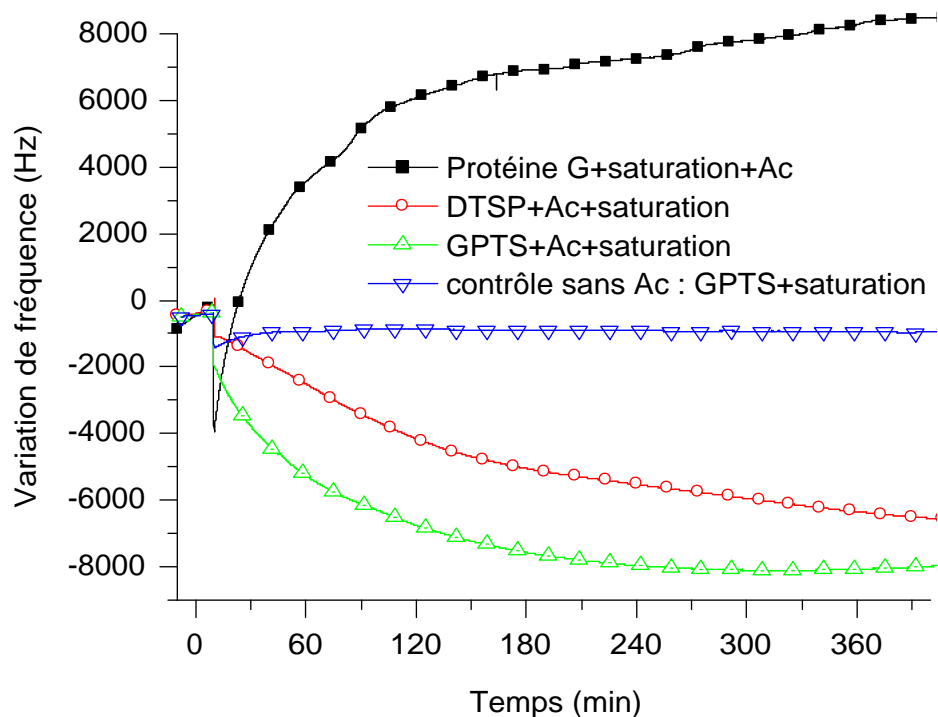


FIG. 4.5: Variation de fréquence observée en réponse à l'introduction d'une suspension de bactériophages (10^{12} /ml) avec une couche sensible immobilisée par l'intermédiaire du DTSP (ronds rouges), de la Protéine G (carrés noirs) et du GPTS (triangles verts), ainsi qu'à un contrôle sans anticorps (triangles bleus).

Par contre, l'utilisation du DTSP et du GPTS comme agent de couplage, permettent d'obtenir une diminution de la fréquence traduisant un effet de masse lié à la présence de bactériophages. En effet, la réponse du capteur, après saturation de la surface sans greffer la couche sensible d'anticorps, est presque nulle (contrôle). Cependant nous pouvons observer sur la figure 4.5 que la réponse du capteur est plus rapide et plus importante en utilisant le GPTS ($\approx 7,5$ kHz contre 6 kHz pour le DTSP). Car, contrairement au DTSP, le GPTS est censé accrocher de façon covalente et plus uniforme les anticorps à la surface du capteur.

Cette couche chimique de GPTS permet donc d'améliorer les résultats obtenus par rapport à ceux d'Ollivier Tamarin [Tam02] avec le DTSP. En effet celui-ci, bien que travaillant à des concentrations d'anticorps 5 fois plus élevés (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ contre 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour nos expériences), ne parvenait pas à avoir une bonne reproductibilité des réponses du capteur. Le DTSP n'étant pas lié de façon covalente à la silice, cela permet d'expliquer qu'il obtenait des réponses de détection, éventuellement non spécifiques, relativement différentes d'une expérience à une autre.

Nous pouvons remarquer également sur la figure 4.5 une variation rapide de la fréquence dans les premières secondes qui suivent l'introduction de la solution sur les réponses du capteur. Cela est dû aux propriétés physiques de la solution qui modifient légèrement la fréquence du capteur. Il s'agit de variations de densité, de viscosité, mais aussi une variation de température de solution qui diffère légèrement de celle du capteur.

4.3.2 Les protéines

Les bactériophages ont permis de valider l'immobilisation ainsi que la détection d'espèces biologiques de taille moyenne (entre 10 nm et 900 nm) en utilisant les biocapteurs à ondes de Love fonctionnalisés au GPTS. Nous allons maintenant nous intéresser à la détection de molécules plus petites telles que des protéines (< 10 nm). Nous avons choisi comme modèle une IgG de souris de masse moléculaire 150 kDa environ avec une couche sensible d'anticorps de chèvre anti-souris (GAM-PO).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la limite de détection du capteur en utilisant une espèce cible de faible taille et de masse connue. Après le greffage de la couche sensible sur le capteur (à 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et la saturation au SBBB des sites libres, différentes concentrations d'IgG de souris ont été introduites sur le capteur. La figure 4.6 représente les réponses du capteur en faisant varier la concentration de 1 à 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Cette figure montre une saturation du signal pour les concentrations supérieures à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, avec une variation de fréquence en régime permanent,

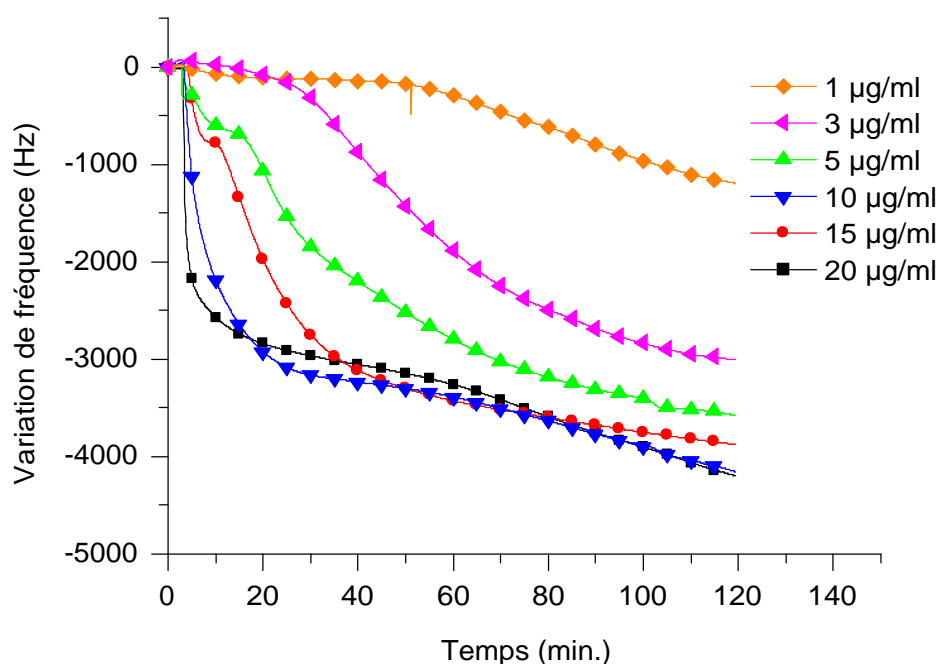


FIG. 4.6: Variation de fréquence du capteur à ondes de Love suite à l'introduction de concentrations d'IgG de souris de 1 µg/ml à 20 µg/ml avec une couche sensible de GAM-PO (20 µg/ml).

autour de 4 kHz. En dessous de ce seuil, nous observons une diminution de la fréquence fonction de la concentration. La plus petite concentration détectable est de 1 µg/ml environ. Or, comme nous l'avons vu au chapitre 2.3.1.3, le volume total de liquide utilisé est de 500 µl pour une surface de contact de 121 mm², ce qui conférerait au capteur un seuil de détection expérimental d'environ 4 ng/mm², cette valeur étant surestimée puisqu'elle suppose l'immobilisation de tous les anticorps en solution.

Nous pouvons également remarquer une augmentation du temps de détection pour les petites concentrations, sûrement dû à un temps d'homogénéisation de la solution important. En effet, le système tel qu'il est présenté actuellement ne favorise pas les interactions entre la surface sensible du capteur et les espèces cibles présentes dans le volume de la solution de test.

4.3.3 Les bactéries

En parallèle des tests de détection avec des espèces de taille relativement faible comme les protéines (≈ 10 nm) ou les bactériophages (10 nm de large sur quelques 100 nm de long), nous avons souhaité cerner le spectre d'applica-

tions potentielles du capteur. Nous avons ainsi voulu étudier ses potentialités pour la détection d'espèces cibles de grandes tailles comme les bactéries (supérieures à 1 μm) qui représentent des cibles d'intérêt dans de nombreux domaines (cf. chapitre 1.1).

Nous avons tout d'abord utilisé le DTSP et la protéine G comme agent de liaison, mais cela n'a pas abouti à l'immobilisation de bactéries tout comme pour les bactériophages au chapitre 4.3.1. Pour des concentrations de bactéries supérieures à 10^8 cfu/ml injectées sur le capteur, un nombre relativement faible et très variable de bactéries étaient immobilisées à la surface du capteur (typiquement moins de 1000 bactéries).

Le GPTS a donc été utilisé afin de pallier ce problème en utilisant la même méthode que pour la détection de bactériophages ou de protéines.

4.3.3.1 Essais préliminaires

Nous avons utilisé des bactéries *Escherichia Coli* (*E. coli*) XL1 Blue commerciales comme modèle dans un premier temps. Après greffage d'une couche sensible d'anticorps monoclonal anti-*E. coli* puis saturation de la surface, l'injection des bactéries (concentration supérieure à 10^6 cfu/ml) s'est traduite par une variation de fréquence quasi-nulle, voire légèrement positive, semblant indiquer l'absence d'immobilisation bactérienne à la surface du capteur. Une modification de la viscosité de la solution due au grand nombre de bactéries aurait pu expliquer cette réponse, mais une analyse a montré que la viscosité de la solution différait très peu avec ou sans bactéries.

Cependant, l'anticorps anti-*E. coli* commercial utilisé ne précise pas où se situe le site de reconnaissance antigénique sur la bactérie, celui-ci pouvant être interne ou externe. Nous avons donc réitéré l'expérience en lysant, c'est-à-dire en broyant les bactéries en les soumettant à des ultrasons, ce qui a permis d'obtenir une diminution de fréquence non négligeable de plusieurs kHz.

Ces premières expériences semblent indiquer que le site de reconnaissance de l'antigène commercial se situe à l'intérieur de la bactérie et celui-ci ne devient accessible qu'en les lysant. La collaboration avec la DGA, dans le cadre de ces travaux de thèse, a permis la fourniture d'un couple spécifique *E. coli* et anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes présents à l'extérieur des bactéries, ainsi que d'anticorps polyclonaux moins spécifiques et pouvant reconnaître un plus grand nombre d'antigènes. La bonne affinité en particulier du couple anticorps monoclonal-bactérie *E. coli* a été vérifiée par des test classiques immunologiques de type ELISA. Cependant ce nouveau couple n'a également pas permis d'obtenir de réponses du capteur avec des bactéries entières et vivantes, mais seulement des résultats similaires à ceux

obtenus avec le couple commercial avec des bactéries lysées. Des expérimentations supplémentaires ont montré que le capteur répondait également aux bactéries lysées même lorsque la surface était saturée par la BSA sans couche sensible d'anticorps. Il semble ainsi que la lyse des bactéries libère une grande quantité de protéines et de fragments biologiques qui interagissent de façon non-spécifique avec la surface du capteur, fonctionnalisée ou non.

Deux hypothèses ont été évoquées pour expliquer cette absence de réponse avec des bactéries entières vivantes. La première envisageait l'immobilisation des bactéries, mais leur non détection par le capteur. En effet, de par leur constitution, une paroi souple remplie d'eau, les bactéries pourraient ne pas modifier suffisamment l'onde pour être détectées.

Cependant des expériences similaires menées en utilisant d'autres bactéries de type *Streptocoques*, qui sont plus sèches à l'intérieur et présentent une membrane plus rigide, n'ont pas non plus permis d'obtenir de variation de fréquence significative du capteur. De plus, un contrôle du nombre de bactéries accrochées à la surface du capteur a été effectué après chaque expérience. Le nombre de bactéries décrochées reste très faible par rapport aux quantités injectées sur le capteur. Ces éléments confirment ainsi la seconde hypothèse, à savoir un problème d'accessibilité des bactéries à la couche sensible empêchant leur accrochage à la surface du capteur.

4.3.3.2 Accessibilité des bactéries à la couche sensible et rugosité de surface

Plusieurs phénomènes pourraient être à l'origine de l'inaccessibilité des bactéries à la couche sensible d'anticorps. Il peut s'agir d'un problème de répulsion par hydrophobie entre la membrane de la bactérie et la surface du capteur par exemple. Cependant, même si la surface du capteur fonctionnalisée au GPTS est bien caractérisée, il reste difficile d'étudier et de comprendre les phénomènes de surface du fait de l'échelle nanométrique des différents éléments qui entrent en compte dans l'interaction entre la bactérie et la surface du capteur.

L'AFM (Atomic Force Microscope ou Microscope à Force Atomique en français) a néanmoins pu mettre en évidence, lors de la caractérisation de la surface de silice, une forte rugosité de surface du capteur à ondes de Love.

En effet, sur une image AFM typique d'une surface de capteur de $1 \mu\text{m}^2$ (cf. figure 4.7 et 4.8), nous pouvons observer une rugosité quadratique importante de plusieurs nanomètres (6,5 nm sur la figure 4.8), avec des pics dépassant 25 nm. Or un anticorps, ne mesurant que 10 nm de long maximum (voire beaucoup moins quand celui-ci est replié sur lui-même), recouvre de

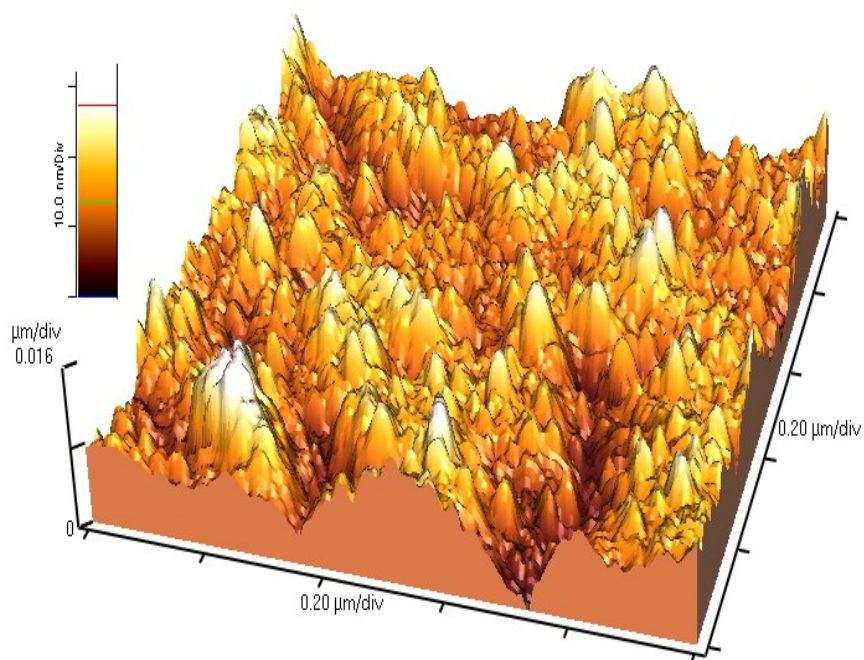


FIG. 4.7: Mesure à l'AFM de la rugosité de la surface du capteur

façon uniforme la surface du capteur (cf. chapitre 3) mais peut se retrouver piégé dans les "trous" de la surface, et même de façon privilégiée à la manière de la répartition de grains de sable sur une surface rugueuse. Une telle répartition diminuerait fortement l'accessibilité pour les bactéries qui, plus de 100 fois plus grosses, ne pourraient ainsi entrer en contact avec suffisamment d'anticorps pour s'immobiliser sur le capteur.

Cette forte rugosité de surface des capteurs est liée à la méthode de dépôt de la couche guidante de silice sur le quartz par PECVD, qui n'est pas adaptée aux grandes épaisseurs (plusieurs μm), nécessaires pour un fonction-

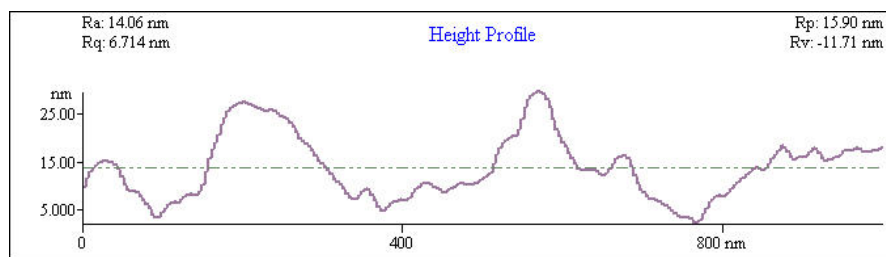


FIG. 4.8: Profil de mesure à l'AFM de la rugosité de la surface du capteur

nement optimum des capteurs à ondes de Love (cf. chapitre 2.1.1). D'autres couches guidantes utilisant des technologies offrant une faible rugosité comme le spin-coating ou le dip-coating peuvent répondre à ce besoin. Il est alors indispensable d'utiliser d'autres matériaux pour la couche guidante comme les polymères détaillés au chapitre 2.3, à condition de résoudre les problèmes d'utilisation de ces capteurs en milieu liquide évoqués alors. D'autres procédés dits de "nanoréagréage" de la couche de silice sont en voie de développement à l'ISM.

Ces procédés, bien que réalisables, impliquent des travaux de recherche multidisciplinaires importants, qui dépassent très largement le cadre de ces travaux de thèse. Parallèlement à ces solutions, explorées dans un autre cadre par les laboratoires impliqués, une nouvelle approche immunologique d'immobilisation des bactéries à la surface des capteurs actuels a été mise au point, en collaboration avec le LIP et la société AGUR.

4.4 Détection de bactéries avec un nouveau protocole immunologique

4.4.1 Une nouvelle approche immunologique

Le dispositif "classique" (en figure 4.9) consistant à greffer l'anticorps anti-espèce cible sur la surface du capteur puis injecter l'espèce cible ne semble donc pas fonctionner s'il s'agit de bactéries contrairement aux bactériophages ou protéines. La nouvelle méthode mise au point a pour but de réduire l'effet de la rugosité du capteur en rendant le site de reconnaissance de la bactérie plus accessible à la couche sensible.

Une première méthode a visé à allonger la longueur de l'élément de reconnaissance (la couche sensible) en superposant deux anticorps. Un premier anticorps anti-espèce, un GAM-PO par exemple est d'abord greffé par des liaisons covalentes sur la surface du capteur fonctionnalisé au GPTS, puis l'anticorps monoclonal (fabriqué à partir d'une souris) anti-bactérie, un anti-*E. coli* dans notre cas, vient se greffer à la suite du GAM-PO (reconnaissance des anticorps de souris et anti-souris). Des capteurs ainsi fonctionnalisés n'ont cependant pas permis non plus la détection de bactéries.

Une nouvelle méthode a alors été développée, toujours basée sur l'utilisation de deux anticorps, mais comportant les trois étapes suivantes :

- incubation de la bactérie avec son anticorps monoclonal spécifique, qui assurera la reconnaissance,
- en parallèle, greffage d'un anticorps de capture de type GAM-PO à la surface du capteur,

- puis introduction du complexe bactérie/anticorps spécifique sur la surface du capteur.

De ce fait, la cible de reconnaissance antigénique du complexe bactérien précédemment décrit devient la partie constante de l'anticorps monoclonal de souris, dorénavant greffé spécifiquement à la bactérie, et devient ainsi plus accessible à l'anticorps GAM-PO de capture greffé sur le capteur. Le schéma de la figure 4.10 illustre cette méthode.

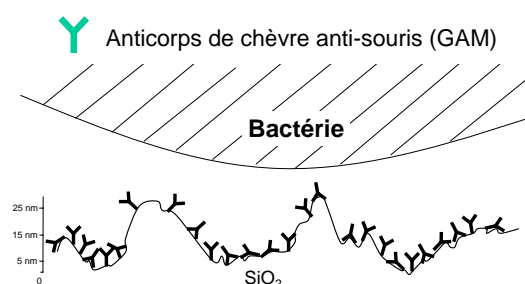


FIG. 4.9: *Méthode standard GPTS + Ac + bactérie*

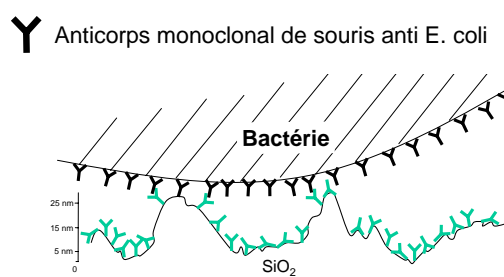


FIG. 4.10: *Nouvelle méthode (GPTS + GAM) + (Ac + bactérie)*

Notons dès à présent que, dans son principe, cette nouvelle méthode présente un double avantage. D'une part, elle favorise la rencontre et donc les interactions entre l'espèce cible et l'anticorps de reconnaissance, mis en présence dans un volume de solution et non en surface. D'autre part, l'aspect générique du capteur est encore renforcé, puisque l'anticorps de capture greffé en surface du capteur pourra être identique pour la plupart des applications, dès l'instant où l'anticorps de reconnaissance sera un anticorps de souris. Notons également que cette méthode nécessitera cependant une référence avec l'anticorps de reconnaissance seul en solution, comme détaillé dans le paragraphe suivant.

Cette nouvelle technique a rendu possible l'immobilisation des bactéries à la surface du capteur ainsi que leur détection. Les résultats obtenus ainsi qu'une optimisation du protocole pour réduire le temps total d'une analyse de détection sont décrits ci-après.

4.4.2 Validation et reproductibilité

Sur la figure 4.11, la courbe en rouge (triangles) représente la réponse typique du capteur suite à l'introduction du complexe bactérien sur le capteur préalablement recouvert d'une couche sensible d'anticorps de type GAM-PO fixés par l'intermédiaire du GPTS. La courbe bleue (carrés), représente un

contrôle afin d'éviter une fausse réponse positive de détection. Ce contrôle consiste à injecter sur le capteur la même quantité d'anticorps de reconnaissance anti-*E. coli* que celle utilisée lors de l'incubation avec la bactérie. Car, lors de l'insertion du complexe bactérien sur le capteur, des anticorps anti-*E. coli* peuvent se retrouver "libres" dans la solution. Ces anticorps libres peuvent se greffer à la surface du capteur provoquant ainsi une chute de fréquence indésirable par effet de masse. Ce contrôle est donc utilisé afin de discriminer la détection de bactéries de celle des anticorps libres dans la solution.

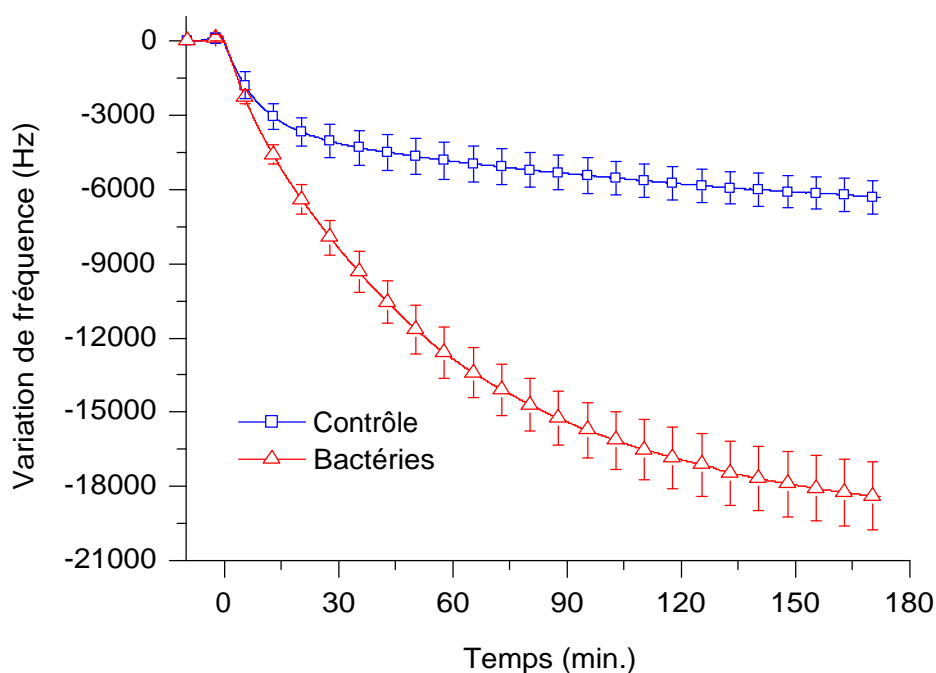


FIG. 4.11: Variations de fréquence observées en réponse à l'introduction d'une suspension de *E. coli* (10^7 cfu/ml) préalablement incubée avec un anticorps anti-*E. coli* ($5 \mu\text{g/ml}$) (triangles rouges) ou du même anticorps seul (carrés bleus), et reproductibilité (les barres d'erreurs représentent l'écart type sur 5 mesures).

La différence observée entre la variation de fréquence finale d'environ 17 kHz pour l'introduction d'une solution contenant le complexe bactérien à une concentration sur le capteur de 10^7 bactéries/ml, et la variation de fréquence finale d'environ 5 kHz pour des anticorps anti-*E. coli* à une concentration sur le capteur de $5 \mu\text{g/ml}$ est due à la différence de masse entre les bactéries et les anticorps. Cette figure nous permet également d'observer la

bonne reproductibilité de cette expérience, en effet les barres d'erreur représentent l'écart type de la réponse en fréquence du capteur, pour la même expérience reproduite 5 fois, et est inférieur à 8% de la réponse moyenne finale.

La différence observée entre ces deux courbes représente l'immobilisation des bactéries et permet donc de valider la présence de bactéries à la surface du capteur.

4.4.3 Spécificité

La spécificité d'un capteur immunologique (ou immunocapteur) repose sur l'affinité et la spécificité du couple antigène/anticorps. Le couple anticorps/bactéries fourni par la DGA a l'avantage d'offrir une grande affinité et d'être très spécifique surtout quand l'anticorps monoclonal est utilisé. La méthode utilisée pour la détection de bactérie conserve ces propriétés et assure donc une spécificité similaire à la méthode standard.

La figure 4.12 représente l'étude menée sur la spécificité en utilisant des couples anticorps/bactéries non spécifiques. La courbe orange (triangles inversés) montre une détection de bactéries *E. coli* en utilisant son anticorps anti-*E. coli* spécifique lors de l'étape d'incubation. Nous obtenons les mêmes résultats que précédemment (paragraphe 4.4.2). De même la courbe verte (ronds) représente le contrôle avec des anticorps anti-*E. coli* seulement.

La courbe rouge (carrés) représente les résultats obtenus avec l'incubation de bactéries *E. coli* avec des anticorps anti-bactériophages. La variation de fréquence qui résulte de l'introduction de cette solution sur le capteur est faible et d'intensité semblable au contrôle avec seulement les anticorps. Cela montre bien qu'il n'y a pas eu d'immobilisation non spécifique des bactéries à la surface du capteur.

Un autre contrôle négatif a consisté à utiliser des bactéries de type *Pseudomonas* avec un anticorps anti-*E. coli*, et est représentée sur la courbe bleue (triangles). Nous pouvons décomposer cette réponse en deux parties distinctes. La première partie correspond à une diminution rapide de la fréquence identique au contrôle sans bactéries. Dans la seconde partie, nous observons une légère diminution de la fréquence due à l'immobilisation de bactéries *Pseudomonas* sur la surface du capteur. Ce second effet arrive plus tardivement et ressemble aux réponses observées pour la détection de petites concentrations d'IgG de souris (cf. chapitre 4.3.2) et qui proviendrait du temps d'homogénéisation de la solution. La détection de *Pseudomonas* peut s'expliquer par le fait que les bactéries *E. coli* et *Pseudomonas* se ressemblent beaucoup. En effet, les bactéries *Pseudomonas* sont des bacilles de type gram négatif présentant beaucoup de ressemblance avec les entérobac-

téries comme les bactéries *E. coli*, et des tests immunologiques ELISA ont montré que les anticorps anti-*E. coli* utilisés présentaient des affinités avec les bactéries *Pseudomonas*. En effet, la densité optique (DO), qui permet de quantifier l'intensité de coloration après un test ELISA, a été mesurée à 0,636 pour un couple anti-*E. coli*/*Pseudomonas*, et à plus de 1 (saturation à 1) avec le couple anti-*E. coli*/*E. coli*. Cela représente plus de la moitié du signal, ce qui semble correspondre avec les réponses en temps réel de la figure 4.12 en utilisant le capteur à ondes de Love.

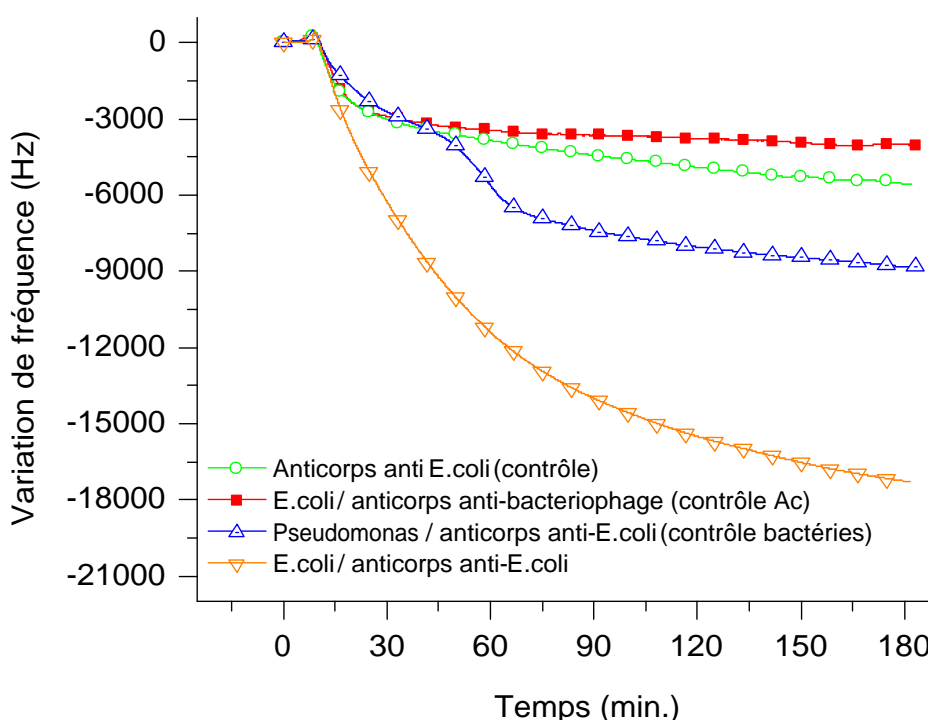


FIG. 4.12: Variations de fréquence observées en réponse à l'introduction d'une suspension de *E. coli* préalablement incubées avec un anticorps anti-*E. coli* (triangles inversés oranges) ou avec un anticorps anti-bactériophage M13 non spécifique (carrés rouges), de l'anticorps anti-*E. coli* seul (contrôle ronds verts) ou de l'anticorps anti-*E. coli* incubé avec une souche de bactéries *Pseudomonas* (triangles bleus).

Nous vérifions bien ici que la spécificité du capteur dépend essentiellement de la spécificité du couple anticorps/antigène et que la méthode utilisée permet de conserver ces avantages.

4.4.4 Seuil de détection

De la même façon que pour les espèces de petites tailles comme les protéines (cf. paragraphe 4.3.2), nous avons souhaité estimer un seuil de détection expérimental du capteur dans sa configuration actuelle. Sur la figure 4.13 sont ainsi superposées les réponses du capteur à des concentrations de bactéries *E. coli* de 10^4 cfu/ml à 10^9 cfu/ml.

Nous observons sur cette figure que pour des concentrations supérieures à 10^6 cfu/ml la variation de fréquence est suffisamment importante pour pouvoir la discriminer du contrôle sans bactéries. Par contre, les concentrations inférieures à 10^6 cfu/ml ne permettent pas d'identifier une variation suffisamment significative pour la discriminer du contrôle sans bactéries, et donc ce seuil de 10^6 cfu/ml peut être considéré comme le seuil de détection des capteurs actuels en utilisant cette nouvelle méthode.

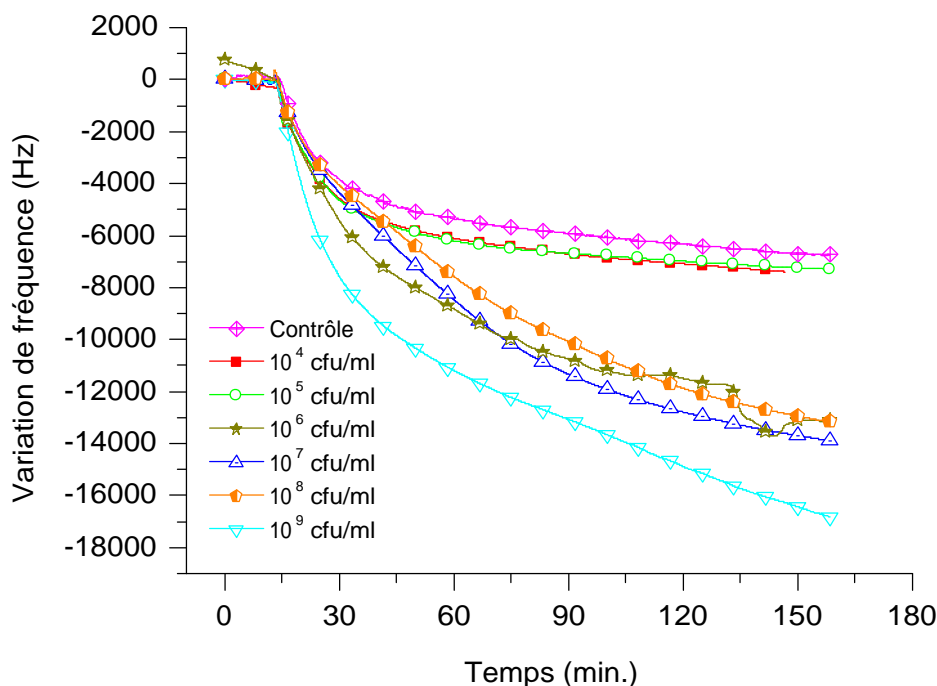


FIG. 4.13: Variations de fréquence observées en réponse à l'introduction de suspensions de *E. coli* à différentes concentration et préalablement incubées avec un anticorps anti-*E. coli*, ainsi que la réponse du capteur au même anticorps seul à $5 \mu\text{g/ml}$ (contrôle).

En comparaison, Subramanian *et al.*, qui travaillent sur des capteurs de type SPR, ont eux aussi atteint un seuil de détection de l'ordre de 10^6 cfu/ml dans [Sub06] avec une immobilisation directe des bactéries *E. coli* sur une

surface d'or fonctionnalisée avec des anticorps anti-*E. coli*. Ils ont néanmoins réussi à réduire ce seuil en utilisant la méthode sandwich qui consiste à injecter, et détecter, l'accrochage d'anticorps anti-*E. coli*, dits secondaires et identiques à ceux greffés sur le capteur, après immobilisation des bactéries à la surface. Cependant cette méthode augmente le temps total de détection et l'accrochage chimique des anticorps primaires sur de l'or par des thiols offre une mauvaise stabilité chimique de la liaison en milieu agressif pouvant compromettre l'immobilisation et donc la détection des espèces cibles.

Sur cette figure 4.13, la brusque variation de comportement du capteur, entre les réponses pour des concentrations comprises entre 10^6 et 10^9 cfu/ml, parfaitement visibles, et celles comprises entre 10^4 et 10^5 cfu/ml, peu significatives par rapport au contrôle, reste à ce jour encore inexplicée. Nous pouvons simplement estimer que pour une concentration inférieure ou égale à 10^5 bactéries/ml dans une chambre de mesure de 500 μl , un maximum de 5.10^4 bactéries peuvent être immobilisées sur une surface totale de 121 mm^2 . Avec une surface de bactérie de l'ordre de 3 μm^2 (surface $\approx 1 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$), seulement 0.1% de la surface du capteur serait "couverte" de bactéries dans le meilleur des cas, conduisant de façon non surprenante à une non détection par le capteur. La surface réellement active du capteur étant de 10 mm^2 environ, il apparaît que ce seuil de détection (en nombre de bactéries) pourrait être diminué d'un facteur 10 au moins en réduisant la cavité de test et/ou la surface fonctionnalisée susceptible d'immobiliser le complexe bactérien.

Notons cependant que ces courbes résultent d'essais préliminaires (une réponse par concentration) obtenus à partir du stock d'anticorps disponibles. Pour en extraire une information, puis une analyse, plus fiables, et éventuellement évaluer la possibilité de quantification à partir du capteur, ces observations devront être affinées en reproduisant ces expériences.

4.4.5 Influence de la température

Une autre limite du capteur concerne le temps de détection, et donc d'analyse, total. Dans cette partie nous allons nous intéresser à l'influence de la température de la solution et du capteur sur la réponse en fréquence. La figure 4.14 représente les variations de fréquence du capteur en réponse au contrôle sans bactéries et à l'immobilisation du complexe bactérien pour des températures de 25°C (température ambiante) et 37°C. Dans les 2 cas, la variation de fréquence finale est similaire, de l'ordre de 17 kHz pour le complexe bactérien et de l'ordre de 5 kHz pour le contrôle. Par contre le temps de réponse du capteur pour une température de 37°C est beaucoup plus court,

avec un état d'équilibre de la fréquence atteint en moins de 3 heures au lieu de 6 heures quand la température est de 25°C.

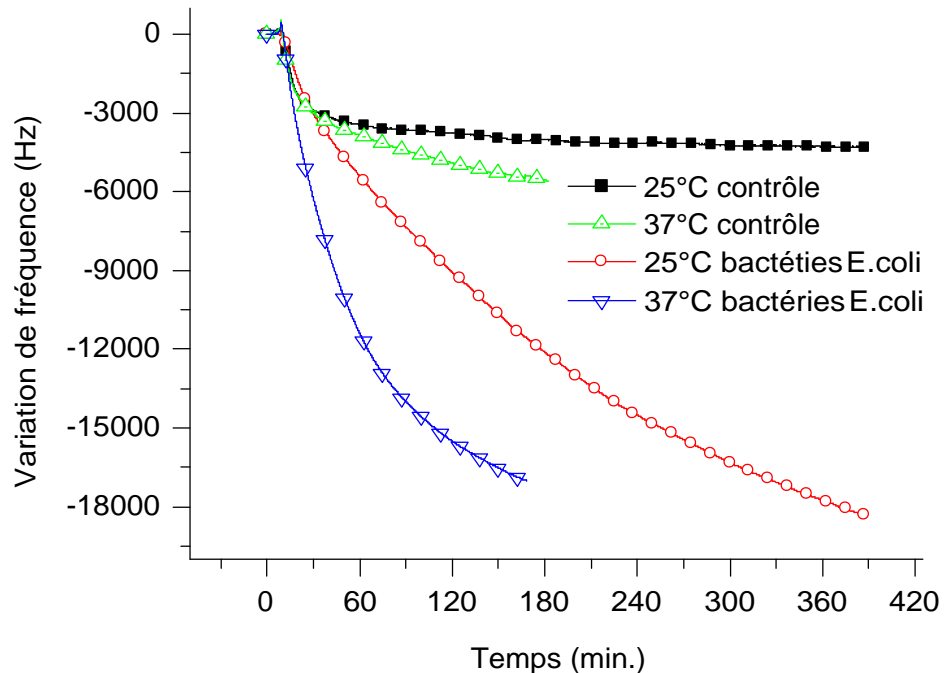


FIG. 4.14: Variations de fréquence observées à 25°C et à 37°C en réponse à l'introduction d'une suspension de *E. coli* préalablement incubée avec un anticorps anti-*E. coli* (triangles inversés bleus à 37°C, et ronds rouges à 25°C), ainsi que la réponse du même anticorps seul à 5 $\mu\text{g/ml}$ (triangles verts à 37°C, et carrés noirs à 25°C).

La température de 37°C correspond effectivement à la température physiologique du corps humain et à une cinétique de réaction biologique optimale. Réaliser l'étape de détection avec le capteur et les éléments biologiques à cette température permet donc de réduire considérablement le temps de réponse. Ainsi, toutes les expériences de détection de bactéries vivantes ont été réalisées à 37°C.

4.4.6 Temps d'incubation et durée d'analyse

Dans de multiples applications dont le domaine médical, militaire ou environnemental, le temps total d'analyse est un paramètre critique concernant la détection d'éléments biologiques pathogènes tels que les bactéries, et doit de ce fait être le plus court possible. La différence entre le signal du complexe bactérien et celui du contrôle sans bactéries est utilisé pour déterminer

la présence ou non de bactéries. Ce signal devient significatif au bout de quelques minutes seulement. Nous considérons qu'une durée de 30 minutes, après injection de la solution à tester sur le capteur, est suffisante pour beaucoup d'applications, par rapport aux méthodes actuelles, et peut être utilisée comme durée typique de lecture du résultat.

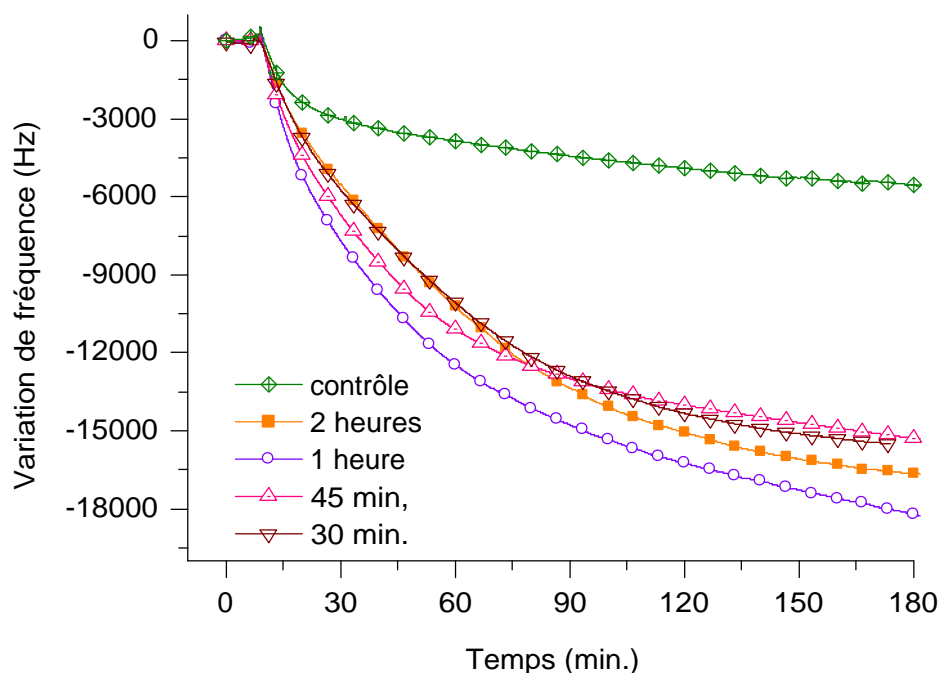


FIG. 4.15: Variations de fréquence observées en réponse à l'introduction d'une suspension de *E. coli* préalablement incubées pendant 30 minutes (triangles inversés marrons), 45 minutes (triangles roses), 1 heure (rond violet) ou 2 heures (carrés oranges) avec un anticorps anti-*E. coli*, ainsi que la réponse du même anticorps seul à 5 $\mu\text{g/ml}$ (losanges verts).

En plus de ce temps de détection, il est nécessaire de prendre en compte le temps nécessaire à l'incubation des bactéries avec leurs anticorps spécifiques. La figure 4.15 représente différentes réponses de détection en fonction du temps d'incubation, tout d'abord arbitrairement fixé à 2 heures, puis réduit jusqu'à 30 minutes, sans qu'aucune différence de la variation finale de la fréquence du capteur ne soit observée. Nous pouvons en conclure qu'un temps d'incubation des bactéries de 30 minutes seulement est largement suffisant et n'influe pas sur l'immobilisation des bactéries sur le capteur. Cela nous permet ainsi de réduire le temps d'analyse total de détection à 1 heure maximum.

4.5 Conclusions et perspectives

Nous avons vu dans ce chapitre l'application des capteurs à ondes de Love à la détection d'espèces biologiques de tailles et de formes différentes telles que les protéines, les virus ou les bactéries. Les protocoles mis en place permettent d'obtenir des variations de fréquence suffisamment significatives et reproductibles.

La détection des bactériophages M13 a permis de valider la solution retenue pour l'accrochage covalent du biorécepteur. Les IgG de souris, utilisées comme modèle pour les espèces de petites tailles, ont permis de définir un seuil de détection expérimental de 4 ng/mm^2 pour un volume total de solution de $500 \text{ }\mu\text{l}$ en statique. Une circulation dynamique de la solution à analyser, dans des configurations qui augmentent le mélange de la solution et ainsi favorise les chances de contacts entre l'élément biologique présent et la surface, permettrait de descendre encore ce seuil.

Nous avons aussi obtenu de bons résultats de détection de bactéries vivantes en termes de sensibilité, spécificité et de temps d'analyse en utilisant une nouvelle approche immunologique. Cette technique utilise un couple d'anticorps et même si elle augmente le temps total de l'analyse, elle rend l'analyse plus générique en utilisant un anticorps anti-souris (GAM) comme biorécepteur. Cependant le seuil de détection reste élevé et a besoin d'être abaissé pour de nombreuses applications.

Des améliorations doivent donc être apportée au système actuel pour atteindre ce but. Cela concerne en particulier la limitation de la surface du liquide de test et/ou de la surface fonctionnalisée à la surface active du capteur uniquement. De plus une diminution du volume d'échantillon de test, réalisable grâce à l'utilisation de micro cellules en PDMS (cf. chapitre 2.3.2) permettrait d'économiser le matériel biologique, assurerait plus rapidement une meilleure répartition spatiale des espèces dans la solution et pourrait contribuer à un brassage du matériel biologique sur le capteur afin de favoriser les chances de rencontre entre ces espèces et la surface. Actuellement seules les espèces cibles proches de la surface sont immobilisées : cela limite l'effet de masse potentiellement utilisable et nécessaire à la diminution du seuil de détection, cela doit limiter également la reproductibilité du début de la réponse du capteur, qui dépend de la dynamique d'homogénéisation de la solution de test (surtout pour de faibles concentrations). Un effet secondaire de la diminution du volume serait vraisemblablement la réduction du temps d'homogénéisation de la solution et donc du temps d'analyse. Un brassage

des espèces en suspension, possibles en circulation microfluidique, pourrait augmenter encore la cinétique d'immobilisation des espèces.

Conclusion

Nous nous sommes dans un premier temps attachés à décrire de manière non exhaustive les différentes technologies utilisées dans le domaine des biocapteurs. Cette étude a notamment permis d'introduire les capteurs à ondes acoustiques, et plus particulièrement les capteurs à ondes de Love qui ont été utilisés dans ces travaux. A la vue des performances des différents immunocapteurs recensés, les capteurs à ondes de Love apparaissent parmi ceux offrant les meilleures performances notamment en termes de rapidité de mesure et de seuil de détection.

Une description détaillée des capteurs à ondes de Love a permis de présenter leurs principales caractéristiques ainsi que d'introduire la chaîne de mesure électronique. Le signal de mesure est la fréquence d'oscillation qui est représentative de la vitesse de l'onde de Love. L'électronique a été développée de façon à limiter le bruit et concéder une stabilité inférieure à 1 Hz/s de la fréquence d'oscillation.

Nous avons également développé la mise en œuvre de différentes méthodes visant à l'amélioration de performances du capteur en particulier concernant l'augmentation de la sensibilité (vitesse, fréquence), et la diminution des pertes d'insertion. Une des principales améliorations apportées concerne le remplacement de la couche guidante de silice par des matériaux polymères qui d'après les simulations simplifiées (non prise en compte des pertes) permettrait d'augmenter la sensibilité des capteurs à ondes de Love. De plus le processus utilisé (spin coating) pour le dépôt de telle couche présente plusieurs avantages, notamment une réalisation technologique plus aisée et moins coûteuse, associée à une rugosité de surface facilitant vraisemblablement la détection d'espèces de grande taille comme les bactéries.

Un autre aspect concerne l'étude de la géométrie des transducteurs interdigités. L'augmentation de la capacité équivalente des IDTs contribue à réduire les pertes et ainsi utiliser des épaisseurs de couche guidante polymère plus importantes qui permettrait d'atteindre des sensibilités maximales pour ce genre de matériaux. La réduction de la longueur du chemin de propagation d l'onde permet également de diminuer la pente de phase en valeur

absolue, et ainsi augmenter la variation de fréquence dans un fonctionnement en oscillateur. Cependant la localisation d'un liquide conducteur sur les IDTs rend inutilisables ces capteurs pour le moment. La mise en place de cellules microfluidiques en PDMS permettra de s'affranchir de ces problèmes, mais nécessite le développement d'un système de maintien par pression et non par collage afin de préserver l'accès à la surface du dispositif, principalement pour les étapes de fonctionnalisation.

Un agent de liaison est utilisé dans le but de créer des liaisons covalentes entre les anticorps, utilisés comme biorécepteur, et la couche de silice en surface du capteur. Comparé au DTSP et à la Protéine G, les réponses en fréquence en utilisant le GPTS sont plus importantes et plus reproductibles. D'autre part, les réponses des capteurs à ondes de Love ainsi que des mesures effectuées par immunofluorescence ont montré que la densité de greffage de la couche sensible est plus importante lorsque les anticorps sont conjugués à la protéine HorseRaddish Peroxidase. La combinaison du GPTS comme agent de couplage et des anticorps couplés à la peroxydase comme biorécepteur confère au capteur une couche sensible dense, uniforme et stable, ce qui est indispensable par la suite pour obtenir des détections biologiques significatives et reproductibles.

Le capteur à ondes de Love utilisé en immunocapteur doit permettre la détection de diverses espèces cibles de tailles comprises entre quelques nanomètres et plusieurs micromètres. Les premiers essais de détection utilisant une détection directe (greffage de l'anticorps spécifique à la surface du capteur) ont été réalisés avec des bactériophages M13 qui représentent un modèle connu et déjà utilisé lors des travaux de thèse d'Ollivier Tamarin [Tam02], afin d'en effectuer la comparaison avec les résultats obtenus par celui-ci. Ces détections montrent un signal d'amplitude comparable, pour une même quantité de bactériophage, avec cependant une meilleure reproductibilité dans notre cas grâce à l'apport d'une liaison covalente des anticorps sur la surface.

Après cette validation du bon fonctionnement des immunocapteurs à ondes de Love, une estimation de la limite de détection a été menée. Pour cela, nous avons utilisé des espèces de petites tailles (IgG de souris, inférieures à 10 nm) qui permettent de mieux recouvrir la surface. Nous avons pour le moment obtenu un seuil de détection expérimental de 4 ng/mm², surestimé dû au volume important de liquide utilisé qui ne permet pas l'accrochage de toutes les espèces en solution.

Une nouvelle méthode de détection utilisant un couple d'anticorps a été mise en œuvre afin de permettre l'immobilisation des bactéries de type *E. coli* à la surface du capteur. En effet, la technique directe de détection est inefficace, due notamment à une rugosité intrinsèque du capteur qui rend très peu

accessibles les sites de reconnaissance bactériens aux anticorps. Une incubation préalable des bactéries avec leur anticorps spécifique menée en parallèle avec le greffage des anticorps de type GAM-PO (qui reconnaît les anticorps monoclonaux de souris utilisés) conduit à une immobilisation ainsi qu'à une détection positive de ces bactéries lors de l'injection de ce complexe sur la surface du capteur. Les résultats obtenus montrent une bonne reproductibilité ainsi qu'une bonne sélectivité. Afin d'optimiser le temps total d'analyse, augmenté par l'incubation préalable des bactéries avec leur anticorps spécifique, une étude sur l'influence de la température et de la durée de cette incubation a été menée. Il en ressort qu'une régulation de la température à 37°C augmente la cinétique de détection et qu'un temps d'incubation de 30 minutes ne réduit pas l'intensité du signal observé lors de la détection. Cela permet d'obtenir un temps d'analyse total, comprenant l'incubation et la détection, inférieur à 1 heure et 30 minutes. Le seuil de détection des bactéries est de l'ordre de 10^6 cfu/ml. Ce seuil est comparable à ceux obtenus dans les travaux sur les biocapteurs pour la détection de bactéries vivantes (cf. chapitre 1).

Nous avons donc validé l'utilisation des immunocapteurs à ondes de Love appliqués à la détection de diverses espèces cibles biologiques de tailles différentes, grâce notamment à l'utilisation d'un agent de couplage chimique qui crée des liaisons covalentes entre la couche sensible d'anticorps et la surface du capteur afin d'assurer une bonne uniformité et une bonne reproductibilité des réponses. Même si l'utilisation de micro capteurs a permis la réduction du temps d'analyse par rapport aux méthodes classiques, le seuil de détection reste toutefois encore élevé pour la plupart des applications évoquées.

Ainsi, comme nous l'avons précédemment décrit, l'utilisation de matériaux polymères ou hybrides en remplacement de la couche guidante de silice actuelle, permettrait d'augmenter le pouvoir gravimétrique (la sensibilité) des capteurs, mais aussi d'améliorer la densité, l'uniformité et l'accessibilité de la couche sensible d'anticorps et de ce fait devrait réduire le seuil de détection.

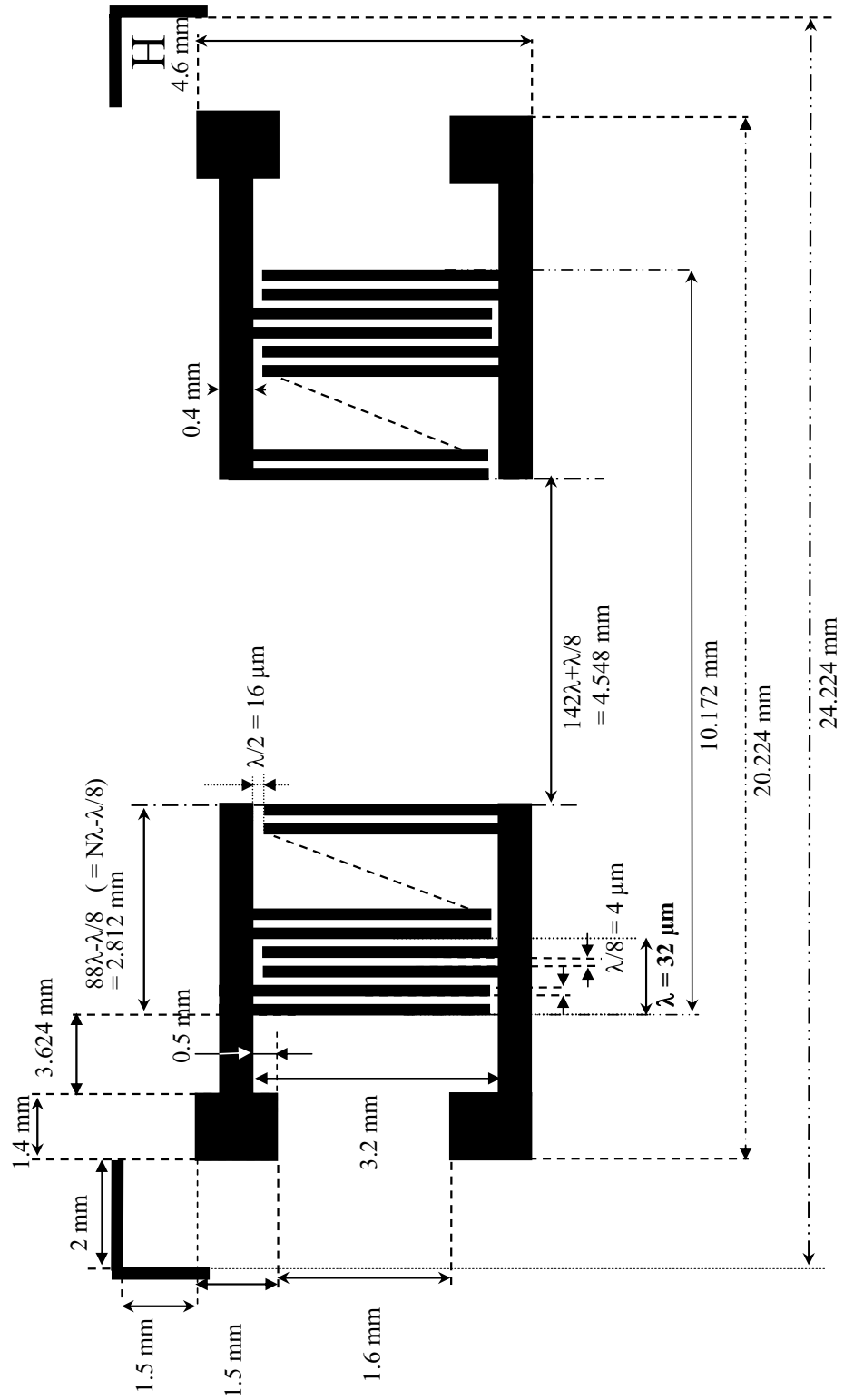
De plus, le développement de nouveaux agents de couplage chimiques par l'ISM, pour améliorer encore la densité et l'uniformité de la couche sensible, et de nouvelles techniques de greffage des anticorps, pour faciliter la procédure de régénération, permettrait d'augmenter les performances actuelles des immunocapteurs à ondes de Love.

Enfin, l'amélioration du système de fluide, qui fonctionne actuellement en statique et consomme des quantités de matériel biologique importantes, permettrait non seulement de réduire le seuil de détection en nombre et en concentration d'espèce cible, mais permettrait également de diminuer le temps d'analyse. Cela sera rendu possible par l'utilisation de cellules microfluidiques qui en fonction de leur géométrie permettent de mélanger la

solution, et favoriser ainsi les "chances" d'interaction entre les espèces cibles en solution et la surface du capteur.

Annexe A

Schéma de la nouvelle géométrie des lignes à retard



Annexe B

Caractéristiques des matériaux

Les valeurs données ici sont caractéristiques des matériaux à température ambiante (25 °C).

B.1 Le Quartz

D'après [Slo73]

- SiO₂,
- Système cristallographique : trigonal 32,
- Masse volumique : 2650 kg.m⁻³,
- Tenseur de rigidité C_{ij} :

$$[C] = \begin{bmatrix} C_{11} & C_{12} & C_{13} & C_{14} & 0 & 0 \\ C_{12} & C_{11} & C_{13} & -C_{14} & 0 & 0 \\ C_{13} & C_{13} & C_{33} & 0 & 0 & 0 \\ C_{14} & -C_{14} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & C_{44} & C_{14} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & C_{14} & \frac{C_{11} - C_{12}}{2} \end{bmatrix}$$

avec :

$$\begin{aligned} C_{11} &= 0,867 \cdot 10^{11} \text{ N.m}^{-2} & C_{14} &= -0,179 \cdot 10^{11} \text{ N.m}^{-2} \\ C_{12} &= 0,070 \cdot 10^{11} \text{ N.m}^{-2} & C_{33} &= 1,07 \cdot 10^{11} \text{ N.m}^{-2} \\ C_{13} &= 0,119 \cdot 10^{11} \text{ N.m}^{-2} & C_{44} &= 0,579 \cdot 10^{11} \text{ N.m}^{-2} \end{aligned}$$

- Tenseur de permittivité ε_{ij} :

$$[\varepsilon] = \begin{bmatrix} \varepsilon_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \varepsilon_{11} & 0 \\ 0 & 0 & \varepsilon_{33} \end{bmatrix}$$

$$\text{avec : } \varepsilon_{11} = 3,92 \cdot 10^{-11} \text{ F.m}^{-1} \quad \varepsilon_{33} = 4,1 \cdot 10^{-11} \text{ F.m}^{-1}$$

- Tenseur de constante piézoélectrique

$$[e] = \begin{bmatrix} e_{11} & -e_{11} & 0 & e_{14} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -e_{14} & -e_{11} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

avec : $e_{11} = 0,171 \text{ C.m}^{-2}$ $e_{14} = -0,0406 \text{ C.m}^{-2}$

B.2 Le SiO₂

D'après [Slo73]

- Matériau isotrope,
- Masse volumique : 2650 kg.m^{-3} ,
- Tenseur de rigidité C_{ij} :

$$[C] = \begin{bmatrix} C_{11} & C_{11} - 2C_{44} & C_{11} - 2C_{44} & 0 & 0 & 0 \\ C_{11} - 2C_{44} & C_{11} & C_{11} - 2C_{44} & 0 & 0 & 0 \\ C_{11} - 2C_{44} & C_{11} - 2C_{44} & C_{11} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & C_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & C_{44} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & C_{44} \end{bmatrix}$$

avec :

$$C_{11} = 0,785 \cdot 10^{11} \text{ N.m}^{-2} \quad C_{44} = 0,312 \cdot 10^{11} \text{ N.m}^{-2}$$

- Tenseur de permittivité ε_{ij} :

$$[\varepsilon] = \begin{bmatrix} \varepsilon_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \varepsilon_{11} & 0 \\ 0 & 0 & \varepsilon_{33} \end{bmatrix}$$

avec : $\varepsilon_{11} = 3,92 \cdot 10^{-11} \text{ F.m}^{-1}$ $\varepsilon_{33} = 4,1 \cdot 10^{-11} \text{ F.m}^{-1}$

B.3 Le Polyméthylméthacrylate (PMMA)

D'après [Kre90]

- Matériau isotrope,
- Masse volumique : 1100 kg.m^{-3} ,
- Tenseur de rigidité C_{ij} :

$$[C] = \begin{bmatrix} C_{11} & C_{11} - 2C_{44} & C_{11} - 2C_{44} & 0 & 0 & 0 \\ C_{11} - 2C_{44} & C_{11} & C_{11} - 2C_{44} & 0 & 0 & 0 \\ C_{11} - 2C_{44} & C_{11} - 2C_{44} & C_{11} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & C_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & C_{44} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & C_{44} \end{bmatrix}$$

avec :

$$C_{11} = 0.068.10^{11} \text{ N.m}^{-2} \quad C_{44} = \mu = 0.011.10^{11} \text{ N.m}^{-2}$$

– Tenseur de permittivité ε_{ij} :

$$[\varepsilon] = \begin{bmatrix} \varepsilon_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \varepsilon_{11} & 0 \\ 0 & 0 & \varepsilon_{33} \end{bmatrix}$$

$$\text{avec : } \varepsilon_{11} = 2.6.10^{-11} \text{ F.m}^{-1}$$

Annexe C

Annexe Biologique

C.1 Références du matériel biologique et chimique

Les produits chimiques et biologiques spécifiques utilisés sont référencés ici.

Les Anticorps :

- Anticorps de chèvre anti-souris (GAM) (Goat anti-Mouse IgG, Sigma-Aldrich pdt no. M1397),
- Anticorps de chèvre anti-souris marqué à la peroxydase (GAM-PO) (Goat anti-mouse IgG-Peroxydase, Sigma-Aldrich pdt no. A4416),
- Anticorps de chèvre anti-souris marqué au FITC (GAM-FITC) (Goat anti-mouse IgG-FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate), Sigma-Aldrich pdt no. F0257),
- Anticorps de lapin anti-chèvre marqué au TRITC (RAG-TRITC) (Rabbit anti-Goat IgG-TRITC (Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate), Sigma-Aldrich pdt no. T7028),
- Anticorps monoclonal de souris anti *Escherichia coli* (*E. coli*) (Centre d'Étude du Bouchet, DGA (ACM4)), dirigé contre l'enveloppe externe de la bactérie,
- Anticorps polyclonal de lapin anti *E. coli* (Dako), dirigé contre un antigène interne à la bactérie,
- Anticorps monoclonal de souris anti *E. coli* (Euromedex), dirigé contre un antigène interne à la bactérie,
- anticorps monoclonal anti bactériophage M13 (Sigma-Aldrich).

Les agents de saturation :

- StartingBlock™ Blocking Buffer (SBBB, Pierce pdt no. 37538).
- Bovin Serum Albumin Fraction V (BSA, Merck)

Les agents de liaison :

- (3-glycidoxypropyl)triméthoxysilane (GPTS, Roth-Sochiel),
- Protéine G (Sigma-Aldrich),
- 3,3'-Dithio-bis(propionique acid N-hydroxysuccinimide ester) (DTSP, Sigma-Aldrich).

Les espèces cibles :

- Bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) non-pathogène (Centre d'Étude du Bouchet, DGA (MRE162)),
- Bactériophages M13,
- Anticorps de souris (IgG mouse, Sigma-Aldrich).

Les produits divers :

- Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.2, Sigma-Aldrich).

C.2 ELISA, comment ça marche ?

D'après [Déj05].

Le test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) consiste en plusieurs étapes résumées sur la figure C.1 :

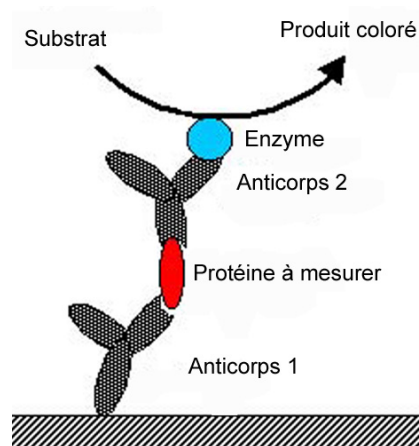


FIG. C.1: *Principe du test immuno-enzymatique ELISA*

Un test immuno-enzymatique de type ELISA est réalisé sur des microplaques standard comportant 96 puits (en plastique de type polypropylène, polycarbonate notamment), présentant des propriétés d'adsorption spécifique, compatible avec les protéines étudiées. Chaque puits peut contenir environ 200 μL de liquide. Des ligands primaires sont adsorbés, c'est-à-dire fixés de manière non covalente, à une phase solide dans le fond de chaque puits. Un agent bloquant est ajouté pour éviter la fixation non-spécifique du composé étudié, et limiter ainsi le bruit de fond. Puis la solution de test est injectée dans les puits pour que le composé se fixe spécifiquement sur l'anticorps primaire (Anticorps 1 sur la figure C.1). On peut aussi mettre dans le milieu de test un agent de surface, comme le Tween 20, qui inhibe l'adsorption additionnelle de molécules, sans détacher celles déjà adsorbées. Après un temps d'incubation, par exemple 30 minutes, ces puits sont rincés pour éliminer toutes les protéines non liées.

D'autres étapes sont alors nécessaires pour permettre de vérifier la présence ou non du composé lié. Un anticorps secondaire (Anticorps 2 sur la figure C.1) conjugué à une enzyme réactive (typiquement une peroxydase) est ajouté dans les puits qui sont ensuite à nouveau rincés pour éliminer l'excédent de réactif. Puis est ajouté le substrat S spécifique de l'enzyme ainsi qu'un chromogène C, destiné à réagir sur le produit de la réaction. L'enzyme fixée va transformer un grand nombre de molécules S en espèces P, qui vont réagir avec C et former une solution colorée. On arrête la réaction après un temps assez court en ajoutant un acide fort qui détruit l'enzyme.

Il reste à procéder à la lecture du test avec un colorimètre, pour remonter à la concentration de composé cible à travers une mesure d'absorbance suivant la loi de Beer-Lambert, grâce à un spectrophotomètre :

$$DO = \varepsilon.L.C \quad (\text{C.1})$$

avec DO la densité optique, ε l'absorbance (m^{-1}), L l'épaisseur du milieu coloré (m) et C la concentration (%). Un autre jeu d'appellation et d'unités sont aussi utilisées : le coefficient d'extinction molaire pour ε ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l'épaisseur de la solution (cm) et la concentration c (mol.L^{-1}).

C.3 La titration

La titration d'une espèce biologique permet de calculer la concentration de cette espèce présente dans une solution à analyser. Nous prendrons l'exemple du titrage des bactéries *E. coli* et des bactériophages M13 utilisés dans ce document comme espèce cible modèle.

Après plusieurs rinçage destinés à enlever de la solution les espèces cibles accrochées de manière non spécifique, les espèces cibles sont "décrochées" de la surface du capteur avec une solution de glycine (0,1M, pH 2,2).

C.3.1 Les bactéries

Des dilutions en série de la solution sont réalisées (figure C.2) puis des aliquots sont étalés sur des boîtes de milieu de culture dans une boîte de Pétri. A l'issue de la croissance, les colonies sont dénombrées permettant de compter et revenir à la concentration, en cfu (colony forming unit) par ml, des bactéries présentes dans la solution initiale.

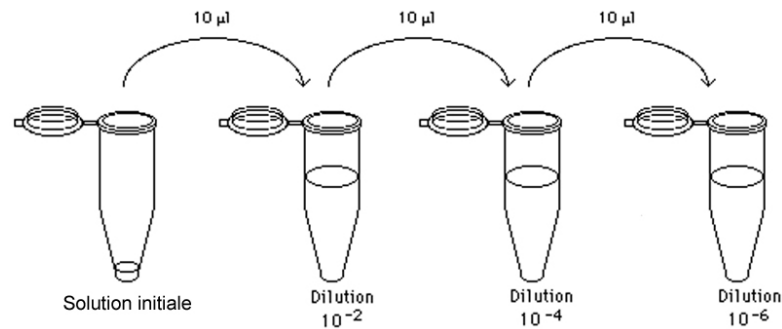


FIG. C.2: Représentation schématique du protocole de dilution utile à la titration

C.3.2 Les bactériophages

Dans un premier temps, la solution à titrer est diluée en série comme décrit précédemment. Ensuite, des suspensions de bactéries sont incubées avec chaque dilution afin de permettre l'infection des bactéries par les bactériophages. L'ensemble est déposé sur du milieu de culture dans une boîte de Pétri. Enfin, on peut voir sur la boîte des taches translucides (figure C.3), c'est à dire les endroits d'infection des bactéries avec les phages. En tenant compte de la dilution, et en considérant que chaque plaque résulte de l'infection d'une bactérie par une unité phagique, la concentration de la solution titrée peut être exprimée en pfu (plaque forming unit) par mL.

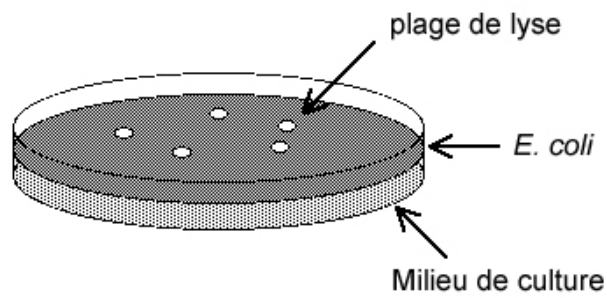


FIG. C.3: Représentation schématique du procédé de titrage de bactériophages

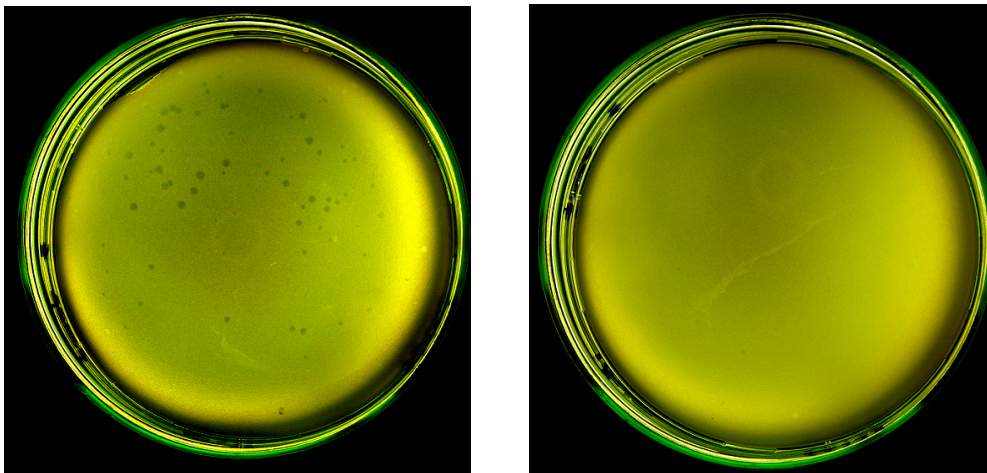


FIG. C.4: Images de boîtes de Pétri, avec dilution de phages et plaques de lyse (à gauche), et témoin (à droite).

Annexe D

Fabrication / Technologie

D.1 Le "spin-coating"

Un des intérêts des matériaux polymères est entre autres leur facilité de dépôt. Le principe de dépôt utilisé est le plus souvent le dépôt à la tournette par "spin coating" dont le principe est décrit ci-dessous (cf. figure D.1).

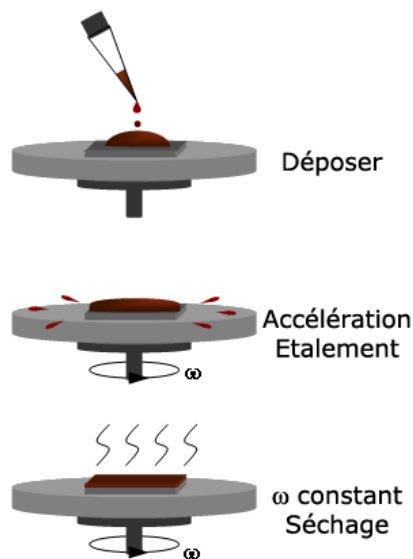


FIG. D.1: *Principe de fonctionnement du dépôt par "spin coating"*
[ISI]

Ce procédé de dépôt utilise la rotation d'un substrat autour d'un axe perpendiculaire à la surface de dépôt afin d'étaler à l'aide de forces centrifuges une petite quantité de résine sur un substrat. Le procédé comprend plusieurs étapes principales :

- Dépôt de la résine sur la plaquette ;
- Répartition de la résine sur la totalité de la surface de la plaquette par mise en rotation, et augmentation de la vitesse de rotation afin d'éliminer le surplus de résine ;
- Rotation à vitesse constante afin d'établir l'épaisseur de la résine, et durant un temps déterminé pour permettre l'évaporation des solvants.

Lors de la première étape une petite quantité de polymère, quelques millilitres, est déposée sur le wafer. Ce dépôt s'effectue selon deux principaux modes : sur le wafer immobile ou sur le wafer en rotation à faible vitesse. Le second mode offre l'avantage d'homogénéiser le volume de résine au centre du substrat (diamètre, épaisseur) et d'éliminer aussitôt le surplus de résine. Une forte accélération est ensuite appliquée à la plaquette pour favoriser la formation d'une couche uniforme sur toute la surface.

L'évaporation du solvant augmente sensiblement la viscosité de la résine dont dépend directement l'épaisseur du film. L'évaporation étant rapide, il est par conséquent nécessaire de veiller à ce que le délai d'étalement de la résine soit court. L'accélération est cependant limitée par la capacité des moteurs et la résistance mécanique des plaquettes.

Durant la dernière étape le film est mis à son épaisseur finale. La rotation s'effectue à vitesse constante car l'épaisseur est assujettie à la vitesse de rotation. La plage de vitesse de rotation se situe entre 1500 et 7000 tr.min⁻¹. Durant la rotation à grande vitesse la plus grande partie du solvant s'évapore pour finir par produire un film solide. La qualité du film dépend essentiellement de la présence ou non de défauts (poussières, manques, etc.) et de l'uniformité de son épaisseur (variations d'épaisseur, symétrie, etc.). L'épaisseur finale peut être estimée d'après la relation D.1.

$$h = \left(1 - \frac{\rho_A}{\rho_{A0}}\right) \left(\frac{3\eta m}{2\rho_{A0}\omega^2}\right)^{\frac{1}{3}} \quad (\text{D.1})$$

avec, ρ_A la masse volumique du solvant volatile (kg/m³), ρ_{A0} la valeur initiale de ρ_A (kg/m³), h l'épaisseur finale du dépôt (m), η la viscosité du produit déposé (Pa.s⁻¹), ω la vitesse angulaire de rotation (tours.min⁻¹) et m le taux d'évaporation du solvant.

Car m ne peut être déterminé que de façon empirique, une formule plus simple est donné en équation D.2

$$h = A\omega^{-B} \quad (\text{D.2})$$

Pour laquelle A et B sont des constantes à déterminer de façon empirique. Lai *et al.* [Lai79], Chen *et al.* [Che83] et Weill *et al.* [Wei86] ont indépendamment déterminé l'épaisseur de films obtenus lors de dépôt par spin coating, en utilisant des vitesses différentes. Leurs résultats s'accordent bien avec l'équation D.2, avec B compris entre 0.4 et 0.7 (dans l'équation D.1 l'exposant pour ω est 0.67).

Après ce dépôt uniforme de résine, une étape de cuisson assure l'élimination rapide d'une partie des solvants restants et la polymérisation de la matrice. Le taux de solvant passe ainsi de 20 - 30 % après le premier séchage à 4 - 7 %. Cela a pour conséquence un retrait volumique de la résine qui engendre une perte d'épaisseur de l'ordre de 10 %. Le taux de solvant résiduel influe notamment sur le développement : plus ce taux est faible et plus la dissolution de la résine est rapide.

Le chauffage des plaquettes peut s'effectuer selon différents modes. Le plus employé utilise un système de plaques chauffantes (hot-plates) sur lesquelles sont disposées les plaquettes. La température est souvent supérieure à 100°C et la durée du cycle est très courte (30 - 60 s) et ajustée pour atteindre le taux d'évaporation de solvant désiré. Le principe de chauffage par hot-plate se décline en deux variantes : celle par contact, où la transmission de chaleur se fait par conduction, et celle par proximité, où cette fois la plaquette reste positionnée à faible distance de la plaque chauffante, la transmission se faisant par convection.

D.2 Les micro cellules en PDMS

La fabrication des moules consiste à structurer par lithographie classique UV des motifs en résine sur un wafer de silicium (cf. figure D.2). Les moules des cavités sont obtenus en structurant un dépôt d'une résine épaisse, notamment la MicroChem SU8. Cette résine photosensible est déposée par "spin-coating" sur un wafer de silicium. Le film négatif des canaux est positionné sur le wafer du silicium, puis l'ensemble est irradié sous une lampe UV (longueur d'onde 365 nm). Les parties exposées à la lumière réticulent et s'ancrent au substrat de silice. Le polymère non réticulé est solubilisé dans un liquide de développement adapté (le propylène glycol méthyl ether acetate). Le wafer avec les canaux en relief constitue le moule de notre dispositif.

Le PDMS avec son durcisseur (Sylgard 184, Dow Corning) est versé sur le moule puis est réticulé à 65°C pendant une heure en étuve. Une fois réticulé, le PDMS qui est retiré du moule possède l'empreinte des canaux en creux. Ce dispositif en PDMS est ensuite collé sur le capteur. Le collage s'effectue par liaison chimique en créant des radicaux sur les surfaces de verre et de PDMS à mettre en contact grâce à une lampe UV. Les canaux sont ensuite laissés une journée à 65°C afin de finir et de renforcer le collage.

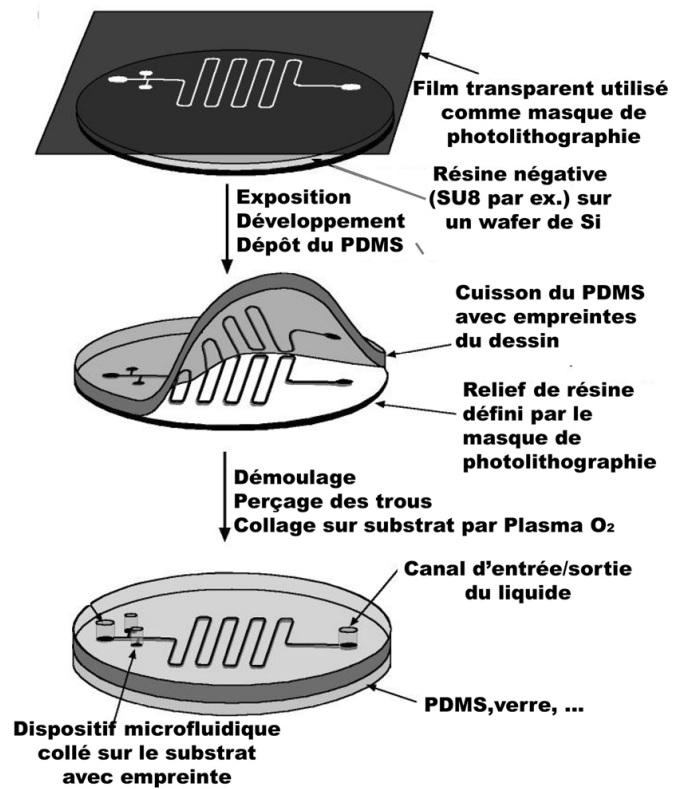


FIG. D.2: *Technique de fabrication d'une cellule microfluidique en PDMS [Whi00]*

Annexe E

Glossaire

Acide aminé (ou Aminoacide) Molécule organique portant un groupement chimique carboné COOH (fonction acide) et un groupement chimique azoté NH₂ (fonction amine). Les acides aminés sont les monomères constitutifs des protéines.

ADN (Acide DésoxyriboNucléique, DNA en anglais) Acide nucléique caractéristique des chromosomes, constitué de deux brins enroulés en double hélice et formés chacun d'une succession de nucléotides. Porteur de l'information génétique, l'ADN assure le contrôle de l'activité des cellules.

Affinité Force de liaison d'un site moléculaire à son ligand. Dans le cas d'une interaction antigène-anticorps, c'est la constante d'association qui mesure la force et la stabilité de la liaison entre le paratope et l'épitope.

Albumine Substance organique protéique, visqueuse à l'état pur, soluble dans l'eau, coagulable par la chaleur, contenue dans le blanc d'œuf, le plasma sanguin et le lait. Dans les analyses immunochimiques, l'albumine de sérum bovin (BSA) est utilisée à concentration élevée pour adhérer à tous les sites libres de la surface (saturation) et éviter la rétention non spécifique des anticorps et des ligands.

Amide voir Liaison amide.

Anaérobie On appelle milieu anaérobie un milieu où il n'y a pas présence de dioxygène (O₂). Un organisme ou un mécanisme anaérobie n'a pas besoin d'air ou d'oxygène pour fonctionner.

Analyte Composé à analyser.

Anticorps (voir aussi immunoglobuline) Substance protéique (immunoglobuline) synthétisée par les cellules du système immunitaire en réaction à l'introduction d'une substance étrangère, antigène, sur lequel elle se fixe spécifiquement pour en neutraliser l'effet toxique.

Anticorps monoclonal Voir Monoclonal.

Antigène Substance chimique isolée ou portée par une cellule ou un micro-organisme (molécule, hormone, virus, bactérie), qui, introduite dans l'organisme, est susceptible de provoquer une réaction spécifique du système immunitaire (production d'anticorps) visant à la détruire ou à la neutraliser. L'antigène est également capable de réagir avec l'anticorps qu'il a fait apparaître.

ARN (Acide RiboNucléique, RNA en anglais) Macromolécule biologique formée d'une seule chaîne de nucléotides, indispensable à la synthèse des protéines à partir du programme génétique porté par l'ADN.

Bacille Bactérie de forme allongée dite en bâtonnet, dont de nombreuses espèces sont pathogènes : Bacille d'Eberth (typhoïde), Bacille de Koch (tuberculose), Bacille du charbon, Bacille intestinal (Colibacille, Nom scientifique : *Escherichia coli* ou *E. coli*).

Bactérie Formées le plus souvent d'une cellule unique et ne comportant pas de noyau, les bactéries sont les plus petits organismes autonomes (de 1 à 5 micromètres), capables de se reproduire par division cellulaire. Elles peuvent vivre en saprophytes (se nourrissant de substances organiques en provoquant leur décomposition dans les sols, eaux ou organismes vivants) ou comme parasites de l'homme, des animaux et des plantes. Bactérie de forme arrondie (-coque), en forme de bâtonnet (Bacille), spiralée (Spirille, spirochète).

Bactériophage Virus infectant les bactéries. On dit aussi phage.

Biocapteur Dispositif mettant en jeu des interactions biologiques couplées à un transducteur qui délivre, à partir de l'évènement de reconnaissance, un signal physique mesurable.

BSA (Bovine Serum Albumin) Albumine de sérum bovin habituellement utilisée dans les analyses immunologiques pour bloquer les sites non spécifiques de fixation des protéines (voir albumine).

Catalyse Modification (surtout accélération) de la vitesse d'une réaction chimique sous l'effet d'une substance (catalyseur) qui intervient dans la réaction et qui est régénérée à la fin de celle-ci. La catalyse abaisse la barrière d'énergie que doivent franchir les réactants. Les enzymes régissent les processus de catalyse.

Chromosome Élément du noyau des cellules, formé d'une longue molécule d'ADN associée à des protéines.

Couche sensible Partie biosélective du biocapteur.

Dalton (Da) Unité de masse égale au douzième de la masse d'un atome de carbone 12 (C^{12}), soit $1,6605 \cdot 10^{-27}$ kg. Le dalton est utilisé pour exprimer la masse des molécules protéiques. La masse molaire de l'élément est calculée en multipliant sa masse en daltons par la constante d'Avogadro, soit $6,02 \cdot 10^{23}$. Ainsi, un élément de 1 Da aura une masse molaire de $1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Densité optique (DO) La densité optique, notée DO, correspond à une mesure d'absorption d'un milieu coloré à l'aide d'un spectrophotomètre émettant un faisceau d'ondes monochromatiques, qui permet de déterminer la concentration d'une substance grâce à la loi de Beer-Lambert : $DO = \varepsilon \cdot L \cdot C$, avec ε l'absorbance (m^{-1}), L l'épaisseur du milieu coloré (m) et C la concentration (%), ou bien ? le coefficient d'extinction molaire caractéristique de la substance étudiée à la longueur d'onde utilisée ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), L l'épaisseur de la solution (cm) et C la concentration ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Méthode immunologique d'analyse dans laquelle des antigènes ou des anticorps sont détectés, après liaison à une phase solide, à l'aide d'un ligand couplé à une enzyme. Cette enzyme de marquage, en présence de son substrat spécifique et d'un chromogène destiné à réagir sur le produit de la réaction, provoque la formation d'une espèce colorée dont la mesure de la densité optique (DO), ou absorbance, au bout d'un temps donné, donne une indication sur la quantité d'antigène fixé.

Enzyme Substance protéinique de l'organisme (suff. *-ase*), constituée d'une longue chaîne structurée à partir de 20 acides aminés différents, et qui accélère (catalyse) spécifiquement une réaction biochimique. Il y a six classes d'enzymes : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases.

Épitope (ou déterminant antigénique) Structure présente à la surface d'une molécule d'antigène, capable de se combiner à une seule molécule d'anticorps. Un antigène peut posséder différents épitopes et donc être reconnu par différents anticorps.

***Escherichia coli* (*E. coli*)** Colibacilles gram négatif, anaérobies facultatifs, très répandus, vivant normalement dans l'intestin mais pouvant contaminer l'environnement. Ces bactéries, habituellement non pathogènes, sont parfois source d'infection (gastro-entérites, infections urinaires, etc.) et sont utilisées couramment par la recherche biologique et médicale.

Gène Segment d'ADN transmis héréditairement et participant à la synthèse d'une molécule fonctionnelle. Ce produit final du gène est généralement une protéine, correspondant à un caractère déterminé, produite par l'intermédiaire d'un ARN messager. Mais les gènes peuvent aussi produire des ARN non messagers, ne véhiculant pas une information destinée à la production de protéines, mais fonctionnant en tant que molécules autonomes dans les cellules.

Glycine Nom courant de l'acide aminoacétique, la glycine est un des 20 acides aminés entrant dans la composition des protéines.

Glycoprotéine Protéine combinée à un glucide.

Glucide Voir sucre.

Immunoglobulines Terme générique désignant l'ensemble des globulines sériques (du plasma sanguin) constituant les anticorps. Elles sont réparties en cinq classes selon la structure de leurs chaînes lourdes : IgG (isotype gamma), IgA (isotype alpha), IgM (isotype mu), IgD (isotype delta) et IgE (isotype epsilon). Les plus étudiées et les plus simples, représentant 80% des anticorps, sont les immunoglobulines de type G (IgG), de masse molaire environ 150 kDa, formées de 4 chaînes protéiques (2 lourdes, notées H, de masse molaire M = 50 kDa, portant des résidus glucidiques, et 2 légères, notées L, M

= 25 kDa), liées par des liaisons disulfures. Ces chaînes protéiques, repliées, confèrent à l'anticorps une forme globale ressemblant à un " Y ", dont les extrémités des deux bras identiques, ou paratopes, sont les sites de combinaison spécifique à l'épitope de l'antigène cible. Ces deux bras sont reliés par une région charnière à une partie fixe. Une molécule d'IgG occupe un volume d'environ 15x5x5 nm³ mais ces dimensions peuvent varier du fait de la flexibilité de la région charnière.

Immuncapteur Biocapteur analysant des interactions immunochimiques entre un antigène et un anticorps.

DL50, dose létale 50 Dose unique déterminée statistiquement, qui entraîne la mort chez 50% des animaux en expérience, le xénobiotique est administré généralement en dose unique par voie orale, pulmonaire ou dermique.

Liaison amide (ou liaison peptidique) Liaison covalente entre un groupement chimique carboné COOH (fonction acide carboxylique) et un groupement chimique azoté NH₂ (fonction amine primaire).

Liaison covalente Liaison chimique de forte énergie, donc stable, dans laquelle chacun des atomes liés met en commun un ou plusieurs électrons de ses couches externes.

Liaison faible Liaison chimique de basse énergie comme les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques, les forces de van der Waals et les interactions électrostatiques.

Lyse bactérienne Destruction de la cellule bactérienne par un agent physique, chimique ou biologique.

Monoclonal (anticorps) Anticorps issu d'un unique clone cellulaire et dirigé contre un seul déterminant antigénique.

Nucléotide Nom courant donné aux constituants de l'ADN ou de l'ARN, formés d'une base azotée liée à un sucre (ribose pour l'ARN et désoxyribose pour l'ADN) et à groupement phosphate. Les nucléotides sont associés par leur extrémité phosphate, qui forme le squelette de la chaîne (ADN ou ARN).

Organite En biologie cellulaire, le terme organite désigne différentes structures spécialisées contenues dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et délimitées par une membrane.

Paratope Partie variable de la molécule d'anticorps, constituant le site de la combinaison spécifique un déterminant antigénique (épitope). Un anticorps possède deux paratopes identiques (les extrémités des deux bras du " Y ").

PBS (Phosphate Buffer Saline) Solution tamponnée à base phosphate, de NaCl et de KCl, dont la composition permet d'obtenir des conditions de pH et de pression osmotique proches des conditions physiologiques (ex. : pH = 7,4 pour NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, tampon phosphate 0,01 M).

Peptide Chaîne d'acides aminés reliés par des liaisons amides, ou liaisons peptidiques.

Phase exponentielle de croissance Phase de la croissance bactérienne pendant laquelle le taux de croissance est maximum et la masse cellulaire représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

Physisorption Adsorption physique conservant l'identité de la molécule adsorbée. Première étape (et parfois la seule) de l'adsorption, elle met en jeu des interactions de type force de van der Waals, forces polaires et liaisons hydrogènes entre la surface du solide et les molécules adsorbées.

Polyclonal (anticorps) Un anticorps polyclonal issu d'un organisme est obtenu en collectant les anticorps présents dans cet organisme.

Polypeptide Association de peptides reliés par des ponts disulfures.

Protéine Macromolécule constituée de longues chaînes d'acides aminés (polypeptide) qui se replient sur elles-mêmes et adoptent des conformations très spécifiques dans l'espace. Les protéines sont issues de la traduction du code génétique et assurent un grand nombre de fonctions dans la cellule (fonctions structurales, enzymatiques, signalisation cellulaire. . .).

Pseudomonas Bacilles gram négatifs, aérobies strictes, dont certaines espèces sont pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes. Ces bactéries sont largement impliquées dans les infections nosocomiales, et souvent multi-résistantes aux antibiotiques.

Spécificité Capacité d'un récepteur à distinguer son ligand des autres espèces présentes.

Streptocoques Bactéries de forme arrondie (cocci), gram positifs, aérobies facultatifs, disposées par paires ou par chaînettes. Elles peuvent être commensaux ou parasites de l'homme (et des animaux) et plusieurs espèces peuvent développer un fort pouvoir pathogène à l'origine d'infections diverses (impétigo, angines, méningites, septicémies).

Sucre Les sucres ou glucides (hydrates de carbone $C_n(H_{2O})_m$) sont un groupe de substances naturelles comportant un groupement carbonyle (aldéhyde ou cétone) et plusieurs groupes hydroxyles. Cette famille comprend les sucres simples (monosaccharides ou oses), ne comportant qu'une chaîne carbonée sans ramification, et leurs polymères, oligo et polysaccharides, formés d'un très grand nombre d'oses, comme l'amidon, la cellulose, le glycogène. Notons également les dextrans, polysaccharides bactériens, qui forment en présence d'eau des mucilages visqueux ou des gels qui, après réticulation chimique, sont utilisés pour la séparation chromatographique des macromolécules.

Tampon Système formé par une solution d'un sel d'acide fort avec une base faible, ou d'un sel d'acide faible avec une base forte, dont le pH varie peu lors de l'addition d'un produit basique ou acide.

Titrage / Titration Quantification des espèces présentes dans une suspension biologique.

Toxine Substance toxique élaborée par un organisme vivant (champignon vénéneux, bactérie, insecte ou serpent venimeux) auquel elle confère son pouvoir pathogène, et agissant comme antigène (en provoquant la production d'anticorps).

Virus Micro-organisme infectieux très petit, constitué essentiellement de protéines (enveloppe) et d'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN), ne pouvant se multiplier qu'en utilisant les fonctions enzymatiques et métaboliques de la cellule d'un autre organisme vivant (parasite obligatoire).

Xénobiotique Substance possédant des propriétés toxiques, même à très faible concentration.

Bibliographie

- [And93] J. C. ANDLE : *An experimental and theoretical analysis of acoustic plate mode devices for biosensors applications.*, Thèse de doctorat, Université du Maine, 1993.
- [Aul90] B. AULD : *Acoustic fields and waves in solids*, Second Edition – Robert E. Krieger, Publishing Company, 1990.
- [Baa06] H. BAAC, J. P. HAJÓS, J. LEE, D. KIM, S. J. KIM et M. L. SHULER : *Antibody-based surface plasmon resonance detection of intact viral pathogen*, *Biotechnology and Bioengineering*, 94 ; 815–819, 2006.
- [bac] Image disponible à l'adresse suivante : <http://www.genoscope.cns.fr/externe/HistoireBM>.
- [Bad] A. BADIA : *Groupe Physical and Analytical Chemistry de l'Université de Montréal au Canada*, partie du cours d'Antonella Badia. Image disponible à l'adresse suivante : <http://www.esi.umontreal.ca/~badias/biocapteurs.pdf>.
- [Bae04] Y. BAE, B.-K. OH, W. LEE, W. LEE et J.-W. CHOI : *Immunosensor for detection of legionella pneumophila based on imaging ellipsometry*, *Materials Science and Engineering C*, 24 ; 61–64, 2004.
- [Bal97] D. BALLANTINE, R. WHITE, S. MARTIN et *et al.* : *Acoustic wave sensors – Theory, design and physico-chemical applications*, Academic Press, 1997.
- [Ben03] F. BENDER, N. BARIÉ, G. ROMOUDIS, A. VOIGT et M. RAPP : *Development of a preconcentration unit for a SAW sensor micro array and its use for indoor air quality monitoring*, *Sensors and Actuators B*, 93 ; 135–141, 2003.
- [Ber06a] D. BERDAT, A. MARIN, F. HERRERA et M. A. GIJS : *DNA biosensor using fluorescence microscopy and impedance spectroscopy*, *Sensors and Actuators B*, 118 ; 53–59, 2006.

- [Ber06b] E. BERKENPAS, P. MILLARD et M. PEREIRA DA CUNHA : *Detection of Escherichia coli O157 :H7 with langasite pure shear horizontal surface acoustic wave sensors*, Biosensors and Bioelectronics, 21 ; 2255–2262, 2006.
- [Bon01] C. BONGIOVANNI, T. FERRI, A. POSCIA, M. VARALLI, R. SANTUCCI et A. DESIDERI : *An electrochemical multienzymatic biosensor for determination of cholesterol*, Bioelectrochemistry, 54 ; 17–22, 2001.
- [Boo03] C. BOOZER, Q. YUA, S. CHEN, C.-Y. LEE, J. HOMOLA, S. S. YEE et S. JIANG : *Surface functionalization for self-referencing surface plasmon resonance (SPR) biosensors by multi-step self-assembly*, Sensors and Actuators B, 90 ; 22–30, 2003.
- [Bra04] D. W. BRANCH et S. M. BROZIK : *Low-level detection of a Bacillus anthracis simulant using Love-wave biosensors on 36°YX LiTaO₃*, Biosensors and Bioelectronics, 19 ; 849–859, 2004.
- [Cam06] G. A. CAMPBELL et R. MUTHARASAN : *PEMC sensor's mass change sensitivity is 20 pg/Hz under liquid immersion*, Biosensors and Bioelectronics, 22 ; 35–41, 2006.
- [Cha06] K.-S. CHANG, H.-D. JANG, C.-F. LEE, Y.-G. LEE, C.-J. YUAN et S.-H. LEE : *Series quartz crystal sensor for remote bacteria population monitoring in raw milk via the internet*, Biosensors and Bioelectronics, 21 ; 1581–1590, 2006.
- [Cha07] H.-W. CHANG et J.-S. SHIH : *Surface acoustic wave immunosensors based on immobilized C60-proteins*, Sensors and Actuators B, 121 ; 522–529, 2007.
- [Che83] B. CHEN : *Investigation of the solvent-evaporation effect on spin coating of thin films*, Polymer Engineering and Science, 23 ; 399–403, 1983.
- [Dar99] M. DARDER, K. TAKADA, F. PARIENTE, E. LORENZO et H. ABRUN : *Dithiobissuccinimidyl propionate as an anchor for assembling peroxidases at electrodes surfaces and its application in a H₂O₂ biosensor*, Analytical Chemistry, 71 ; 5530–5537, 1999.
- [Déj94] C. DÉJOURS : *Capteurs acoustiques à modes de plaque transverses horizontaux. Application à la détection en milieux liquides et gazeux*, Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 1994.
- [Déj05] C. DÉJOURS : *Contribution à l'étude de microcapteurs à ondes acoustiques visant la biodétection rapide sur site*, Diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches de l'Université Bordeaux 1, 2005.

- [Dos05] J. DOSTÁLEK, H. VAISOCHEROVÁ et J. HOMOLA : *Multichannel surface plasmon resonance biosensor with wavelength division multiplexing*, *Sensors and Actuators B*, 108 ; 758–764, 2005.
- [Du98] J. DU et G. L. HARDING : *A multilayer structure for Love-mode acoustic sensors*, *Sensors and Actuators A*, 65 ; 152–159, 1998.
- [Est99] I. ESTEBAN : *Etude et intégration de capteurs acoustiques à modes de plaque transverses horizontaux (SH-APM). Application à la détection de gaz organophosphorés*, Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 1999.
- [Fuj02] T. FUJII : *Pdms-based microfluidic devices for biomedical applications*, *Microelectronic Engineering*, 61–62 ; 907–914, 2002.
- [Ghi96] A. L. GHINDILIS, T. G. MORZUNOVA, A. V. BARMIN et I. N. KUROCHKIN : *Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis*, *Biosensors and Bioelectronics*, 11 ; 873–880, 1996.
- [Giz97] E. GIZELI : *Design considerations for the acoustic waveguide biosensor*, *Smart Materials and Structures*, 6 ; 700–706, 1997.
- [Giz00] E. GIZELI : *Study of the Sensitivity of the Acoustic Waveguide Sensor*, *Analytical Chemistry*, 72 ; 5967–5972, 2000.
- [Giz03] E. GIZELI, F. BENDER, A. RASMUSSEN, K. SAHA, F. JOSSE et R. CERNOSEK : *Sensitivity of the acoustic waveguide biosensor to protein binding as a function of the waveguide properties*, *Biosensors and Bioelectronics*, 18 ; 1399–1406, 2003.
- [Gor04] L. GORDON : *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, Elsevier, 2004.
- [Har97] G. HARDING, J. DU, P. DENCHER, D. BARNETT et E. HOWE : *Love wave acoustic immunosensor operating in liquid*, *Sensors and Actuators A*, 61 ; 279–286, 1997.
- [Hay01] O. HAYDEN et F. L. DICKERT : *Selective microorganism detection with cell surface imprinted polymers*, *Advanced Materials*, 13 ; 1480–1483, 2001.
- [Hom03] J. HOMOLA : *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*, *Anal Bioanal Chem*, 377 ; 528–539, 2003.
- [Hu06] W. HU, H.-Y. HSUB, A. CHIOU, K. TSENG, H.-Y. LIN, G. CHANGA et S.-J. CHEND : *Immunodetection of pentamer and modified c-reactive protein using surface plasmon resonance biosensing*, *Biosensors and Bioelectronics*, 21 ; 1631–1637, 2006.

- [INs] INSTITUT SCIENTIFIQUE DE RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) : *Lactobacillus sakei* : une bactérie bénéfique pour la conservation de la viande, image disponible à l'adresse suivante : <http://www.inra.fr/var/plain/storage/htmlarea/5177/lacto.jpg>.
- [ISI] ISIC : *Institute of Chemical Sciences and Engineering*, image disponible à l'adresse suivante : <http://ssg.epfl.ch/dev-prep.html>.
- [Iwa01] Y. IWASAKI, T. HORIUCHI et O. NIWA : *Detection of Electrochemical Enzymatic Reactions by Surface Plasmon Resonance Measurement*, *Analytical Chemistry*, 73 ; 1595–1598, 2001.
- [Jos01] F. JOSSE, F. BENDER et R. W. CERNOSEK : *Guided Shear Horizontal Surface Acoustic Wave Sensors for Chemical and Biochemical Detection in Liquids*, *Analytical Chemistry*, 73 ; 5937–5944, 2001.
- [Kin64] W. KING : *Piezoelectric sorption detector*, *Analytical Chemistry*, 36 ; 1735–1739, 1964.
- [Koo03] A. KOOSER, K. MANYGOATS, M. EASTMAN et T. PORTER : *Investigation of the antigen antibody reaction between anti-bovine serum albumin (a-BSA) and bovine serum albumin (BSA) using piezoresistive microcantilever based sensors*, *Biosensors and Bioelectronics*, 19 ; 503–508, 2003.
- [Kre90] D. V. KREVELEN : *Properties of polymers*, p. 374, Elsevier, 1990.
- [Kun] D. KUNKEL : Image disponible à l'adresse suivante : http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/obr/escherichia_coli_1.htm.
- [Kus03] W. KUSNEZOW, A. JACOB, A. WALIJEV, F. DIEHL et J. HOHEISEL : *Antibody microarrays : An evaluation of production parameters*, *Proteomics*, 3 ; 254–264, 2003.
- [Lai79] J. LAI : *An investigation of spin coating of electron resists*, *Polymer Engineering and Science*, 19 ; 1117–1121, 1979.
- [Lak04] B. LAKARD, G. HERLEM, S. LAKARD, A. ANTONIOU et B. FAHYS : *Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films*, *Biosensors and Bioelectronics*, 19 ; 1641–1647, 2004.
- [Leh03] H.-P. LEHR, M. REIMANN, A. BRANDENBURG, G. SULZ et H. KLAPPROTH : *Real-Time Detection of Nucleic Acid Interactions by Total Internal Reflection Fluorescence*, *Analytical Chemistry*, 75 ; 2414–2420, 2003.
- [Li04] T. LI, Z. YAO et L. DING : *Development of an amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized through silica sol.gel*

- film onto Prussian Blue modified electrode*, Sensors and Actuators B, 101 ; 155–160, 2004.
- [Lie] B. LIEDBERG : *Groupe Sensor Science and Molecular Physics de l'Université de Linköpings en Suède*, image disponible à l'adresse suivante : [http ://www.ifm.liu.se/applphys/sensor/](http://www.ifm.liu.se/applphys/sensor/).
- [Liu03] F. LIU, Y. ZHANG et Z.-c. OU-YANG : *Flexoelectric origin of nanomechanic deflection in DNA-microcantilever system*, Biosensors and Bioelectronics, 18 ; 655–660, 2003.
- [MAC] MACOM : *Datasheet de l'atténuateur smg1*, disponible sur la site Internet de M/A-COM : [http ://www.macom.com](http://www.macom.com).
- [Mar00] S. MARTINOIA et G. MASSOBRIO : *A behavioral macromodel of the isfet in spice*, Sensors and Actuators B, 62 ; 182–189, 2000.
- [Mau06] E. MAURIZ, A. CALLE, J. MANCLÚS, A. MONTOYA, A. ESCUELA, J. SENDRA et L. LECHUG : *Single and multi-analyte surface plasmon resonance assays for simultaneous detection of cholinesterase inhibiting pesticides*, Sensors and Actuators B, 118 ; 399–407, 2006.
- [Maz05] P. MAZEIN : *Étude de dispositifs à ondes de Love par modélisation numérique de la propagation d'ondes acoustiques. Application à l'optimisation de structures et à la caractérisation de matériaux en vue de la réalisation de capteurs chimiques.*, Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 2005.
- [Min] MINISTÈRE DE LA SANTÉ : *indicateur composite des activités de lutte contre les infections nosocomiales (ICALIN)*, plus d'informations sur l'ISCALIN sur le site du ministère de la Santé : [http ://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/nosoco/tab_bord/accueil.htm](http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/nosoco/tab_bord/accueil.htm).
- [Mit02] A. S. MITTELMANN, E. Z. RON et J. RISHPON : *Amperometric Quantification of Total Coliforms and Specific Detection of Escherichia coli*, Analytical Chemistry, 74 ; 903–907, 2002.
- [Raz05] F. RAZAN : *Etude de microcapteurs à ondes acoustiques dédiés à la détection fine de produits chimiques à l'échelle laboratoire et industrielle. Application à la détection de monomères résiduels et à la mesure de cinétique en réacteurs.*, Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 2005.
- [Reb92] D. REBIÈRE : *Capteurs à ondes acoustiques de surface. Application à la détection des gaz*, Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 1992.
- [Ric97] J. RICKERT, A. BRECHT et W. GÖPEL : *Qcm Operation in Liquids : Constant Sensitivity during Formation of Extended Protein Multilayers by Affinity*, Anal. Chem., 69 ; 1441–1448, 1997.

- [San] SANDIA NATIONAL LABORATORIES : *Biotechnology capabilities*, disponible sur la site Internet de Sandia National Laboratories : <http://www.sandia.gov/capabilities/biosciences/BioTechnologies.pdf>.
- [Sau59] G. SAUERBREY : *Verwendung von schwingquarzen zur wagung duenner schichten und fur mikro-waegung*, Z. Phys., 155 ; 206–222, 1959.
- [Sch95] N. SCHMITT : *Fonctionnalisation de la microbalance à quartz et fixation covalente d'anticorps : application aux immunocapteurs gravimétriques*, Thèse de doctorat, Université François Rabelais (Tours), 1995.
- [Slo73] SLOBODNIK : *Acoustic wave handbook*, Edition Masson, 1973.
- [Soc] SOCIÉTÉ CONCENTRIS : *Cantisens Research Cantilever Sensor Platform*, image disponible à l'adresse suivante : <http://www.concentris.ch/>.
- [Sol02] A. P. SOLDATKIN, J. MONTORIOL, W. SANT, C. MARTELET et N. JAFFREZIC-RENAULT : *Creatinine sensitive biosensor based on ISFETs and creatinine deiminase immobilised in BSA membrane*, Talanta, 58 ; 351–357, 2002.
- [Sub06] A. SUBRAMANIAN, J. IRUDAYARAJ et T. RYAN : *A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of E. coli O157:H7*, Biosensors and Bioelectronics, 21 ; 998–1006, 2006.
- [Sum05] S. SUMIDA, S. OKAZAKI, S. ASAKURA, H. NAKAGAWA, H. MURAYAMA et T. HASEGAWA : *Distributed hydrogen determination with fiber-optic sensor*, Sensors and Actuators B, 108 ; 508–514, 2005.
- [Tam02] O. TAMARIN : *Étude de capteurs à ondes de Love pour applications en milieu liquide. Cas de la détection de bactériophages en temps réel*, Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 2002.
- [Tay05] A. D. TAYLOR, Q. YU, S. CHEN, J. HOMOLA et S. JIANG : *Comparison of E. coli O157:H7 preparation methods used for detection with Surface Plasmon Resonance sensor*, Sensors and Actuators B, 107 ; 202–208, 2005.
- [TB] P.-F. TENIERE-BUCHOT : *Le développement durable et l'eau.*, séances publiques de l'Académie des Sciences Morales et Politiques du 28 janvier 2002.
- [Tri06] V. S. TRIPATHI, V. K. BABU et H. JU : *Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on ferrocene-bovine serum albumin and*

- multiwall carbon nanotube modified ormosil composite*, Biosensors and Bioelectronics, 21 ; 1529–1535, 2006.
- [Tsu99] V. TSUKRUK, I. LUZINOV et D. JULTHONGPIPUT : *Sticky Molecular Surfaces : Epoxysilane Self-Assembled Monolayers*, Langmuir, 15 ; 3029–3032, 1999.
- [vir] *Informationen zur vogelgrippe - virus*, site allemand d'information sur le virus de la grippe aviaire disponible à l'adresse suivante : <http://www.vogelgrippe.es/virus.shtml>.
- [Wei86] A. WEILL : *The Physics and Fabrication of Microstructures and Microdevices*, AKelly M.J. und C. Weisbuch, 1986.
- [Whi00] G. WHITESIDES et A. STROOCK : *Flexible Methods for Microfluidics*, Physics Today, 54 ; 42, 2000.
- [Woh79] H. WOHLTJEN et R. DESSY : *Surface acoustic wave probe for chemical analysis*, Analytical Chemistry, 51 ; 1458–1475, 1979.
- [Wol04] O. S. WOLFBEIS : *Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors*, Anal. Chem., 76 ; 3269–3284, 2004.
- [Wu00] C.-L. WU, J.-C. CHOU, W.-Y. CHUNG, T.-P. SUN et S.-K. HSIUNG : *Study on $\text{SnO}_2/\text{Al}/\text{SiO}_2/\text{Si}$ ISFET with a metal light shield*, Materials Chemistry and Physics, 63 ; 153–156, 2000.
- [Wu03] H. WU, T. W. ODOM, D. T. CHIU et G. M. WHITESIDES : *Fabrication of Complex Three-Dimensional Microchannel Systems in PDMS*, Journal of American Chemical Society, 125 ; 554–559, 2003.
- [Yan03] L. YANG, C. RUAN et Y. LI : *Detection of viable Salmonella typhimurium by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance*, Biosensors and Bioelectronics, 19 ; 495–502, 2003.
- [Yan04] L. YANG, Y. LI et G. F. ERF : *Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of Escherichia coli O157 :H7*, Analytical Chemistry, 76 ; 1107–1113, 2004.
- [Zha05] J. ZHAO, W. ZHU et F. HE : *Rapidly determining E. coli and P. aeruginosa by an eight channels bulk acoustic wave impedance physical biosensor*, Sensors and Actuators B, 107 ; 271–2767, 2005.
- [Zim02a] C. ZIMMERMANN : *Conception, réalisation et étude de microcapteurs à ondes de Love pour applications en milieu gazeux. Cas de la détection de composés organophosphorés*, Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 2002.

- [Zim02b] C. ZIMMERMANN, D. REBIÈRE, C. DÉJOURS, J. PISTRÉ et R. PLANADE : *Love-waves to improve chemical sensors sensitivity : theoretical and experimental comparison of acoustic modes*, IEEE International Frequency Control Symposium, p. 281–283, 2002.

Liste des publications relatives à ces travaux

Articles de revues avec comité de lecture

- [1] Nicolas Moll, Emilie Pascal, Duy-Haï Dinh, Jean-Paul Pillot, Bernard Bennetau, Dominique Rebière, Daniel Moynet, Yan Mas, Djavad Mossalayi, Jacques Pistré, et Corinne Déjous. A love wave immunosensor for whole e. coli bacteria detection using an innovative two steps immobilisation approach. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 :2145–2150, 2007.

Communication dans des congrès avec actes publiés

- [2] Nicolas Moll, Duy-Haï Dinh, Emilie Pascal, Corinne Déjous, Jean-Paul Pillot, Bernard Bennetau, Dominique Rebière, Daniel Moynet, Yan Mas, et Jacques Pistré. Enhancement of antibody binding on sio₂ love wave sensor surface using (3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane. *Material Research Society (MRS) Spring Meeting 2006, San Francisco*, 2006.
- [3] Nicolas Moll, Corinne Déjous, Dominique Rebière, Jacques Pistré, et Roger Planade. An improved love-wave oscillator for low concentration chemical sensing application. *proceedings of DCIS 2004, Bordeaux, France*, pages 276–280, 2004.
- [4] Nicolas Moll, Corinne Déjous, Dominique Rebière, Céline Zimmermann, et Jacques Pistré. Détection d'espèces biologiques en milieu liquide. *JNRDM 2005, Paris*, pages 91–93, 2005.
- [5] Nicolas Moll, Emilie Pascal, Duy-Haï Dinh, Corinne Déjous, Jean-Paul Pillot, Bernard Bennetau, Céline Zimmermann, Dominique Rebière, Daniel Moynet, Yan Mas, et Jacques Pistré. Comparison of different me-

thods to bind antibodies for biological detection using Love wave sensors. *Proceedings of EurosensorsXIX*, 2005.

- [6] Nicolas Moll, Emilie Pascal, Duy-Haï Dinh, Jean-Paul Pillot, Dominique Rebière, Daniel Moynet, Jacques Pistré, Bernard Bennetau, et Corinne Déjous. An innovative sensing method for rapid detection of whole bacteria with love acoustic wave biosensors. *11th International Meeting on Chemical Sensors, Brescia (Italie)*, 2006.
- [7] Nicolas Moll, Emilie Pascal, Duy-Haï Dinh, Jean-Paul Pillot, Dominique Rebière, Daniel Moynet, Jacques Pistré, Bernard Bennetau, et Corinne Déjous. Whole bacteria detection using love wave immunosensors. *Biosensors 2006, Toronto, Canada*, 2006.

Communication dans des congrès sans actes

- [8] Duy-Haï Dinh, Jean-Paul Pillot, Bernard Bennetau, Luc Vellutini, Corinne Déjous, Nicolas Moll, et Emilie Pascal. Nouveaux films moléculaires sensibles pour l'élaboration d'un microsystème de détection rapide de biomolécules. *SAJEC 2006, Balaruc-les-Bains*, 2006.
- [9] Duy-Haï Dinh, Luc Vellutini, Nicolas Moll, Emilie Pascal, Daniel Moynet, Corinne Déjous, Dominique Rebière, Jean-Paul Pillot, et Bernard Bennetau. New epoxysilane self-assembled monolayer for love wave biosensor applications. *XIV International Sol-Gel Conference, Montpellier*, 2007.
- [10] Nicolas Moll, Corinne Déjous, Jean-Luc Lachaud, Dominique Rebière, Emilie Pascal, Daniel Moynet, Luc Vellutini, Duy-Haï Dinh, Jean-Paul Pillot, Bernard Bennetau, et Yan Mas. Whole bacteria detection with guided shear horizontal surface acoustic immunosensing platform. *3as Jornadas de Encuentro Hispano Frances - Micro y Nano Tecnologia, San Sebastian*, 2006.
- [11] Nicolas Moll, Corinne Déjous, Dominique Rebière, Céline Zimmermann, et Jacques Pistré. Antibody detection using an ultra stable love wave sensor. *2èmes Journées Franco-Espagnoles CMC2-IBERNAM, Microsystèmes de détection chimique, ESTIA, Bidart, France*, 2004.
- [12] Nicolas Moll, Corinne Déjous, Dominique Rebière, Céline Zimmermann, Jacques Pistré, Daniel Moynet, et Emilie Pascal. Etude et réalisation d'un système biocapteurs à ondes de love, application à la détection de toxines, de virus ou de bactéries. *Doctoriales U. Paris 6, Ecole Polytechnique, DGA, Fréjus*, 2005.
- [13] Nicolas Moll, Emilie Pascal, Corinne Déjous, Céline Zimmermann, Dominique Rebière, Daniel Moynet, Duy-Haï Dinh, Jean-Paul Pillot, Ber-

- nard Bennetau, et Jacques Pistré. Immunocapteurs à ondes acoustiques de love : stratégies d'immobilisation des anticorps. *Journée CMC2 Doctorants et Jeunes Chercheurs, Lyon, 2005.*
- [14] Nicolas Moll, Emilie Pascal, Corinne Déjous, Céline Zimmermann, Dominique Rebière, Daniel Moynet, Luc Vellutini, Duy-Haï Dinh, Jean-Paul Pillot, Bernard Bennetau, et Jacques Pistré. Immunocapteur à ondes de love. *Réunion de printemps du CMC2, Capteurs acoustiques, Paris, 2007.*
- [15] Nicolas Moll, Emilie Pascal, Luc Vellutini, Duy-Haï Dinh, Jean-Paul Pillot, Dominique Rebière, Daniel Moynet, Bernard Bennetau, et Corinne Déjous. Détection rapide de bactéries vivantes par immunocapteur à ondes acoustiques de love. *5èmes Journées Maghreb-Europe, Les Matériaux et leurs Applications aux Dispositifs et Capteurs, Mahdia (Tunisie), 2006.*

Étude et réalisation d'un système immunocapteurs à ondes de Love : application à la détection de toxines, de virus ou de bactéries

Nous présentons une plateforme de détection rapide d'organismes biologiques à ondes acoustiques de Love, sensible à l'effet de masse. Après une revue des différentes technologies de biocapteurs, l'immunocapteur à ondes de Love, basé sur une réaction antigène / anticorps, est présenté en détail. Les études théoriques et expérimentales sur la ligne à retard à ondes de Love, l'électronique de conditionnement, avec des voies d'améliorations utilisant des matériaux polymères en particulier, sont exposées. La couche bioréceptrice d'anticorps immobilisée sur la surface du capteur par liaison covalente grâce au (3-Glycidoxypropyl)triméthoxysilane (GPTS), offre une bonne densité et uniformité, validée par immunofluorescence. Les détections montrent une bonne reproductibilité et sélectivité du capteur pour les différentes espèces testées (bactéries, bactériophages, protéines). Un seuil de détection des bactéries vivantes de type *Escherichia coli* de l'ordre de 10^6 bactéries/ml en moins d'une heure est obtenu, grâce à la mise au point d'une nouvelle stratégie immunologique d'immobilisation des bactéries utilisant un couple d'anticorps.

Mots clefs Immunocapteurs Ondes de Love Stabilité court terme
Matériaux polymères *Escherichia coli* Greffage covalent

Study and realization of Love wave based immunosensor system for toxins, viruses or bacteria detection

A rapid mass sensitive Love wave platform dedicated to biological detection is presented. This document begins with an overview of the different biosensor technologies, then the Love wave immunosensor based on the antibody/antigen affinity is described in depth. Theoretical and experimental studies about the delay line, the feedback electronic, and use of polymer material to improve the sensor performances are exposed. Both sensor responses and immunofluorescence measurements show that the biosensitive layer of antibodies is linked to the sensor surface with a good density and uniformity thanks to covalent links of the (3-Glycidoxypropyl)triméthoxysilane (GPTS) molecule. Detection experiments show good reproducibility and selectivity towards different target species (bacteria, bacteriophages or proteins). A new bacteria immobilisation method, based on the use of a couple of antibodies, enables to reach a living *Escherichia coli* detection limit of 10^6 bacteria/ml in less than one hour.

Keywords Immunosensors Love wave Short-term stability
Polymers *Escherichia coli* Covalent binding

Discipline : Électronique

Université Bordeaux 1, CNRS UMR 5218, Laboratoire IMS — Bâtiment A31
351 cours de la libération — 33405 TALENCE