HAL open science

Développement d'interfaces adaptées aux analyses biochimiques et biologiques. Application aux capteurs chimiques CHEMFETs

Marie Laure L Pourciel-Gouzy

To cite this version:

Marie Laure L Pourciel-Gouzy. Développement d'interfaces adaptées aux analyses biochimiques et biologiques. Application aux capteurs chimiques CHEMFETs. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. INSA de Toulouse, 2004. Français. NNT : . tel-00142498

HAL Id: tel-00142498

https://theses.hal.science/tel-00142498v1

Submitted on 19 Apr 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

présentée devant

L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES DE TOULOUSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT

Spécialité : Conception des Circuits Microéléctroniques et Microsystèmes

Par

Marie Laure POURCIEL-GOUZY

Développement d'interfaces adaptées aux analyses biochimiques et biologiques - Application aux capteurs chimiques CHEMFETs

Thèse dirigée par : Augustin Martinez
Pierre Temple-Boyer

Soutenue le 15 juin 2004 à LAAS-CNRS à 10 h 30

Jury :

D. BARBIER Professeur à l'INSA de Lyon
J-M. FRANCOIS Professeur à l'INSA de Toulouse
S. ISZ Société Alphamos
C. MARTELET Professeur à l'Ecole Centrale de Lyon
A. MARTINEZ Professeur à l'INSA de Toulouse
J-L. MARTY Professeur à l'Université de Perpignan
P. TEMPLE-BOYER Chargé de Recherche au CNRS

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) du CNRS à Toulouse au sein du groupe Technologie Micro et Nanostructures.

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Jean-Claude LAPRIE et Malik GHALLAB, Directeurs successifs du LAAS pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire.
Je remercie également Messieurs Gabriel BLASQUEZ et Gérard SARRABAYROUSE, responsables successifs du groupe Technologie Micro et Nanostructures.

Je suis très reconnaissante envers Monsieur Claude MARTELET, Professeur à l'Ecole Centrale de Lyon d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie très sincèrement Monsieur D. BARBIER, Professeur à l'INSA de Lyon et Monsieur Jean-Louis MARTY, Professeur à l'Université de Perpignan pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce mémoire en acceptant d'être les rapporteurs de mes travaux.

Je remercie également Monsieur Jean-Marie FRANCOIS, Professeur à l'INSA de Toulouse et Madame Sandrine ISZ, de la Société Alphamos d'avoir accepté d'examiner ces travaux et de participer à ce jury de thèse.

Je tiens maintenant à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Augustin MARTINEZ qui m'a accordé sa confiance et qui m'a donné la possibilité de « me faire un prénom » au sein du LAAS.

En même temps, je veux remercier très chaleureusement Monsieur Pierre TEMPLE-BOYER pour le temps et la patience qu'il m'a accordé tout au long de ces années et ce, malgré tous les aléas que la vie nous réserve…

Je tiens enfin à remercier Messieurs MARTINEZ et TEMPLE-BOYER pour la latitude qu'ils m'ont laissée tout au long de cette thèse, ce qui m'a permis d'orienter ces travaux de façon assez personnelle.

Je souhaite ensuite remercier tous les membres de l'équipe « capteurs chimiques » qui ont supporté mes « ralages » durant ces quelques années et surtout qui m'ont permis d'apprendre énormément : Jérôme LAUNAY bien sûr, mais aussi William SANT, Irina HUMENYUK et Benoît TORBIERO (qui va devoir me supporter encore un peu de temps).

Je n'oublie pas, non plus les habitants divers des bureaux 9a et 9b qui ont contribué à conserver une bonne ambiance dans le coin de l'ancienne imprimerie : les Laurent (Malaquin et Rabbia), Younes, Mohamed, Manu, Jérôme, Thomas…

En parlant de bureau, je voudrais également adresser un grand merci aux occupants du bureau D28 qui m'ont gracieusement hébergée à titre gratuit pendant et après la rédaction de ma thèse : bien sûr Stéphanie, qui du statut de collègue est passée au statut d amie, Benoît et Olivier.

Enfin un grand merci à tous ceux qui m'ont apporté leur aide, à un moment ou à un autre : les gens du service TEAM et en particulier Véronique CONEDERA, Thierry DOCONTO et David COLIN, Mme Nicole HIGOUNET et Monsieur Christian BERTY à qui j'adresse vraiment un mention spéciale pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je souhaite également remercier Mme Marie-Ange TESTE et l'équipe Physiologie Moléculaire Microbienne des Eucaryotes dirigée par le professeur Jean Marie François pour leur aide précieuse.

Je voudrais maintenant quitter le cadre du LAAS pour adresser le plus grand merci du monde à toute ma famille : bien sûr Laurent et Emma (même si elle ne sait pas encore pourquoi) mais aussi à mes parents et mon frère pour leur soutien et toute l'aide qu'ils ont pu m'apporter au cours de ces années. Je voudrais qu'ils soient tous assurés de ma plus grande affection…

Enfin, je n'oublie pas les amis : Marie Laure et Antoine, Cécilia et Jordi et la petite fille à venir.

Finalement ces quatre années sont certainement celles pendant lesquelles j'ai vécu le plus de belles choses jusqu'à présent…

Introduction Générale **5**
Chapitre I **11**
I Accroche directe **13**
I.1 Adsorption physique 13
I.2 Confinement 14
I.3 Dépôt par la technique de Langmuir-Blodgett 14
I.3.1 Principe 14
I.3.2 Applications 15
I.4 Liaisons covalentes 17
II Approche des polymères **19**
II.1 Définitions 19
II.2 Qu'est ce qu'un polymère ? 21
II.3 Techniques de dépôt des polymères 23
II.3.1 Dip-coating ou trempage 23
II.3.2 Spin-coating ou dépôt à la tournette 24
II.3.3 Polymérisation électrochimique et polymères conducteurs 24
II.3.3.1 Polymères conducteurs 24
II.3.3.2 Polymérisation électrochimique 25
III Intégration de l'élément biologique aux polymères **26**
III.1 Diversité des biorécepteurs 27
III.1.1 Enzymes 27
III.1.1.1 Qu'est ce qu'une enzyme ? 27
III.1.1.2 Application aux capteurs 28
III.1.2 Anticorps 29
III.1.2.1 Qu'est ce qu'un anticorps ? 29
III.1.2.2 Application aux capteurs 29
III.1.3 ADN 30
III.1.3.1 Qu'est ce que l'ADN ? 30
III.1.3.2 Les capteurs ADN 31
III.2 Utilisation des polymères pour l'immobilisation des biorécepteurs 32
III.2.1 Adsorption physique et greffage covalent 32
III.2.2 Immobilisation par piégeage ou confinement 32
III.2.2.1 Description de la méthode 32
III.2.2.2 Techniques de construction du réseau polymérique 33
IV Développement industriel **34**
IV.1 L'offre industrielle 34
IV.2 La demande 36
Bibliographie **38**

Chapitre II **45**
I Présentation des capteurs chimiques à effet de champ (ChemFETs) **47**
I.1 Principe de fonctionnement des ISFETs 48
I.1.1 Structure MOS (Métal-Oxyde-Semi-conducteur) ou MOSFET 48
I.1.2 ISFET 49
I.2 Propriétés électrochimiques de l'interface électrolyte/solide 49
I.2.1 L'électrolyte 49
I.2.2 Interface électrolyte – solide 50
I.2.3 Système Electrolyte – Isolant – Silicium (EIS) 53
I.3 Présentation des ISFETs utilisés 56
II Adaptation du capteur pH aux analyses biochimiques **58**
II.1 Principe de la mesure 58
II.2 Micro-cuves en plexiglas® 61
II.2.1 Réalisation 61
II.2.2 Résultats 62
II.3 Micro-cuves en PDMS 65
II.3.1 Présentation du Polydiméthylsiloxane 65
II.3.1.1 Caractéristiques chimiques 65
II.3.1.2 Domaines d'applications du PDMS 66
II.3.2 Conception de cuves en PDMS ouvertes 68
II.3.2.1 Réalisation des cuves 68
II.3.2.2 Résultats 69
II.3.3 Conception de cuves en PDMS fermées 71
II.3.3.1 Réalisation des cuves 71
II.3.3.2 Résultats 73
II.3.3.2.1 Etalonnage pH 73
II.3.3.2.2 Détection de l'activité en présence de glucose 74
II.4 Conclusions et perspectives 77
Bibliographie **79**
Chapitre III **81**
I Etude du principe de détection **83**
I.1 Enzymes utilisées 84
I.2 Modélisation de la variation du pH en solution lors de la réaction enzymatique 87
II Le polyvinyl alcool (PVA) **96**
II.1 Caractéristiques chimiques 96
II.2 Utilisations du PVA dans l'industrie 97
II.3 Positionnement du PVA dans le développement des biocapteurs 98
III Mise au point d'un protocole de dépôt **100**
III.1 Dépôt à la micropipette 100
III.1.1 Protocole 100

III.1.2 Résultats 101
III.2 Procédé de fabrication collective 103
III.2.1 Etude préliminaire 103
III.2.2 Etude du dépôt à la tournette 106
III.2.3 Etude de la réticulation sous UV 106
III.2.4 Résultats technologiques 109
III.2.5 Etude de dépôts multiples 113
III.2.6 Création de couches enzymatiques 115
III.2.6.1 Principe de l'étude de l'activité enzymatique 115
III.2.6.2 Résultats de l'étude de l'activité enzymatique 118
III.2.7 Application du protocole à la réalisation de capteurs enzymatiques 119
Bibliographie 123
Conclusion Générale 127
Annexes 131
Annexe 1 : Protocole d'utilisation d'une galerie API de type 20E 133
Annexe 2 : Programme en Matlab® pour le calcul du pH et des différentes concentrations lors de la dissociation de l'urée 138
Annexe 3: Protocole de mesure de l'activité enzymatique dans les plots de PVA 140
Table des abbréviations et lexique 141

Introduction Générale

Le domaine des sciences du vivant est à l'heure actuelle un des plus importants puisqu'il touche l'homme dans son environnement. En effet, que ce soit pour la connaissance du système « humain », celle des effets de la pollution environnementale sur sa santé ou encore pour les problèmes qu'il peut rencontrer au cours de sa vie dus tant à son alimentation qu'au stress engendré par de multiples causes, l'homme ne peut que tirer des bénéfices des avancées effectuées dans ce domaine.

De fait, les biologistes, dans ces dernières décennies, ont imprimé des progrès considérables à la connaissance du vivant et ont permis des avancées notables pour améliorer la santé. Si ce savoir a ainsi pu évoluer, c'est aussi, outre le facteur humain, grâce à l'amélioration des performances des outils d'analyse. Ceux-ci permettent à l'heure actuelle de déterminer plus précisément les différentes réactions intervenant entre molécules ou encore, de découvrir des moyens de se prémunir contre des agents pathogènes, par une connaissance plus approfondie de l'ADN.

Actuellement, le problème crucial qui se pose, consiste en une analyse plus rapide et plus intégrée des phénomènes qui, au sein du corps humain, peuvent résulter d'agressions différentes et multiples. Les mesures en temps réel doivent être de plus en plus développées afin de pouvoir répondre, en particulier, au principe de précaution. Il est donc nécessaire, pour optimiser ce type d'analyses, de mettre à disposition des biologistes des capteurs capables de délivrer des signaux facilement traitables en des temps très courts.

Ainsi, en parallèle de techniques optiques, chromatographiques,... couramment utilisées en analyse biologique, l'idée de mettre à disposition des capteurs « tout solide » s'est imposée grâce aux progrès de la micro-électronique. C'est ainsi que des études sur différents types de capteurs (potentiométriques, ampérométriques, optiques, mécaniques) ont vu le jour afin de pouvoir adapter à la fois, les organes de réception, de transmission et de visualisation dans des systèmes intégrés.

Par ailleurs, l'intégration demande une miniaturisation de ces différents organes de perception afin de pouvoir analyser des volumes de plus en plus faibles de manière fiable et reproductible, tout en minimisant les contraintes principalement liées au facteur temps.

En outre, l'intérêt de tels systèmes de détection est, idéalement, une mesure in-vivo, et plus particulièrement sur le corps humain. Il est donc nécessaire de pouvoir fabriquer des capteurs jetables et de minimiser leur coût. Dans cette optique, les techniques de la micro-électronique sont très adaptées car il est possible d'intégrer les différents éléments et, par une production de masse, de réduire les coûts induits.

Nos travaux de recherche se sont ainsi déroulés à la frontière entre microtechnologies et biotechnologies. Ils sont plus précisément effectués dans le cadre du développement des microcapteurs chimiques à effet de champ (chemical field effect transistors ou ChemFETs). Ce type de capteur présente en effet les avantages d'être théoriquement connus et simples d'utilisation. Ils possèdent également une structure générique compatible avec les techniques de la micro-électronique et peuvent être caractérisés par mesures potentiométriques compatibles avec la détection d'un certain nombre d'espèces (bio) chimiques en solution. Ainsi, le transistor à effet de champ sensible au pH (pH-ion sensitive field effect transistor ou pH-ISFET) a constitué notre transducteur d'étude.

L'expérience montre que la mise à disposition d'outils miniaturisés adaptés à la détection biochimique nécessite l'établissement d'étroites collaborations entre biologistes et micro-electroniciens afin que ces derniers puissent appréhender correctement les attentes des premiers. Ainsi, l'adaptation du pH-ISFET à la détection biochimique nous a obligé à effectuer un travail pluridisciplinaire regroupant modélisation théorique, étude des matériaux, réalisation technologique et caractérisation.

Ce mémoire se propose de présenter l'ensemble des travaux effectués dans ces différents domaines de recherche.

Dans un premier chapitre, nous positionnerons les différents phénomènes qui interviennent aux interfaces solides / milieux biologiques et qui permettent la détection des espèces en solution. A travers un état de l'art, nous exposerons brièvement les possibilités existantes quand à la fixation d'éléments de détection sur différentes surfaces. Une alternative à ces méthodes d'immobilisation classiques sera proposée en présentant les propriétés fondamentales des polymères, les techniques de dépôts utilisées et leur capacité à jouer leur rôle de matrice de support pour de nombreux éléments.

Dans un deuxième chapitre, après une présentation rapide du capteur chimique à effet de champ pH-ISFET, nous développerons les travaux que nous avons menés pour adapter ce capteur aux analyses biochimiques en ayant toujours comme objectif majeur l'analyse des volumes infinitésimaux. Ainsi, nous présenterons les différentes réalisations technologiques développés qui nous ont conduits à la réalisation de micro-cuves en polymère permettant la mesure dans des micro-volumes de solutions biologiques confinées sur la zone sensible des capteurs pH-ISFETs.

Dans un troisième et dernier chapitre, nous avons rassemblé d'une part les études théoriques à partir desquelles nous avons modélisé les variations de pH lors d'une réaction enzymatique et, d'autre part, les modèles retenus pour élaborer des couches sensibles en

polymère. A partir de ces études, la mise en place d'un protocole de dépôt de couches polymériques enzymatiques, d'épaisseur variable et aux propriétés bien définies sera décrite. Nous montrerons également la validité de ce protocole par la mesure de la durée de vie de ces dépôts enzymatiques ainsi que par son application aux développement des microcapteurs enzymatiques à effet de champ (enzymatic field effect transistor ENFET) pour la détection de l'urée et de la créatinine.

Enfin, nous conclurons ce mémoire par un résumé de l'ensemble des résultats de nos travaux et nous présenterons les perspectives pour l'application de ces procédés dans le cadre de l'analyse biomédicale.

Chapitre I

Dans le domaine des sciences du vivant, plusieurs voies liant la biologie à la microélectronique sont explorées. Si les biopuces constituent un des axes privilégiés dans le cadre des nanosystèmes, il en est de même pour les biocapteurs dans le cadre des microsystèmes. En effet, depuis la première démonstration par Clark et Lyon[1], de la possibilité d'intégrer une enzyme dans une électrode pour former un biocapteur, le développement de tels dispositifs électrochimiques a pris un essor remarquable[2,3]. Mais pour l'ensemble de ces secteurs, il s'agit avant tout d'être capable de maîtriser l'interface entre le monde du vivant et celui des composants.

On peut définir un biocapteur comme étant un dispositif d'analyse chimique qui va associer étroitement ou intégrer un système biologique de reconnaissance moléculaire à un système physique transformant cette information chimique en information électrique comme le montre la figure I-1.

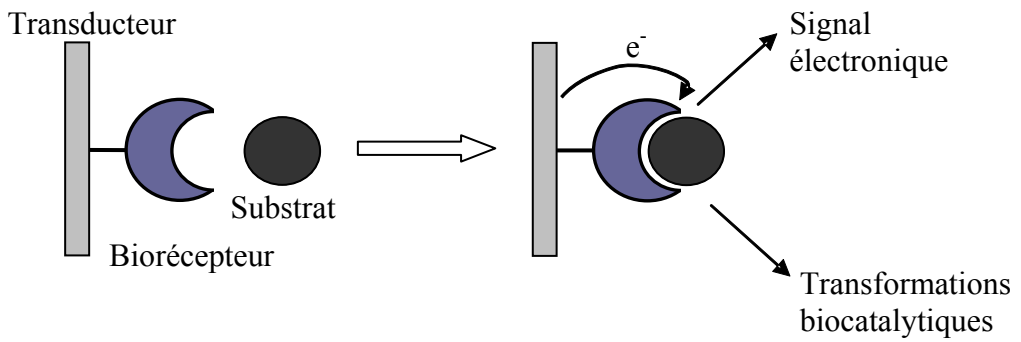


Fig.I-1: Transduction électronique traduisant une interaction biochimique

La difficulté réside dans l'existence de points de vue différents dans chaque domaine, de part et d'autre de l'interface. En effet, pour la biologie, le substrat (capteur) doit uniquement constituer un support inerte, n'intervenant pas dans le phénomène à observer, mesurer ou analyser. Tandis que du point de vue de la microélectronique, le lieu de la réaction biologique correspond à la zone sensible du capteur. Cette zone va devoir fournir des informations utilisables par le transducteur telles que des transferts de charge ou encore des variations d'impédance. Il apparaît donc clairement que la manière dont les deux parties vont être liées va grandement influencer le résultat de la mesure.

Pour identifier qualitativement et/ou quantitativement une espèce chimique dans ces types d'applications, il va falloir fixer le composé qui réagira physiquement ou chimiquement avec la substance à détecter sur un substrat adapté au processus de mesure choisi. La figure I-2 regroupe ainsi les principaux éléments biologiques utilisés en tant que système de reconnaissance ainsi que les modes de transduction qui peuvent y être associés. Mais dans cet état de l'art, nous allons nous intéresser à la troisième partie de cette figure à savoir les

diverses techniques d'immobilisation de l'élément biologique sur le transducteur, disponibles et utilisées pour créer cette fameuse interface biologie - microélectronique.

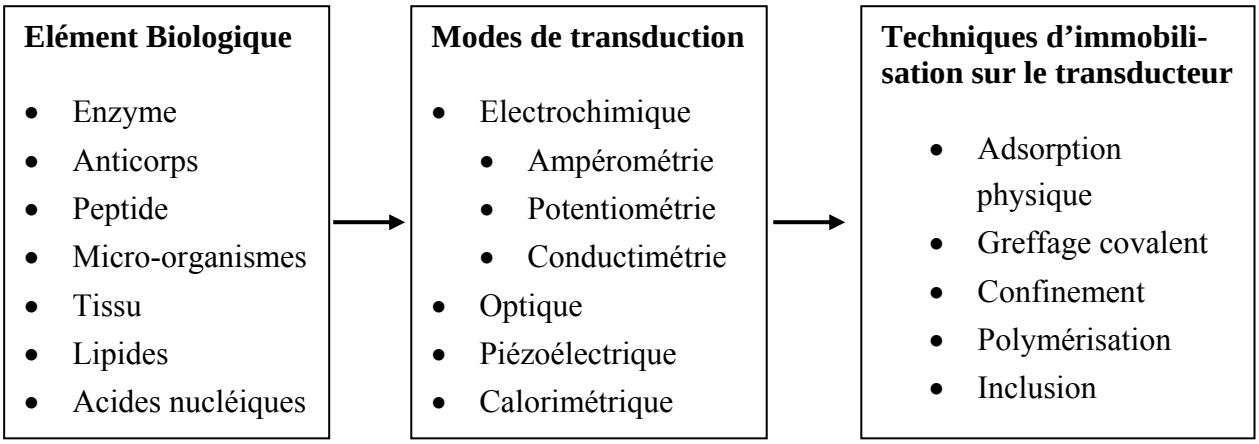


Fig. I-2: Diversité biologique et technologique des biocapteurs

Parmi ces techniques, nous allons distinguer deux mode de fixations de l'élément sensible sur le capteur : un mode d'accrochage que nous qualifierons de direct et un mode indirect. Il s'agira pour le premier cas de techniques ne faisant pas intervenir de couche d'accroche intermédiaire entre le substrat et l'élément biologique.

I Accroche directe

I.1 Adsorption physique

L'adsorption est un phénomène physique de fixation de molécules sur la surface d'un solide. La fixation provient de l'établissement de trois phénomènes entre le solide et les molécules :

- Les forces de dispersion (Van der Waals, London) toujours présentes.
- Les forces polaires résultant de la présence de champs électriques dans les micropores.
- Les liaisons hydrogène dues aux groupements hydroxyle ou amine.

On parle d'adsorption physique pour la différencier de l'adsorption chimique qui met en jeu des forces de plus grande intensité (du type liaison covalente). Celle-ci modifie la structure moléculaire du soluté (contrairement à l'adsorption physique), ce qui rend en général le processus irréversible.

Cette technique est certainement la plus simple à mettre en œuvre et la moins dénaturante pour le récepteur biologique. Il s'agit uniquement de mettre la zone sensible du capteur en contact avec l'élément biologique de détection pendant quelques instants, de rincer

et de sécher[4]. C'est son caractère réversible qui régit ce type de fixation. Cela peut s'avérer très désavantageux lorsque la désorption intervient avant ou durant la phase de mesure. Par contre, la régénération du capteur et le dépôt d'une nouvelle couche[5] sont facilités. De plus, la limite basse de la sensibilité du capteur va se trouver nettement améliorée puisqu'il n'existe aucun type de membrane ou de barrière entre le détecteur et le milieu à analyser et que le récepteur ne sera donc pas dénaturé[4,6]. Mais la faible quantité de produit fixé au substrat va fortement diminuer la limite haute de détection[4,5,6]. Cette méthode peut s'avérer très coûteuse étant donnée la grande quantité de produit nécessaire pour obtenir un seuil de détection faible. Un autre grand inconvénient important de ce type de dépôt est le manque de reproductibilité[6].

Pour limiter les phénomènes de désorption et pouvoir mieux contrôler les quantités fixées, il est possible d'établir des liaisons d'énergie beaucoup plus forte que celles entrant en jeu lors de l'adsorption physique. Il s'agit alors d'une adsorption chimique. Nous traiterons ce procédé un peu plus loin dans cet état de l'art.

I.2 Confinement

Il est également envisageable de conserver l'élément sensible près de la surface du capteur sans toutefois le lier physiquement à cette même surface. Il s'agit de la technique de confinement. Dans ce cas, le biorécepteur, qui va rester libre en solution à l'intérieur d'un compartiment fermé par une membrane sélective et semi-perméable, conserve une activité maximale. Cette technique, bien qu'offrant en théorie d'excellents résultats est très peu utilisée du fait de la complexité de sa mise en œuvre.

I.3 Dépôt par la technique de Langmuir-Blodgett

I.3.1 Principe

Historiquement, le physicien américain Langmuir et son assistante Miss Blodgett mirent en évidence le fait qu'une goutte d'huile (molécule amphiphile) déposée sur une surface statique d'eau, s'étale jusqu'à former un film monomoléculaire. Ce film, moyennant quelques précautions, peut être récupéré sur une surface propre et présente des propriétés tout à fait remarquables.

Une petite quantité d'une solution d'un composé organique à longue chaîne typiquement amphiphile, c'est à dire possédant une extrémité hydrophile (fonction acide) et une extrémité hydrophobe (chaîne carbonée) est introduite dans une cuve remplie d'eau. En raison de sa structure, après évaporation du solvant, ce matériau va former un film monomoléculaire à la surface de l'eau. Une barrière mobile va permettre de comprimer ce film afin de ne laisser aucun espace libre sur la surface. Dans ces conditions, toutes les molécules se disposent parallèlement les unes aux autres et, de manière schématique,

perpendiculairement au plan de la surface liquide, avec l'extrémité hydrophile au contact de l'eau comme représenté sur la figure I-3.

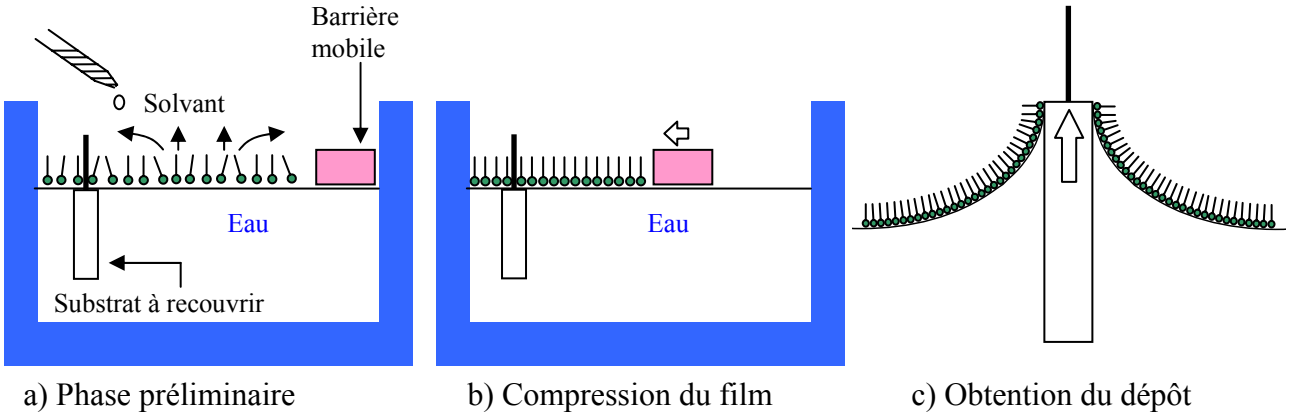


Fig. I-3: Mode de réalisation du dépôt de couche de Langmuir-Blodgett

On immerge alors perpendiculairement à la surface le substrat support du futur capteur et on le retire doucement. Cette manoeuvre doit être réalisée à l'aide d'un mécanisme de précision automatique, c'est à dire ne produisant aucune vibration latérale et se déplaçant verticalement à vitesse constante. En raison du phénomène de capillarité, le film se fixe sur le substrat avec une bonne adhérence et constitue une structure mono-moléculaire pratiquement exempte de défauts. En procédant à plusieurs passes, il est possible d'empiler ainsi plusieurs dizaines de monocouches (la limite possible est dépendante du type de molécule).

I.3.2 Applications

Cette technique permet de créer des interfaces adaptées aux capteurs de gaz. Dans la littérature, la principale application concerne le dioxyde d'azote NO_2. Les deux principaux types de détection concernent :

- soit une modification de la conductivité électrique de la couche déposée par la méthode de Langmuir-Blodgett lorsque celle-ci est en contact avec le dioxyde d'azote qui est un agent oxydant[7],
- soit une modification au sein même de la structure de la membrane sensible par l'adsorption des molécules de gaz[7,8].

Mais, il devient de plus en plus fréquent de voir cette technique appliquée pour d'autres types de détections. Il est possible d'emprisonner des ionophores au sein même de la couche de Langmuir-Blodgett. C'est ce qu'ont réalisé *Rochefeuille et al.* [9,10] en intégrant de la monensine et de la calcimycine au sein d'une couche de phospholipides déposée sur un ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor). Ils ont ainsi obtenu un capteur sensible aux

ions sodium Na^+ et calcium Ca^{2+}. Cela ouvre la voie vers l'immobilisation d'entités biologiques. L'avantage de ce type de membrane dans ce cas, est la ressemblance avec une structure membranaire « naturelle » comme le montre la figure I-4. Aussi il a été envisagé une procédure générale qui consiste à inclure dans la cuve de Langmuir-Blodgett, au moment de la réalisation du film, un faible pourcentage du composé, une enzyme par exemple[11,12] ou encore un anticorps[13], qui sera destiné à réagir avec le produit à détecter. Il est ainsi possible de le fixer sur le substrat via le film de Langmuir-Blodgett qui joue alors le rôle d'un filet aux mailles suffisamment lâches pour autoriser la réaction enzymatique, sans pour autant permettre aux molécules d'enzymes de quitter la surface du capteur.

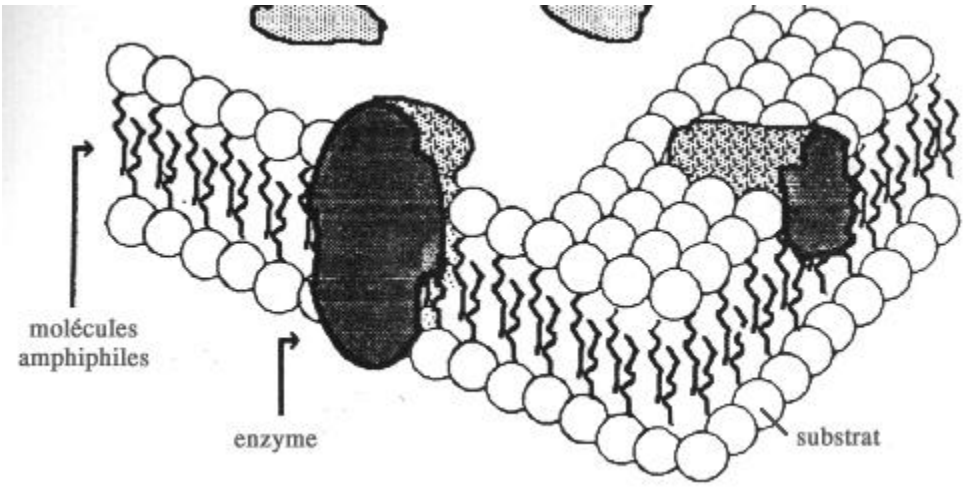


Fig. I-4: Création d'une couche de Langmuir-Blodgett incluant des enzymes

D'autres types de capteurs utilisant des anticorps ont été créés, mais en les greffant cette fois-ci sur une couche phospholipidique préalablement déposée par la technique de Langmuir-Blodgett [14].

Il apparaît donc que le dépôt de couches de Langmuir-Blodgett est une technique avantageuse pour les capteurs. Les principaux atouts sont :

- l'organisation des couches au niveau moléculaire,
- la fabrication de la couche sensible en une seule étape,
- des temps de réponse très courts du fait de la très fine épaisseur de la membrane,
- enfin, un des grands avantages pour les biocapteurs concerne l'inclusion d'éléments biologiques. Dans ce cas là, en effet, la structure des films obtenus est très proche de celle d'une membrane biologique[11].

Cette technique a donc un avenir certain dans le monde des capteurs chimiques et biologiques même si, d'une part, les procédés de dépôt nécessitent, à l'heure actuelle, un appareillage très spécifique et un savoir faire du point de vue chimique très important et si,

d'autre part, la stabilité de l'édifice moléculaire reste médiocre en solution. De plus, par son mode de fabrication, ce type de dépôt est exclusivement réservé aux transducteurs plans.

I.4 Liaisons covalentes

Un autre « grand » mode de fixation sur une surface est la création de liaisons covalentes entre le substrat et la particule à immobiliser. Le couplage covalent se fait généralement avec un support fonctionnalisé insoluble dans l'eau. Lorsque cette technique est utilisée avec un élément biologique, la réaction implique des sites qui ne sont pas essentiels à l'activité biologique de la molécule.

De façon générale, l'attachement d'une entité biologique (enzyme, anticorps, protéine…) à la surface d'un capteur résulte de deux étapes. La première étape consiste en l'activation de la surface inerte du capteur, afin de lui donner une réactivité chimique. La seconde étape nécessite de lier le biorécepteur à cette surface chimiquement activée. La nature exacte des réactions chimiques impliquées dépend fortement du type de surface.

Bien que les surfaces métalliques soient chimiquement inactives, elles peuvent être fonctionnalisées avec des réactifs tels que les chloro- ou alkylsilanes[15] lorsqu'elles sont recouvertes d'un fin film d'oxyde. Par analogie avec les surfaces de silice, les surfaces Pt/PtO, Au/AuO et SnO_2 possèdent beaucoup de sites M-OH (où M représente le métal). Lorsqu'ils sont en contact, sous conditions anhydres, avec par exemple une solution de dichlorodiméthylsilane [$Cl_2Si(CH_3)_2$], les réactifs organosilanes sont immobilisés grâce à la création de liaisons –MOSi-, chimiquement très stables (où MO représente l'oxyde de métal de surface).

Bien que la réaction décrite ci-dessus produise une surface fonctionnalisée, celle-ci n'est pas forcément appropriée au greffage d'éléments biologiques du fait du manque de réactivité des groupements méthyls.

Pour lier un biorécepteur de façon covalente, il est important que l'organosilane utilisé soit porteur, par exemple, d'un groupement amine primaire ou encore d'une fonction acide carboxylique. Un réactif très utile dans ce contexte est le propylaminosilane [$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_3NH_2$][16] qui fonctionnalise la surface métallique tout en permettant de greffer chimiquement un élément biologique grâce au groupement amine. Un schéma de synthèse classique utilisant ce réactif est présenté sur la figure I-5. Il permet de lier de façon covalente une enzyme sur une électrode métallique par la formation d'une liaison amide entre le groupement amine du silane et la fonction acide carboxylique de la protéine. Il faut toutefois noter que la fonction acide carboxylique doit être activée au préalable.

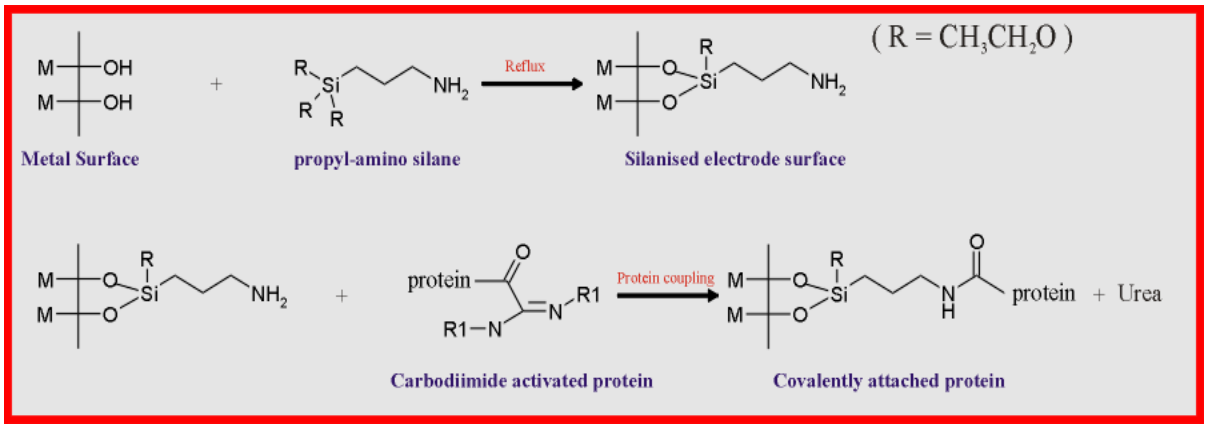


Fig. I-5: Formation de la liaison covalente entre une enzyme et une électrode métallique par la formation d'une liaison amide entre le groupement amine du silane et la fonction acide carboxylique de la protéine[17]

La synthèse chimique décrite sur la figure I-5 n'est évidemment qu'une manière de procéder parmi de nombreuses possibilités. Le tableau I-1 présente quelques exemples de capteurs réalisés par le biais de la fixation covalente de récepteurs chimiques ou biologiques.

Récepteur immobilisé	Agent de fixation	Substrat	Elément(s) détecté(s)	Ref
Acide dicarboxylique (AE6)	Chlorure de p-toluène sulfonyle	Si/SiO_2	Fer	18
Chaînes aromatiques	Réactifs de Grignard, espèces Lithium aryl	Si	NO_x, SO_x, CO, NH_3	19
Oligonucléotides	Epoxysilane, 3-aminopropyltriethoxysilane,	Si/SiO_2	ADN	20,21, 22
Anticorps	Ethoxysilane, alkylthiols,	SiO_2, Au	Antigènes associés	23,24, 25,26
Enzymes :				27
Uréase	Carbodiimide	Si/SiO_2	Urée	28
Penicillinase	Carbodiimide, Glutaraldéhyde	Non spécifié	Pénicilline	29
Laccase	ABTS (sel d'ammonium)	Pt	p-phényldiamine, p-aminophénol	30
Glucose oxydase	MES (acide sulfonique)	Indium-tin oxyde	Glucose	31
Acétilcholinestérase Organophosphate hydrolase	Amine-silanisation, sulfurhydryl-silanisation	SiO_2	Organophosphates	32

Tab. I-1: Exemples d'applications utilisant le greffage covalent de divers récepteurs sur différents substrats

Il apparaît que cette technique est utilisée pour le greffage de récepteurs très variés sur des substrats tout aussi variés. Mais la tendance générale laisse apparaître une méthode alternative à la création de liaisons covalentes entre l'élément et le substrat. En effet de plus en plus souvent, une couche intermédiaire est insérée. Le type de matériau utilisé pour créer cette base d'accroche est en général un polymère.

II Approche des polymères

Dans le cadre du développement de la micro-électronique dans le domaine de la biologie, les polymères apparaissent comme des biomatériaux très prometteurs. En effet, leur utilisation est de plus en plus courante dans des domaines tels que la médecine où ils sont utilisés dans certains procédés chirurgicaux notamment oculaires, comme implants artificiels, prothèses ou bien dans les systèmes de distribution automatique de médicaments. Le tableau I-2 présente de façon détaillée les diverses applications des polymères dans le domaine biomédical [33].

Dans le domaine des biotechnologies, les polymères servent déjà couramment de support pour l'immobilisation des biorécepteurs classiques : protéines, anticorps, oligonucléotides… Mais dans l'ensemble, ces polymères doivent avoir des propriétés bien spécifiques, notamment dans le domaine biomédical.

Les polymères sont sélectionnés suivant différents critères tels que leur résistance mécanique, leur dégradabilité, leur perméabilité, leur solubilité ou encore leur transparence. Et, dans tous les cas, il est nécessaire d'optimiser leurs propriétés surfaciques et volumiques. Si toutes ces propriétés ne sont pas forcément recherchées, il en est deux qui elles, sont quasiment obligatoires pour des polymères utilisés dans le cadre de la biologie et plus particulièrement dans celui du biomédical. Il s'agit des propriétés de biomimétisme et de biocompatibilité. Il semble important à ce niveau de définir ces deux termes caractérisant un polymère puisque nous y ferons référence plus loin.

II.1 Définitions

Biomimétisme : Il s'agit de la capacité d'un matériau artificiel à se comporter de la même manière que le matériau original que ce soit au niveau de la microstructure ou de la macrostructure. Actuellement, les comportements biomimétiques les plus courants sont observés en chimie où les réactions chimiques suivent un processus analogue à un processus biochimique. En effet, certains polymères utilisés dans les biomatériaux sont constitués de regroupements chimiques qui sont ordonnés de façon à imiter les caractéristiques de molécules naturelles. Ces biomatériaux ou produits de synthèse biomimétiques ne font pas obstacle à la communication biochimique.

	Propriétés et spécifications	Application et polymères utilisés	Besoins futurs
Dentaire	Stabilité et résistance à la corrosion dans l'environnement agressif de la bouche Plasticité et facilité d'entretien, résistance à la force et à la fatigue, faculté de recouvrement Bonne adhésion et intégration aux tissus contigus Faible allergénicité, longue durée de vie	Résines à base de polyméthylacrylate pour le remplissage et les prothèses (propriétés mécaniques induites par copolymérisation) Poly(zinc acrylates), polyamides	Meilleure élasticité Meilleure intégration dans les tissus mous des os
Orthopédique	Force et résistance aux contraintes mécaniques, stérilisable, bonne bio- et histocompatibilité, durabilité (pour les implants osseux à long terme), bonne intégration avec les os et les muscles, facilité de fabrication, injectable ou bien moulage in situ.	Ciments osseux, agrafes dégradables pour les os et le remplacement des cartilages. Polyméthylméthacrylate, poly(acide lactique) et leurs copolymères	Nouvelles agrafes synthétiques, biodégradables avec des propriétés biologiques et mécaniques améliorées
Oculaire	Composition sous forme de solution, onguents, gels et films. Adhésion, capacité à former des gels ou des films, solubilité ou hydrophilie Biocompatibilité et propriétés bioadhésives spécifiques à certains sites.	Hydroxypropyl-méthylcellulose et polyvinyl alcool pour les larmes artificielles, acide hyaluronique, gels polyacrylamides	Biomatériaux polymériques avec une surface intelligente pour améliorer la bioadhésion
Vasculaire	Résistance à l'usure et à la fatigue, pouvoir lubrifiant, absence de formation de thrombose, d'embolisme et d'inflammation chronique, biostabilité, stérilisabilité, porosité, intégrité mécanique	Cathéters, matériaux pour greffes vasculaires, valves cardiaques,. Silicones, Teflon®, polyuréthanes.	Approche interdisciplinaire pour créer des matériaux biomimétiques pour de meilleures interactions avec les cellules. Polymères bioréactifs, CAO des micro structures des implants.
Organes artificiels et implants tissulaires	Mêmes propriétés mécaniques que les tissus environnants, pas de réponse chronique aux relargages toxiques, intégration aux tissus naturels sans réactions fibreuses, porosité.	Peau artificielle et implants mammaires ((à base de collagène et de silicone), foie artificiel (transplantation hépatocyte). Poly(acide lactique), poly(acide glycolique)	Création de structures tridimensionnelles complexes pouvant être utilisées comme organes artificiels. Développement d'un cœur entièrement artificiel
Encapsulation	Propriétés de diffusion et de perméabilité pour permettre un transport optimal à travers la membrane, une épaisseur de la membrane et une stabilité mécanique qui doivent rester intactes dans les environnements physiologiques.	Microcapsules basées sur des hydrogels et complexes polyelectrolytes pour l'encapsulation de cellules, d'enzymes, d'hormones, de protéines pour les organes artificiels et le traitement de certaines maladies. Alginate, chitosine , polyélectroplytes synthétiques.	Nouveaux polymères et nouveaux systèmes d'encapsulation plus efficaces. Nouveaux procédés d'implantation non traumatiques pour préserver l'intégrité de la membrane protectrice.
Dispense de médicaments	Conception en fonction du mode et du site d'administration, structure et fonctionnalité bien définies.	Hydrogels, membranes, réseaux et copolymères avec différentes structures et applications.	Amélioration du design des systèmes, nouveaux matériaux intelligents et bioréactifs.

Tab. I-2: Diverses applications des polymères dans le domaine biomédical

Biocompatibilité : il s'agit de la capacité d'un matériau à réagir de façon appropriée à la réponse de l'hôte lors d'une application spécifique. Cette affinité fait que les biomatériaux sont bien tolérés par l'organisme hôte et qu'ils ne provoquent pas de réaction de rejet, de réaction toxique, de lésion ou d'effet nocif sur les fonctions biologiques de ce dernier.

II.2 Qu'est ce qu'un polymère ?

Un polymère est une macromolécule formée de l'enchaînement covalent d'un très grand nombre d'unités de répétition qui dérivent d'un ou de plusieurs monomères (qui sont également appelés motifs).

Initialement inspirés par la nature qui met à profit les propriétés de macromolécules telles que l'ADN et les protéines, les chimistes se sont vite intéressés aux polymères. La combinaison de monomères plus simples amène à une grande variété de macromolécules. De plus, il existe plusieurs types de polymérisations, influençant le nombre d'unités, et par suite les propriétés physiques et chimiques du polymère final. On distingue deux grandes familles de polymères :

- des monomères éthyléniques (le squelette final étant uniquement carboné),
- des hétéroatomes qui peuvent servir de jonctions.

Mais il existe également une autre façon de classer les polymères :

- Les homopolymères qui ne possèdent qu'un seul type d'unité …**MMMMMMM**…
- Les copolymères qui possèdent plusieurs types d'unités

  - ✓ Copolymère statistique : …**M**NN**MMMM**NNN**M**N**M**N**MM**N**M**N**M**N…
  - ✓ Copolymère séquencé: ...**MMMMMMMMM**NNNNNNN**M**…
  - ✓ Copolymère alterné: ...**M**N**M**N**M**N**M**N**M**N...

Les polymères, qu'ils soient homo ou copolymères, peuvent être réticulés. Un polymère réticulé est un polymère dont certaines de ses chaînes sont reliées entre elles par des ponts chimiques covalents.

L'avantage des polymères par rapport aux autres matériaux comme les métaux ou les céramiques, est de pouvoir modifier leur composition pour obtenir une plus grande variété de structures et de propriétés. S'il existe des polymères d'origine naturelle tels que la soie ou la cellulose, les polymères d'origine synthétique sont, d'une manière générale plus intéressants par la malléabilité de leur composition.

L'inconvénient reste le manque de biocompatibilité de la majorité de ces matériaux qui sont la cause de réactions inflammatoires lors de la mise en contact avec un milieu vivant. Malgré cela, le tableau I-2 montre que ces matériaux sont déjà très utilisés dans le milieu médical. La liste des applications présentée est loin d'être exhaustive, mais elle donne une vision globale du rôle des polymères dans la médecine actuelle.

Il ne faut pas perdre de vue que les capteurs que nous souhaitons développer sont principalement destinés à un usage biomédical qui peut être étendu au domaine biologique et biochimique en général ou, en un mot, au domaine du vivant. Il apparaît donc important, à ce niveau de souligner les intérêts avérés des polymères pour des applications de la microélectronique en biologie :

- Ils sont relativement peu chers
- Ils peuvent être déposés sur des types de substrats très variés
- Les techniques de fabrication, de réticulation et de fonctionnalisation permettent de moduler assez facilement leurs propriétés.

Comme le montre le tableau I-3[34], les polymères commencent déjà à être bien implantés dans le monde de la microélectronique en présentant à la fois des avantages et des inconvénients. En effet, si la théorie laisse entrevoir un nombre quasi-infini de possibilités de détection, il n'en est pas de même dans la pratique.

L'étape limitante dans la fabrication de capteurs possédant une couche sensible basée sur la chimie des polymères est le dépôt même de ce polymère et surtout, le mode d'insertion de l'élément détecteur au sein de la macromolécule. Lorsqu'il s'agit d'intégrer une « simple » molécule chimique, les contraintes existent mais peuvent être contournées plus ou moins aisément. Il n'en va pas de même lorsque le récepteur est d'origine vivante. En effet, dès qu'il s'agit d'une entité biologique, les techniques sont vite limitées. Ainsi, le choix des réactifs chimiques à utiliser dans le process est restreint et les températures appliquées doivent être basses (de l'ordre de 40°C). Diverses méthodes ont déjà été mises en œuvre. Tout comme pour les modes d'accroche directe, il va exister plusieurs façons d'amener l'élément biologique sensible sur la grille du capteur grâce à un polymère. Nous ne nous intéresserons finalement ici que très peu aux modes de dépôt des polymères sur le substrat. Nous en citerons quelques uns sans entrer dans les détails des techniques. Cette seconde partie de l'état de l'art s'attachera plutôt aux modes d'intégration de l'élément sensible au sein du polymère et à l'état physique de ce dernier.

Type de capteur	Avantages	Inconvénients	Etat actuel
	Comparé aux membranes inorganiques		
Thermistance CTP (coefficient de température positif)	Effet CTP net dans une large gamme de températures	Gamme de travail limitée	Disponible sur le marché
Capteurs de pression	Très grande sensibilité, résistance aux chocs	Problèmes de stabilité	Recherche et développement
Capteurs tactiles	Flexibilité, la meilleure imitation des doigts humains		Recherche et développement
Capteurs acoustiques	Grande sensibilité, résistance aux chocs	Gamme de températures limitée	Disponible sur le marché
Capteurs infrarouges	Grande résistivité thermique	Faible sensibilité	Disponible sur le marché
Capteurs d'humidité	Grande sensibilité, intégration possible	Problèmes de stabilité	Disponible sur le marché
Capteurs de gaz	Grandes sensibilité et sélectivité, travail à température ambiante	Dérive à long terme	Quelques uns disponibles sur le marché, les autres sont en cours de développement
Capteurs sensibles aux ions	Grande sélectivité, large choix de ionophores	Courte durée de vie	Electrodes disponibles sur le marché, capteurs intégrés en cours de développement
Biocapteurs	Biocompatibilité, immobilisation relativement facile d'enzyme ou d'autres composés biologiques		Recherche et développement Quelques uns sur le marché

Tab. I-3: Résumé de la situation, des avantages et inconvénients des capteurs utilisant les polymères

II.3 Techniques de dépôt des polymères

II.3.1 Dip-coating ou trempage

Ceci consiste à immerger le substrat dans la solution et à le retirer dans des conditions très contrôlées et stables pour obtenir un film d'épaisseur régulière. Lors de la remontée, le liquide va s'écouler sur le substrat. A la fin de l'écoulement, le substrat est recouvert d'un film uniforme et très poreux. Dans ce cas, l'épaisseur des couches résultera de six forces : la viscosité du polymère, la pression, la force de tirage, la force de gravitation, la résultante des

forces de tension superficielles, et le gradient de tension de surface. Des capteurs gaz ont ainsi été réalisés à l'aide de polypyrrole [35].

II.3.2 Spin-coating ou dépôt à la tournette

Cette méthode consiste à déposer par centrifugation une solution déposée en excès sur un substrat. Cette technique a l'avantage d'être facilement mise en œuvre, pour des investissements relativement modérés. De plus, elle est considérée comme une technique de base de la microélectronique classique. Cette méthode de dépôt peut être décomposée en quatre phases :

1) le dépôt de la solution
2) le début de la rotation : la phase d'accélération provoque l'écoulement du liquide vers l'extérieur du substrat
3) la rotation à vitesse constante permet l'éjection de l'excès de liquide sous forme de gouttelettes et la diminution de l'épaisseur du film de façon uniforme
4) l'évaporation des solvants les plus volatils qui accentue la diminution de l'épaisseur du film déposé

En contrôlant les paramètres de rotation, il est possible de calculer l'épaisseur du film déposé: Meyerhofer a publié un modèle prenant en compte les paramètres entrant en jeu lors du dépôt[36]. Nous étudierons ce modèle un peu plus en avant de ce mémoire puisque c'est cette technique de dépôt que nous avons choisie d'utiliser. Il est possible de trouver dans la littérature différents types de capteurs dont la membrane a été réalisée par cette méthode. C'est le cas de détecteurs chimiques pour les vapeurs organiques fabriqués à partir de poly(thienylene vinylene)[37], de capteurs gaz pour le monoxyde d'azote[38], de capteurs pH magnétoélastiques[39] ou encore de capteurs optiques d'urée utilisant un film de poly(vinylchlorure)[40].

II.3.3 Polymérisation électrochimique et polymères conducteurs

Avant de présenter cette méthode de dépôt, il est important, à ce niveau, de définir un autre genre de polymères : les polymères conducteurs.

II.3.3.1 Polymères conducteurs

En général les polymères sont d'excellents isolants. Cependant, depuis une dizaine d'années, une nouvelle classe de matériaux appelés polymères conducteurs a été développée.

Ces polymères ont une structure chimique particulière (doubles liaisons conjuguées) qui permettent par dopage d'obtenir des matériaux ayant une conductivité électrique variable et des propriétés uniques. En effet, les polymères conducteurs contiennent des électrons π délocalisés. En faisant varier le niveau de dopage, on peut faire passer le matériau de l'état isolant à l'état semi-conducteur puis conducteur et ainsi faire apparaître et modifier des propriétés électriques inhabituelles pour un tel type de matériau : conductivité électrique, faible énergie de transition optique, faible potentiel d'ionisation ou encore une grande affinité électronique. Les valeurs importantes de conductivité électrique obtenues pour ces polymères ont conduit à les appeler « métaux synthétiques ». De nombreuses applications de ces polymères conducteurs dans le domaine de la chimie analytique ou encore des capteurs[41,39] ont déjà vu le jour. Etant donné le contexte de ce mémoire, je m'attarderai plutôt sur le rôle des polymères conducteurs dans le domaine des biocapteurs.

Pour resituer le problème, il est possible de classer les capteurs en trois niveaux d'intégration de la détection :

- Le biorécepteur est soit lié, soit emprisonné dans une membrane qui est elle-même reportée sur la zone sensible du capteur
- Le biorécepteur est soit adsorbé soit fixé de façon covalente directement sur la zone sensible du capteur (élimination de la membrane)
- L'élément à détecter vient directement réagir avec la zone sensible du capteur qui va instantanément traduire et amplifier le signal.

Les polymères conducteurs vont intervenir pour le troisième niveau. En effet, il est tout à fait concevable, étant données leurs propriétés électriques, d'utiliser ces polymères directement comme transducteur. Dans ce cas là, les éléments biologiquement sensibles seront insérés par les méthodes classiques (piégeage, liaisons covalentes...). Mais l'innovation vient du contrôle spatial du dépôt, en particulier grâce à l'électropolymérisation.

II.3.3.2 Polymérisation électrochimique

Plusieurs méthodes sont disponibles pour la synthèse et le dépôt de polymères conducteurs. Mais la plus utilisée est la méthode de couplage oxydatif : il s'agit d'oxyder les monomères pour former des radicaux cationiques qui vont s'associer deux par deux pour former des di-cations. En répétant ce processus, on aboutit à la formation du polymère. La synthèse électrochimique est rapidement devenue la méthode la plus utilisée pour préparer les polymères conducteurs du fait de la simplicité de sa mise en œuvre et de sa reproductibilité. De plus, les réactions peuvent être effectuées à température ambiante. Enfin, en faisant varier

les valeurs de potentiel ou de courant, il est possible de contrôler l'épaisseur des couches déposées.

La technique standard qui utilise une cellule contenant une électrode de travail, une contre électrode et une électrode de référence est celle qui produit en général les films de meilleure qualité. Les anodes couramment utilisées peuvent être composées de chrome, or, nickel, palladium, titane ou encore platine.

Dans le cadre des biocapteurs, les polymères conducteurs sont également de plus en plus utilisés. En effet, ils présentent un haut degré de compatibilité avec les molécules biologiques. De plus, les polymères conducteurs ont la capacité d'amplifier le transfert de charge électrique, relativement faible, produit par la réaction biochimique. Une synthèse des applications des polymères conducteurs pour la fabrication des biocapteurs a été réalisée par M. Gerard *et al.*[42]. Elles apparaissent dans les domaines :

- De la santé et du médical
  - Capteurs de glucose, fructose, lactate, éthanol, cholestérol, urée…
  - Immunocapteurs
  - Capteurs ADN
- De la surveillance de l'environnement
  - Contrôle de la pollution
  - Capteurs chimiques
- De l'analyse alimentaire

On constate que finalement les polymères conducteurs apparaissent dans tous les champs d'applications déjà couverts par les biocapteurs.

Après avoir cité ces quelques méthodes de dépôt de différents types de polymères, nous allons nous intéresser à l'intégration proprement dite de l'élément biologique à la surface du biocapteur par le biais des polymères. Il existe bien des méthodes pour réaliser cette opération et nous n'allons ici nous intéresser qu'aux principales.

III Intégration de l'élément biologique aux polymères

Avant tout, il est important de se rendre compte de la diversité des biorécepteurs intégrables aux membranes polymériques. En effet, la littérature nous offre tout un panel de biomolécules utilisées dans les applications micro-capteurs. Faire une liste exhaustive de tous les éléments déjà utilisés serait un travail de grande ampleur. Nous ne citerons donc dans ce mémoire que les grandes familles de biorécepteurs en nous appuyant sur quelques exemples : enzymes, anticorps (et protéines par extension), ADN et micro-organismes.

III.1 Diversité des biorécepteurs

L'élément biologique le plus utilisé dans le domaine de la détection biochimique est certainement l'enzyme. Il me semble opportun, à cet instant, de rappeler brièvement ce qu'est une enzyme puisque une partie de nos travaux concerne les capteurs enzymatiques.

III.1.1 Enzymes

III.1.1.1 Qu'est ce qu'une enzyme ?

Les enzymes, découvertes à la fin du XIXème siècle par Buchner, sont les catalyseurs du monde vivant. Ces molécules protéiques permettent que les réactions (bio)chimiques qui se font ordinairement en un temps très long en l'absence de catalyseur, soient considérablement accélérées. A titre d'exemple, une réaction qui met une seconde en présence d'une enzyme mettrait 12 jours en son absence, soit une accélération d'un facteur un million.

Donc, un catalyseur est une substance qui modifie la vitesse d'une réaction chimique mais qui se retrouve inchangée à la fin de la réaction. En termes plus techniques, un catalyseur est une substance qui abaisse l'énergie d'activation d'une réaction chimique.

Les enzymes sont des catalyseurs spécifiques, c'est à dire qu'une enzyme donnée (il y en a des milliers de sortes différentes) ne peut catalyser qu'une réaction chimique bien précise. Voici en quelques mots leur mode d'action.

Comme toutes protéines, les enzymes sont formées à partir d'acides aminés. Lorsque la chaîne d'acides aminés se replie sur elle-même, elle forme une structure compacte présentant des creux et des bosses. Dans certains creux se trouvent réunis des acides aminés qui, ensemble, confèrent à cette région de la protéine des caractéristiques chimiques spécifiques. C'est au niveau d'une telle région, appelée site actif, que s'effectue la réaction chimique catalysée par une enzyme. Par exemple, c'est en se fixant sur le site actif de la *lactase* que le lactose se décompose en glucose et en galactose. Et il n'y a que le lactose qui peut se fixer sur ce site. Le maltose (sucre formé de l'union de deux glucoses), par exemple, n'a pas d'affinité chimique avec le site actif de la lactase et ne peut s'y fixer.

La figure I-6 illustre la catalyse d'une réaction chimique au cours de laquelle une molécule A se lie à une molécule B pour former la molécule AB. On constate que chacune des deux molécules a une affinité avec le site actif de l'enzyme. Lorsque A et B sont fixées dans le site actif, elles sont exactement dans les bonnes conditions pour former une liaison entre elles et former AB. À la fin de la réaction, la nouvelle molécule AB se détache de l'enzyme qui, de ce fait, peut à nouveau être le site de la même réaction. L'enzyme n'est pas altérée par cette réaction et peut la catalyser des milliers de fois à la seconde.

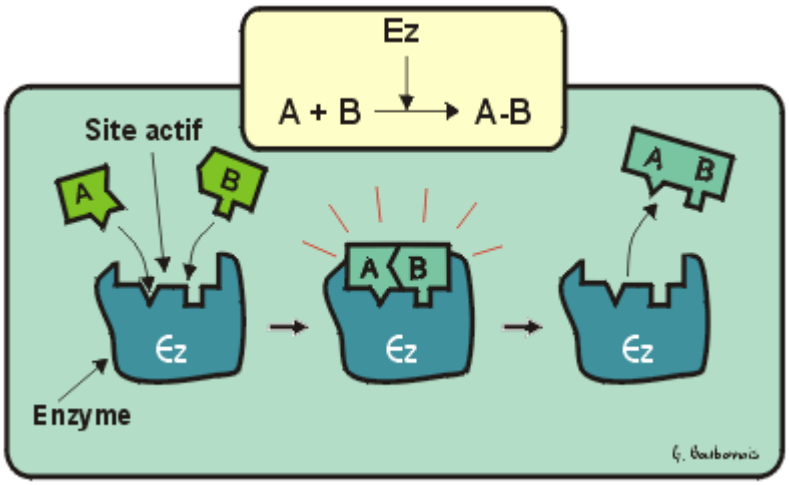


Fig. I-6: Catalyse d'une réaction chimique par une enzyme

Par contre, si la protéine se déforme, le site actif risque d'être modifié et de devenir alors inactif. L'enzyme perd alors ses propriétés catalytiques et ne peut plus remplir sa fonction. C'est pourquoi il faut éviter de soumettre ces enzymes à certaines conditions qui sont entre autres : la chaleur, les fortes variations de pH, les fortes concentrations d'électrolytes ou encore la présence de solvants organiques.

III.1.1.2 Application aux capteurs

L'utilisation des enzymes en tant que moyen de détection n'est pas uniquement réservée aux capteurs électroniques. En effet, les enzymes sont employées depuis très longtemps déjà, dans les méthodes analytiques biologiques. Nombre de tests reposent sur le pouvoir catalytique et surtout spécifique de chaque enzyme pour isoler, reconnaître et quantifier très spécifiquement un grand nombre de produits. Ces tests sont en général basés sur des réactions et dosages colorimétriques. Un exemple de détection enzymatique sera détaillé ultérieurement puisque nous avons eu recours à ce type de détection pour valider nos résultats.

L'application du principe de détection enzymatique aux capteurs date de 1962 avec la réalisation, par Clark[1], d'une électrode enzymatique utilisant de la glucose oxydase. A l'heure actuelle, il existe presque autant de capteurs enzymatiques que de types d'enzymes. Citer ici toutes les applications est inimaginable. Le nombre de publications relatives à ce sujet permet toutefois de dégager les grandes tendances en ce qui concerne les biocapteurs. Les capteurs de glucose basés sur la glucose oxydase demeurent parmi les plus étudiés [43,44,45,46]. En effet, ils représentent le plus grand pourcentage de capteurs déjà disponibles sur le marché du fait de leur implication dans le diagnostic du diabète et de son suivi quasi-quotidien. Mais il existe

également des capteurs pour tous les analytes classiques du sang : urée[47,48,49,50], créatinine[46,51,52], différentes sortes de sucres (lactose) [53,54], cholestérol [55],…

L'utilisation des enzymes n'est pas restreinte au domaine de l'analyse médicale. Elles sont également utilisées pour réaliser des capteurs dans le domaine de l'agro-alimentaire [56] ou encore dans le domaine de l'environnement avec notamment la détection des polluants et des pesticides [57,58,59,60].

Outre les enzymes, un autre type de biomolécules est très « célèbre » pour ses qualités de détection. Il s'agit des anticorps.

III.1.2 Anticorps

III.1.2.1 Qu'est ce qu'un anticorps ?

Un anticorps est une protéine sécrétée par certains globules blancs et destinée à neutraliser spécifiquement une substance étrangère pathogène. Certains anticorps d'origine animale (sérum) ou humaine (gammaglobuline) sont utilisés en injection pour lutter contre des agents toxiques ou infectieux. Ils sont capables de "reconnaître" et de se fixer sur une structure chimique complémentaire de la leur, appelée antigène. Du fait de leur capacité à reconnaître spécifiquement un motif moléculaire particulier, les anticorps sont des acteurs privilégiés dans la détection des molécules. Ils sont utilisés dans de nombreux tests de dépistage comme par exemple les tests de type ELISA et ce, aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine agro-alimentaire.

III.1.2.2 Application aux capteurs

Les immunocapteurs sont basés sur une affinité ligand – récepteur; la réaction immunochimique qui en résulte est couplée au transducteur du capteur.

Le principe fondamental de tout immunocapteur repose sur la spécificité moléculaire qui caractérise les couples anticorps/antigène et qui conduit à la formation d'un complexe stable. L'apparition des capteurs dans l'analyse immunologique correspond à l'extension du domaine d'application. En effet, ce type d'analyses commence à être très utilisé dans la surveillance de l'environnement et de l'agroalimentaire. Il est nécessaire dans ces cas là de pouvoir effectuer des mesures en continu, d'où l'apparition récente des capteurs. Bien que le nombre de publications à ce sujet soit très important, on ne trouve que très peu d'applications industrielles pour les diagnostics cliniques. La principale raison demeure dans le manque de réponses aux questions concernant l'immobilisation, l'orientation ou encore la conservation des propriétés spécifiques des anticorps à la surface du transducteur. De plus, l'analyse immunologique étant à la base de la plupart des tests de laboratoire courants, les immunocapteurs devraient avoir une place prépondérante dans ces applications cliniques. Il faudrait donc que les concepteurs de ces capteurs tiennent particulièrement compte des

besoins généraux et surtout des besoins spécifiques qu'engendre l'analyse médicale en laboratoire.

Le principe général de l'immunocapteur est présenté sur la figure I-7. Celle-ci présente également les quatre types de détection qui sont généralement décrits dans la littérature. A ce sujet, Luppa *et al.* [61] ont réalisé un état de l'art très complet concernant les applications cliniques des immunocapteurs.

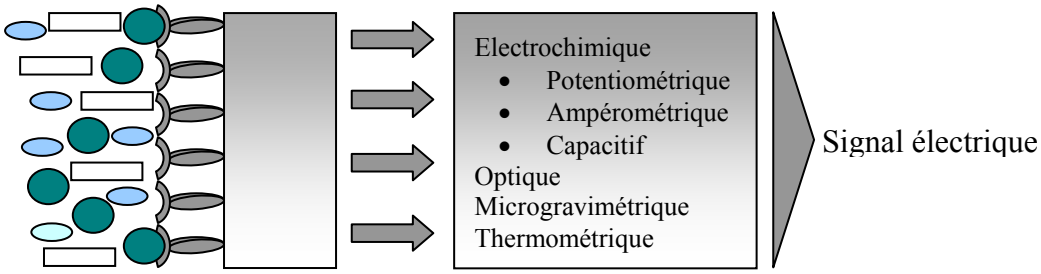


Fig. I-7: Schéma du concept général d'un immunocapteur décrivant l'intégration surfacique de la reconnaissance immunologique et la transduction de signal

Il est possible d'étendre ce type de détection à l'ensemble des protéines. En effet, le système de reconnaissance moléculaire spécifique peut être généralisé. Mais le principal verrou « technologique » de ce type d'application apparaît lors de l'étape d'immobilisation de la molécule à la surface du capteur. En effet, la reconnaissance moléculaire est liée à l'existence d'un site actif de la protéine. La fixation directe (liaison covalente par exemple) de cette dernière à la surface engendre la plupart du temps une déformation de la structure et donc une dénaturation de la molécule. Ainsi, les propriétés de détection peuvent être amoindries voire totalement modifiées en changeant la structure du site actif. C'est pour cela qu'à l'heure actuelle beaucoup d'efforts sont réalisés pour améliorer les procédés de fixation et envisager de nouvelles techniques permettant de venir immobiliser la protéine sur la surface du capteur sans nécessairement la lier de façon covalente.

Enfin, la dernière molécule, et non la moindre, à laquelle nous allons nous intéresser en tant que biorécepteur est l'ADN.

III.1.3 ADN

III.1.3.1 Qu'est ce que l'ADN ?

Il s'agit dans ce paragraphe de rappeler très brièvement ce qu'est l'ADN afin de pouvoir replacer l'application des biocapteurs dans ce secteur.

L'ADN a tout d'abord été découvert en 1871. Quant à sa structure en double hélice, qui ressemble à une échelle, elle a été présentée pour la première fois en 1953, dans un article

rédigé par James Watson et Francis Crick. Les trois lettres A-D-N signifient : acide désoxyribonucléique. Ainsi, l'étude du génome humain est en réalité l'étude de l'ADN. Il s'agit de « l'information » moléculaire de la composition de nos gènes. L'ADN est un langage et ses quatre éléments constitutifs - adénine (A), thymine (T), guanine (G) et cytosine (C) – en sont le code. L'ordre de ces éléments constitutifs, ou l'appariement spécifique de ces bases, transmet les instructions véhiculées par l'ADN.

III.1.3.2 Les capteurs ADN

En terme de capteurs ADN, la recherche est actuellement axée plus particulièrement sur les biopuces. Actuellement, les puces commercialisées intègrent de la biologie moléculaire, de la micro-électronique, de la chimie, de l'analyse d'image et de la bio informatique.

Le principe des biopuces repose sur une technique abondamment utilisée dans les expériences de génétique moléculaire. Elle s'appuie sur la complémentarité des deux brins de la molécule d'ADN ou sur la complémentarité entre une molécule d'ADN et une molécule d'ARN complémentaire. Lors de l'hybridation moléculaire, des fragments d'ADN ou d'ARN (ou « sondes »), marqués par un traceur radioactif ou fluorescent, sont employés pour détecter la présence d'une séquence proche dans un mélange complexe, par exemple un génome entier. Le repérage des hybridations est effectué grâce aux signaux émis par des marqueurs fluorescents greffés sur l'ADN. Il s'agit ensuite, en mesurant la fluorescence, de repérer les sondes qui ont effectivement réagi avec l'ADN marqué contenu dans l'échantillon test. La lecture de la puce nécessite des méthodes optiques sophistiquées (balayage laser, caméra), couplées à un traitement informatique de l'image. Les progrès apportés par les capteurs issus de la microélectronique résident dans les moyens de détection qui permettent de réduire les temps d'analyse et les coûts. De plus, l'originalité réside également dans le fait qu'il n'est plus nécessaire de marquer l'ADN, et que la détection s'effectue en temps réel.

Le principe d'action du capteur va être basé sur le phénomène suivant : l'hybridation sélective de l'ADN cible avec une sonde de nucléotides va provoquer une modification des propriétés soit diélectriques soit mécaniques au niveau du transducteur.

Les transducteurs les plus fréquemment utilisés sont les électrodes or ou carbone [62,19]. On trouve également des capteurs basés sur un effet capacitif [63,64] ou encore sur un effet piézoélectrique[65].

Ce rapide descriptif des principaux biorécepteurs utilisés nous a permis de nous rendre compte des difficultés inhérentes à l'immobilisation de ces particules à la surface du microcapteur. Nous avons décrit dans la première partie des méthodes d'accroche que nous avons qualifiées de directes. L'utilisation de ces techniques engendre, pour la plupart, une

modification de la structure même du biorécepteur. Nous allons voir dans la suite qu'il existe d'autres procédés d'immobilisation, mettant en jeu les polymères, qui vont permettre d'éviter la dénaturation de la biomolécule lorsque cela est nécessaire.

III.2 Utilisation des polymères pour l'immobilisation des biorécepteurs

III.2.1 Adsorption physique et greffage covalent

Parmi les diverses techniques de fixation envisageables, nous allons d'abord retrouver des techniques identiques à celles décrites dans les paragraphes 1.1 et 1.4 : l'adsorption physique et le greffage par liaison covalente. Dans ces cas, le polymère, préalablement déposé, va servir de support inerte ou non aux biorécepteurs. Cette méthode permet de lier de façon covalente des oligonucléotides sur une surface par l'intermédiaire de polypyrrole[66] tout en conservant la possibilité de régénérer le capteur en fixant de nouveaux nucléotides. Pour aller plus loin, l'utilisation de polymères conducteurs comme le polypyrrole améliore grandement la conductivité du signal et permet d'envisager la création de transducteurs totalement organo-biologiques[67].

Ces deux méthodes, couplant polymères et biorécepteurs ne sont pourtant pas les plus utilisées. En effet, on trouve plutôt dans la littérature des techniques de piégeage des bio-molécules.

III.2.2 Immobilisation par piégeage ou confinement

III.2.2.1 Description de la méthode

En utilisant la méthode de piégeage, les bio-particules vont être retenues par le réseau polymérique. Il est important de préciser à ce niveau qu'il existe un processus chimique, ne concernant pas exclusivement les polymères, qui va consister à réticuler les longues chaînes moléculaires. Cela signifie que des liaisons intermoléculaires vont être créées afin de lier ensemble les longues molécules polymériques pour finalement donner une structure rigide se rapprochant fortement des structures cristallines classiques. Les techniques utilisées pour réaliser cette réticulation seront décrites au paragraphe III.2.2.2.

Une fois la réticulation terminée, on peut aisément imaginer la structure d'un polymère équivalent à celle d'un filet (réseau cristallin). Ses mailles seraient assez serrées pour retenir le biorécepteur mais assez lâches également afin de laisser pénétrer le substrat à l'intérieur de l'édifice comme représenté sur la figure I-8. Le piégeage de la bio-molécule dans cette matrice tridimensionnelle va être possible grâce aux différentes méthodes de polymérisation décrites auparavant. Cette technique est d'autant plus intéressante que la structure et les dimensions du maillage vont être facilement modulables étant donné qu'elles dépendent presque entièrement des caractéristiques du polymère.

Le polymère, quand à lui, peut être un support inerte[68,69,70], ou peut exécuter une certaine fonction essentielle à la transduction du signal comme dans les cas de l'adsorption et du greffage décrits dans le paragraphe précédent. C'est surtout le cas des polymères conducteurs et en particulier des polymères électrochimiquement déposés[71,72]. Ils sont devenus très attractifs en tant que matrices de support, particulièrement pour les capteurs électrochimiques, pour lesquels ils peuvent être développés in situ dans des conditions électrochimiques facilement contrôlées. Ainsi, les propriétés de transport d'électrons de ces polymères peuvent dans certains cas être exploitables dans le processus de transduction de signal pour le dispositif de biocapteur.

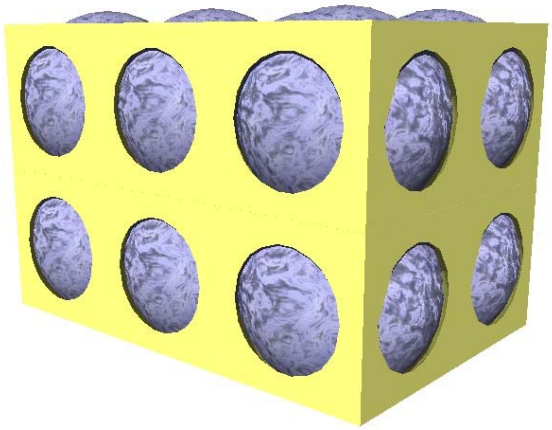


Fig. I-8 : Schématisation du piégeage des bio-molécules dans un réseau polymérique

Les exemples décrits dans la littérature concernent aussi bien les polymères non conducteurs que ceux conducteurs bien qu'on puisse facilement mettre en évidence un net intérêt pour ce dernier type de polymère. Par contre, du point de vue des biorécepteurs, cette méthode d'immobilisation reste principalement réservée aux enzymes.

Pour notre étude, nous avons utilisé cette méthode dite de piégeage. Il semble donc intéressant d'examiner les diverses possibilités qui s'offraient à nous pour construire le réseau polymérique.

III.2.2.2 Techniques de construction du réseau polymérique

Différentes techniques sont utilisées pour créer le réseau tridimensionnel. Celles listées ci-dessous sont les plus couramment rencontrées :

- par bombardement électronique : cela va générer la formation de sites actifs suivie de la réticulation des radicaux libres ainsi créés,
- par utilisation d'agents chimiques tels que le glutaraldéhyde[67] pour créer des liaisons covalentes entre les différentes chaînes polymériques,

- par formation de cryogels[65,73]. Il s'agit pour la plupart de matériaux hydrophiles qui gonflent une fois placés en contact avec l'eau. Ces cryogels sont produits en gelant et en dégelant plusieurs fois les solutions aqueuses de polymère,
- par chauffage et en intégrant un thermo-initiateur au sein du polymère,
- par exposition aux rayons UV et en intégrant un photo-initiateur au sein du polymère[66].

Pour les deux derniers cas, l'ajout et l'activation d'initiateurs thermiques ou photochimiques permettent d'initier la réticulation en créant par exemple des radicaux libres. Cette activation se fait soit par chauffage dans le cas d'un initiateur thermique, soit par irradiation UV pour un initiateur photosensible. Ces deux dernières méthodes nous ont intéressés plus particulièrement et ce sont celles que nous avons finalement utilisées.

IV Développement industriel

Par rapport au champ de la recherche académique, l'offre industrielle actuelle est très réduite. Si on reprend la figure I-2 qui présentait la diversité biologique et technologique des biocapteurs, on peut s'apercevoir que seuls certains aspects sont mis en valeur et en application dans le monde industriel comme représenté sur la figure I-9.

IV.1 L'offre industrielle

Après les travaux de recherche menés par Clark en 1956 concernant l'électrode enzymatique, il a fallu attendre le milieu des années 1970 pour voir la commercialisation d'un capteur de glucose basé sur ce principe par Yellow Spring Instruments. A l'heure actuelle, l'offre proposée est assez bien segmentée. Pour les biocapteurs, elle est presque exclusivement enzymatique. L'ADN et les protéines sont présents dans l'offre concernant les biopuces.

En ce qui concerne la détection électrochimique dans le domaine biomédical, nous pouvons distinguer trois catégories. La première porte sur la mesure de la consommation d'oxygène ou sur la production de peroxyde d'hydrogène. Il faut donc parler de mesures indirectes. Il s'agit dans ce cas d'analyseurs multiples de glucose, lactate, ammoniums, alcools,….

Les fabricants les plus connus sont : Yellow Stone Instruments, Universal Sensors Inc, Eppendorf, Radiometer ou encore Roche. La seconde catégorie englobe les capteurs qui vont utiliser des médiateurs tels que les ions hydrogène et donc la mesure pH-métrique. Les constructeurs de ce type de capteurs, exclusivement réservés à la mesure de la glycémie, sont, entre autres, Bayer ou Medisense / Abbott.

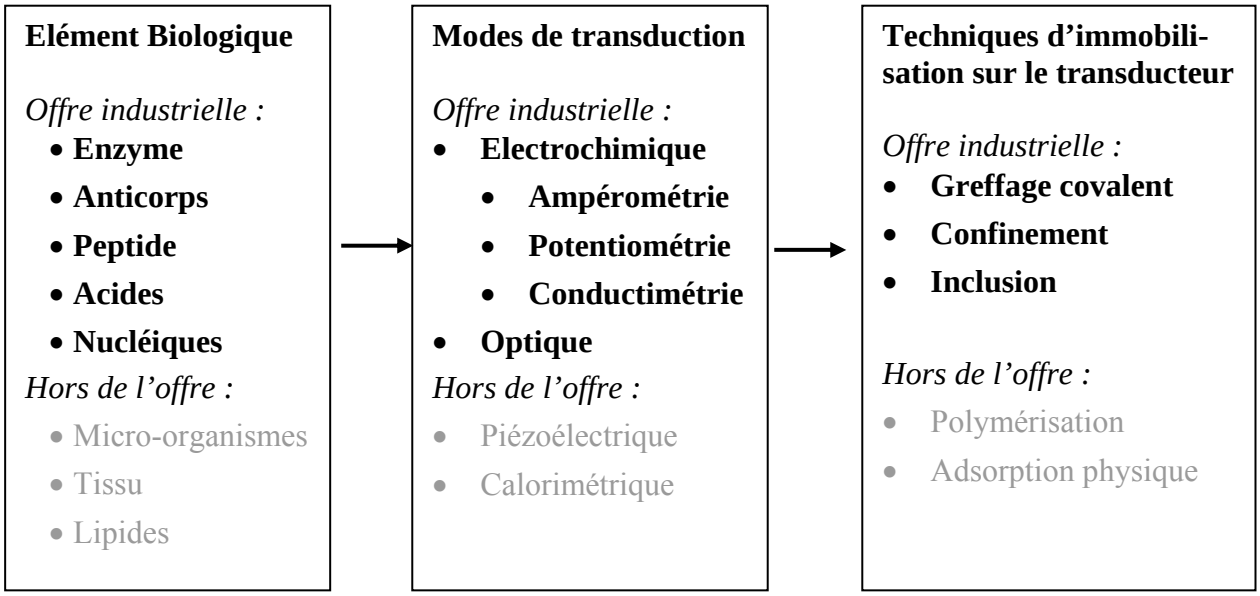


Fig. I-9: Restriction des options au niveau de l'offre industrielle

Enfin, une troisième catégorie peut être envisagée actuellement mais strictement au niveau académique. Il s'agit des biocapteurs utilisant les polymères conducteurs. Dans ces cas là, il y aura un transfert électronique direct, par le biais de l'enzyme immobilisée, entre l'espèce à détecter et la zone sensible du capteur.

Dans l'offre industrielle, on développe de plus en plus des matrices de capteurs tout à fait particulières qui pourront associer les polymères à une détection électronique. Un exemple concret est le nez et la langue électroniques qui sont les appellations communes des capteurs répondant aux flaveurs ou aux odeurs (volatils) ou encore aux goûts (solubles), auxquels est associé un progiciel de reconnaissance des formes. Par ailleurs, pour ces mêmes applications, des polymères par imprégnation moléculaire ont été utilisés avec succès pour préparer un nouveau capteur comprenant les polymères en tant qu'éléments sélectifs et un système de détection ampérométrique comme transducteur. La reproductibilité de ces systèmes est de l'ordre de dix pour cent à l'heure actuelle.

Sur un plan commercial, les nez et les langues électroniques sont fabriqués par de nombreuses sociétés, notamment par Alpha Mos (France) et Bloodhound (Royaume Uni). Ces capteurs sont utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et pour le contrôle qualité de différents produits, typiquement pour les tests en laboratoire ou les contrôles à côté de la ligne, mais à l'avenir, ils pourraient continuer à se développer pour les opérations en ligne. La durée des tests est souvent comprise dans une plage de quelques minutes, et le plus grand inconvénient est le manque de stabilité des capteurs.

IV.2 La demande

Ainsi, peu de biocapteurs sont actuellement commercialisés. Et, à l'heure actuelle, aucun n'utilise directement les polymères et leurs propriétés en tant que matrice d'immobilisation pour les détecteurs biologiques. Aujourd'hui, les capteurs enzymatiques pour la détection du taux de glucose sanguin utilisé par les diabétiques représentent 90 % du marché mondial. Il existe pourtant de nombreuses opportunités dans :

- le domaine de la santé : cholestérol ; acide lactique, urée, hormones, alcool ou drogues illicites…,
- le domaine de l'agroalimentaire : acides aminés, sucres, glutamate et contrôler l'élaboration de nombreux procédés (vin, bière, laitage..), fraîcheur de la viande ou du poisson, contamination bactérienne de la nourriture,
- le domaine de l'environnement : détection de nombreux pesticides, fongicides, nitrates, demande biochimique en oxygène qui est un bon indice de la contamination des eaux.

Aujourd'hui on ne peut plus parler de capteurs seuls mais de systèmes complets à base de capteurs. Dans ces conditions, la tendance de l'offre industrielle, ainsi que celle de la demande, s'orientent vers une amélioration de la convivialité des interfaces système/utilisateur et vers l'autonomie du système minimisant l'intervention de l'utilisateur. On constate donc que l'évolution va vers une miniaturisation des systèmes et une mesure de paramètres multiples avec un passage au format matriciel. Cette dernière direction correspond assez bien à celle que prend la recherche dans le domaine des biocapteurs. En effet, on observe, outre une tendance à la miniaturisation, l'intégration des micro et nanotechnologies avec l'étude plus particulière des chimies de surface de la transduction et de celles des ligands.

En conclusion, les besoins en biocapteurs pour des applications spécifiques sont réels. De très nombreux travaux sont consacrés à leur mise au point et développement. Cet engouement s'appuie sur des analyses de marché faites par des cabinets internationaux quelquefois peu informés des difficultés de transfert technologique. Pour avoir une chance d'être commercialisé, un biocapteur doit démontrer des performances supérieures à une méthode déjà existante ou permettre de réaliser un dosage qui n'existait pas auparavant. Pour atteindre ces objectifs, il existe un nombre significatif de problèmes techniques à résoudre. La réussite de ce pari passe par une étroite collaboration entre les chercheurs, les fabricants, les utilisateurs et les responsables de la réglementation.

Au-delà des informations et des connaissances amenées par cet état de l'art, le choix des polymères utilisés au cours de notre étude ainsi que celui des techniques de réticulation a été intiment lié a un développement industriel sous jacent des techniques de dépôts élaborées dans le cadre de ces travaux . En effet, ce développement a imposé un certain nombre de contraintes qui, couplées à celles imposées par l'utilisation d'entités biologiques, nous ont conduit à la création de notre propre cahier des charges, qui peut être généralisé à l'ensemble des biocapteurs.

Ainsi, à l'heure actuelle, deux grandes tendances freinent le développement industriel des biocapteurs.

La première intervient d'un point de vue biologique. En effet, les problèmes majeurs limitant l'essor, voire la commercialisation, des biocapteurs résident dans la chute importante des activités des éléments biologiques lors de leur élaboration et de leur stockage. La fragilité de la macromolécule biologique en est grandement responsable. Toujours du point de vue biologique, la perméabilité et la biocompatibilité, et à terme le biomimétisme, du polymère qui va être utilisé en tant que matrice hôte sont des paramètres primordiaux pour l'activité et la longévité de la biomolécule et donc la sensibilité et la durée de vie du biocapteur.

La deuxième, du point de vue de la microélectronique, est due au développement des procédés de fabrication adaptés à la technologie du silicium déjà en place. Cela implique le développement et l'adaptation de techniques de fabrication collective pouvant lier le silicium et le vivant. Ainsi, il va falloir intégrer dans des procédés préexistants, de nouveaux matériaux : les polymères et les bio-molécules. Les contraintes apparaissent d'elles même avec les entités biologiques. En effet, leur présence interdit, entre autres, toute montée en température et toute utilisation de solvants organiques.

Enfin, l'industrialisation de tels systèmes destinés en particulier à l'analyse biomédicale, ne pourra se faire qu'à condition d'abaisser le coût le plus possible.

Devant ce cahier des charges très contraignant, nous avons choisi deux types d'approches, toutes les deux basées sur l'utilisation de capteurs sensibles aux variations de pH de type ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor), mais différenciées par le mode de lecture. La première approche, basée sur une lecture directe du pH est développée dans le chapitre II. La seconde méthode, faisant intervenir un élément intermédiaire, à savoir une enzyme, sera présentée dans le chapitre III.

Bibliographie

[1] LC. Clark, Jnr. Ann. NY Acad. Sci. 102, 29-45,1962

[2] A.P.F. Turner, I. Karube,, G.S.Wilson
Biosensors: fundamentals and applications. Oxford University Press, New York. 1987

[3] J.M Kauffmann,., G.G Guilbault,.
Enzyme electrode biosensors: theory and applications. Bioanalytical Applications of Enzymes, vol. 36. Wiley 1992
;
[4] T. Deng, H. Wang, J.S. Li, S. Hu, G. Shen and R. Yu
A novel immunosensor based on self-assembled chitosan/alginate multilayers for the detection of factor B (2004), In Press, Corrected Proof, Sens. Actuators B

[5] C. Michel, F. Battaglia-Brunet, C. Minh, M. Bruschi and I. Ignatiadis
Amperometric cytochrome c3-based biosensor for chromate determination, Biosens Bioelectron, Volume 19 (2003), Issue 4, Pages 345-352, 2004.

[6] C. Bonnet, S. Andreescu and J-L. Marty
Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes, Anal Chim Acta,Volume 481 (2003), Issue 2, Pages 209-211, 2003.

[7] R. Rella, P. Siciliano, F. Quaranta, T. Primo, L. Valli and L. Schenetti
Poly[3-(butylthio)thiophene] Langmuir–Blodgett films as selective solid state chemiresistors for nitrogen dioxide, Colloid Surface A, Volumes 198-200 (2002), Pages 829-833, 2002.

[8] D. Xie, Y. Jiang, W. Pan and Y. Li
A novel microsensor fabricated with charge-flow transistor and a Langmuir–Blodgett organic semiconductor film, Thin Solid Films, Volume 424 (2003), Issue 2, Pages 247-252

[9] S. Rochefeuille, C. Jimenez, S. Tingry, P. Seta and J. P. Desfours
Mixed Langmuir–Blodgett monolayers containing carboxylic ionophores. Application to Na+ and Ca2+ ISFET-based sensors, Mater Sci Eng C,Volume 21 (2001), Issues 1-2, Pages 43-46

[10] C. Jimenez, S. Rochefeuille, R. Berjoan, P. Seta, J. P. Desfours and C. Dominguez
Nanostructures for chemical recognition using ISFET sensors, Microelectron J, Volume 35 (2004), Issue 1, Pages 69-71

[11] Y. Hou, N. Jaffrezic-Renault, A. Zhang, J. Wan, A. Errachid and J-M. Chovelon
Study of pure urease Langmuir–Blodgett film and application for biosensor development, Sens. Actuators B, Volume 86 (2002), Issues 2-3, Pages 143-149

[12] L. Pastorino and C. Nicolini
Langmuir–Blodgett films of lipase for biocatalysis, Mater Sci Eng C, Volume 22 (2002), Issue 2,Pages 419-422

[13] S. T. Pathirana, J. Barbaree, B. A. Chin, M. G. Hartell, W. C. Neely and V. Vodyanoy

Rapid and sensitive biosensor for Salmonella, Biosens Bioelectron, Volume 15 (2000), Issues 3-4, Pages 135-141

[14] G. K. Chudinova, A. V. Chudinov, V. V. Savransky and A. M. Prokhorov
The study of the antigen-antibody reaction by fluorescence method in LB films for immunosensor, Thin Solid Films, Volume 307 (1997), Issues 1-2,Pages 294-297

[15]E. Pavlovic, A.P. Quist, U. Gelius and S. Oscarsson
Surface Functionalization of Silicon Oxide at Room Temperature and Atmospheric Pressure, J. Colloid Interf Sci 254(2002), Pages 200–203

[16] Z-H. Wang and G. Jin
Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry, Journal of Immunological Methods, Volume 285, Issue 2,(2004), Pages 237-243

[17] http://www-biol.paisley.ac.uk/marco/enzyme_electrode/Chapter1/Silane.htm

[18] R. Mlika, H. Ben Ouada, F. Mhenni, G. Gamoudi, R. Kalfat and N. Jaffrezic-Renault
Thin sensitive organic membranes on selective iron-ion sensors, Synthetic Met, Volume 90 (1997), Issue 3, Pages 239-243

[19] D. Narducci, P. Bernardinello and M. Oldani
Investigation of gas–surface interactions at self-assembled silicon surfaces acting as gas sensors, Appl Surf Sci ,Volumes 212-213 (2003), Pages 491-496

[20] J. P. Cloarec, N. Deligianis, J. R. Martin, I. Lawrence, E. Souteyrand, C. Polychronakos and M. F. Lawrence
Immobilization of homooligonucleotide probe layers onto Si/SiO2 substrates: characterization by electrochemical impedance measurements and radiolabelling, Biosens Bioelectron, Volume 17 (2002), Issue 5, Pages 405-412

[21] E. Souteyrand, J. P. Cloarec, J. R. Martin, C. Wilson, I. Lawrence, S. Mikkelsen, and M. F. Lawrence
Direct Detection of the Hybridization of Synthetic Homo-Oligomer DNA Sequences by Field Effect, J Phys Chem B, Volume. 101 (1997), Issue 15, Pages 2980-2985

[22] N. Wrobel, W. Deininger, P. Hegemann and Vladimir M. Mirsky
Covalent immobilization of oligonucleotides on electrodes, Colloid Surface B,Volume 32 (2003), Issue 2, Pages 157-162

[23] O. Tamarin, S. Comeau, C. Déjous, D. Moynet, D. Rebière, J. Bezian and J. Pistré
Real time device for biosensing: design of a bacteriophage model using love acoustic waves, Biosens Bioelectron, Volume 18 (2003), Issues 5-6, Pages 755-763

[24] C. A. Betty, R. Lal, D. K. Sharma, J. V. Yakhmi and J. P. Mittal
Macroporous silicon based capacitive affinity sensor—fabrication and electrochemical studies, Sens. Actuators B, Volume 97 (2003), Issues 2-3, Pages 334-343

[25] V. M. Mirsky, M. Riepl and O.S. Wolfbeis
Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen-antibody reactions on monomolecular alkylthiol films on gold electrodes, Biosens Bioelectron,Volume 12 (1997), Issues 9-10, Pages 977-989

[26] R. D. Vaughan, C. K. O'Sullivan and G. G. Guilbault
Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of Listeria monocytogenes, Enzyme Microb Tech, Volume 29 (2001), Issue 10, Pages 635-638

[27] I. Willner, B. Willner and E. Katz
Functional biosensor systems via surface-nanoengineering of electronic elements, Rev Mol Biotech, Volume 82 (2002), Issue 4, Pages 325-355

[28] A. Senillou, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet and S. Cosnier
A miniaturized urea sensor based on the integration of both ammonium based urea enzyme field effect transistor and a reference field effect transistor in a single chip, Talanta, Volume 50 (1999), Issue 1, Pages 219-226

[29] R. Koncki, E. Leszczyska, A. Cybulska and S. Gab
Penicillin enzyme biosensors based on pH membrane electrodes, Anal Chim Acta,Volume 321 (1996), Issue 1, Pages 27-34

[30] D. Quan, Y. Kim and W. Shin
Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface, J Electroanal Chem, Volume 561 (2004), Pages 181-189

[31] A. Fang, H.T. Ng and S.F. Yau Li
A high-performance glucose biosensor based on monomolecular layer of glucose oxidase covalently immobilised on indium–tin oxide surface, Biosens Bioelectron, Volume 19 (2003), Issue 1,Pages 43-49

[32] A. K. Singh, A. W. Flounders, J. V. Volponi, C. S. Ashley, K. Wally and J. S. Schoeniger
Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports, Biosens Bioelectron, Volume 14 (1999), Issues 8-9,Pages 703-713

[33] N. Angelova and D. Hunkeler
Rationalizing the design of polymeric biomaterials, Trends Biotechnol, Volume 17 (1999), Issue 10, Pages 409-421

[34] G. Harsanyi
Polymer films in sensor applications: a review of present uses and future possibilities, Sensor review, Volume 20 (2000), Issue 2, Pages 98-105

[35] H-K. Jun, Y-S. Hoh, B-S. Lee, S-T. Lee, J-O. Lim, D-D. Lee and J-S. Huh
Electrical properties of polypyrrole gas sensors fabricated under various pretreatment conditions, Sens. Actuators B, Volume 96 (2003), Issue 3, Pages 576-581

[36] D. Meyerhofer
Characteristics of resist films produced by spinning, J. Appl. Phys., Volume 49 (1978), Pages 3993-3997

[37] M. De Wit, E. Vanneste, F. Blockhuys, H. J. Geise, R. Mertens and P. Nagels
Application of Poly(thienylene vinylene) as a chemiresistor for organic vapours, Synthetic Met, Volume 85 (1997), Issues 1-3, Pages 1303-1304

[38] B-W. Koo, C-K. Song and C. Kim
CO gas sensor based on a conducting dendrimer, Sens. Actuators B, Volume 77 (2001), Issues 1-2,Pages 432-436

[39] C. Ruan, K-G. Ong, C. Mungle, M. Paulose, N-J. Nickl and C-A. Grimes
A wireless pH sensor based on the use of salt-independent micro-scale polymer spheres, Sens. Actuators B, Volume 96 (2003), Issues 1-2, Pages 61-69

[40] B. Kovács, G. Nagy, R. Dombi and K. Tóth
Optical biosensor for urea with improved response time, Biosens Bioelectron, Volume 18 (2003), Issues 2-3, Pages 111-118

[41] V. Saxena and B. D. Malhotra
Prospects of conducting polymers in molecular electronics, Current Applied Physics, Volume 3 (2003), Issues 2-3, Pages 293-305

[42] M. Gerard, A. Chaubey and B. D. Malhotra
Application of conducting polymers to biosensors, Biosens Bioelectron, Volume 17 (2002), Issue 5, Pages 345-359

[43] H. Suzuki, T. Tokuda, T. Miyagishi, H. Yoshida and N. Honda
A disposable on-line microsystem for continuous sampling and monitoring of glucose, Sens. Actuators B, Volume 97 (2004), Issue 1, Pages 90-97

[44] D. Pan, J. Chen, L. Nie, W. Tao and S. Yao
An amperometric glucose biosensor based on poly(o-aminophenol) and Prussian blue films at platinum electrode, Anal Biochem, Volume 324 (2004), Issue 1, Pages 115-122

[45] P. U. Abel and T. von Woedtke
Biosensors for in vivo glucose measurement: can we cross the experimental stage, Biosens Bioelectron, Volume 17 (2002), Issues 11-12, Pages 1059-1070

[46] S. Cosnier, S. Szunerits, R.S. Marks, A. Novoa, L. Puech, E. Perez and I. Rico-Lattes
A comparative physical study of two different hydrophilic synthetic latex matrices for the construction of a glucose biosensor, Talanta, Volume 55 (2001), Issue 5, Pages 889-897

[47] N.F. Sheppard Jr ,D.J. Mears and A. Guiseppi-Elie
Model of an immobilized enzyme conductimetric urea biosensor, Biosens Bioelectron, Volume 11 (1996), Issue 10, Pages 967-979

[48] J.M. C. S. Magalhães and A.A. S. C. Machado
Urea potentiometric biosensor based on urease immobilized on chitosan membranes, Talanta, Volume 47 (1998), Issue 1, Pages 183-191

[49] A. P. Soldatkin, V. Volotovsky, A. V. El'skaya, N. Jaffrezic-Renault and C. Martelet
Improvement of urease based biosensor characteristics using additional layers of charged polymers, Anal Chim Acta, Volume 403 (2000), Issues 1-2, Pages 25-29

[50] A. P. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C. Martelet and N. Jaffrezic-Renault
A novel urea sensitive biosensor with extended dynamic range based on recombinant urease and ISFETs, Biosens Bioelectron, Volume 19 (2003), Issue 2, Pages 131-135

[51] A.P. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C. Martelet and N. Jaffrezic-Renault
Creatinine sensitive biosensor based on ISFETs and creatinine deiminase immobilised in BSA membrane, Talanta, Volume 58 (2002), Issue 2, Pages 351-357

[52] B. Tombach, J. Schneider, F. Matzkies, R.M. Schaefer and G.C. Chemnitius
Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients, Clin Chim Acta, Volume 312 (2001), Issues 1-2, Pages 129-134

[53] C. A. B. Garcia, G. de Oliveira Neto and L. T. Kubota
New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and -fructose 5-dehydrogenase immobilized by different processes, Anal Chim Acta, Volume 374 (1998), Issues 2-3, Pages 201-208

[54] F-A.Vega, C.G. Núñez, B. Weigel, B. Hitzmann and J. C. Diaz Ricci
On-line monitoring of galactoside conjugates and glycerol by flow injection analysis, Anal Chim Acta, Volume 373 (1998), Issue 1, Pages 57-62

[55] S. Singh, A. Chaubey and B. D. Malhotra
Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conducting polypyrrole films, Anal Chim Acta, Volume 502 (2004), Issue 2, Pages 229-234

[56] S. Jawaheer, S. F. White, S. D. D. V. Rughooputh and David C. Cullen
Development of a common biosensor format for an enzyme based biosensor array to monitor fruit quality, Biosens Bioelectron, Volume 18 (2003), Issue 12, Pages 1429-1437

[57] S. Andreescu, T. Noguer, V. Magearu and J-L. Marty
Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents, Talanta, Volume 57 (2002), Issue 1, Pages 169-176

[58] V.G. Andreou and Y.D. Clonis
Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol–gel entrapped bromcresol green for the determination of atrazine, Anal Chim Acta,Volume 460 (2002), Issue 2, Pages 151-161

[59] L. Campanella, L. Persi and M. Tomassetti
A new tool for superoxide and nitric oxide radicals determination using suitable enzymatic sensors, Sens. Actuators B,Volume 68 (2000), Issues 1-3, Pages 351-359

[60] K. Wan, J. M. Chovelon, N. Jaffrezic-Renault and A. P. Soldatkin
Sensitive detection of pesticide using ENFET with enzymes immobilized by cross-linking and entrapment method, Sens. Actuators B, Volume 58 (1999), Issues 1-3, Pages 399-408

[61] P.B. Luppa, L.J. Sokoll and D.W. Chan
Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry, Clin Chim Acta, Volume 314 (2001), Issues 1-2, Pages 1-26

[62] F. Lucarelli, G. Marrazza, A.P. F. Turner and M. Mascini
Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors, Biosens Bioelectron, Volume 19 (2004), Issue 6, Pages 515-530

[63] F. Wei, B. Sun, Y. Guo and X-S. Zhao
Monitoring DNA hybridization on alkyl modified silicon surface through capacitance measurement, Biosens Bioelectron, Volume 18 (2003), Issue 9, Pages 1157-1163

[64] C. Guiducci, C. Stagni, G. Zuccheri, A. Bogliolo, L. Benini, B. Samorì and B. Riccò
DNA detection by integrable electronics, Biosens Bioelectron, Volume 19 (2004), Issue 8, 15, Pages 781-787

[65] F. He and S. Liu
Detection of P. aeruginosa using nano-structured electrode-separated piezoelectric DNA biosensor, Talanta, Volume 62 (2004), Issue 2, Pages 271-277

[66]A. Dupont-Filliard, A. Roget, T. Livache and M. Billon
Reversible oligonucleotide immobilisation based on biotinylated polypyrrole film, , Anal Chim Acta, Volume 449 (2001), Issues 1-2, Pages 45-50

[67] F. Garnier, H. Korri-Youssoufi, P. Srivastava, B. Mandrand and T. Delair
Toward intelligent polymers: DNA sensors based on oligonucleotide-functionalized polypyrroles, Synthetic Met, Volume 100 (1999), Issue 1, Pages 89-94

[68] L. Doretti, D. Ferrara, S. Lora, F. Schiavon and F.M. Veronese Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly(ethylene glycol)-modified choline oxidase in a poly(vinyl alcohol) cryogel membrane, Enzyme Microb Tech, Volume 27 (2000), Issues 3-5, Pages 279-285

[69] C. Puig-Lleixà, C. Jiménez, J. Alonso and J. Bartrolí
Polyurethane–acrylate photocurable polymeric membrane for ion-sensitive field-effect transistor based urea biosensors, Anal Chim Acta, Volume 389 (1999), Issues 1-3, Pages 179-188

[70] J. Schneider, B. Gründig, R. Renneberg, K. Cammann, M. B. Madaras, R. P. Buck and K. -D. Vorlop
Hydrogel matrix for three enzyme entrapment in creatine/creatinine amperometric biosensing, Anal Chim Acta, Volume 325 (1996), Issue 3, Pages 161-167

[71] C. Védrine, S. Fabiano and C. Tran-Minh
Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support, Talanta, Volume 59 (2003), Issue 3, Pages 535-544

[72] R. Garjonyte and A. Malinauskas
Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in poly(o-phenylenediamine) layer, Sens. Actuators B, Volume 56 (1999), Issues 1-2, Pages 85-92

[73] L. Doretti, D. Ferrara, P. Gattolin and S. Lora
Amperometric biosensor with physically immobilized glucose oxidase on a PVA cryogel membrane, Talanta, Volume 44 (1997), Issue 5, Pages 859-866

Chapitre II

La première approche que nous avons étudiée, propose d'utiliser directement les capacités de détection des variations du pH du capteur pH-ISFET induites par l'apparition d'ions H_3O^+ due à une activité bactérienne.

Pour cela, nous nous sommes proposés d'amener sur la zone sensible du capteur, grâce à un polymère thermoformé, à la fois le réactif et le bio-récépteur mais cela, en quantité très réduite. Cette méthode d'analyse, basée sur une lecture directe du pH s'apparente aux dosages réalisés par colorimétrie à l'aide des galeries d'identification commerciales du type galerie API fabriquées par Biomérieux (figure II-1).

Fig. II - 1: Exemple de galerie d'identification de type API de chez Biomérieux

Ainsi, dans ce chapitre, après avoir présenté brièvement le principe des capteurs à effet de champ que nous avons utilisés, nous présenterons les systèmes que nous avons inventés pour confiner les réactifs et réactants à proximité directe de la zone réactive du capteur chimique.

I Présentation des capteurs chimiques à effet de champ (ChemFETs)

Le terme ChemFET est un terme générique qui englobe l'ensembles des capteurs chimiques basés sur le principe du transistor à effet de champ. Nous avons utilisé pour nos expérimentations deux types de capteurs chimiques : l'ISFET (Ion Field Effect Transistor) sensible aux ions H^+, puis dans un second temps, l'ENFET (Enzymatic Field Effect Transistor). L'ENFET est un ISFET dont la grille sensible a été modifiée par l'ajout d'enzyme. Ainsi le capteur n'est plus sensible aux ions mais au substrat spécifique de l'enzyme choisie.

I.1 Principe de fonctionnement des ISFETs

L'ISFET a été inventé par Bergveld[1] en 1970. Il a permis de mesurer l'activité d'ions hydrogène en solution, et donc par extension, leur concentration. Le pH-ISFET est constitué d'un MOSFET (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor) sans grille de mesure de commande métallique et est plongé directement dans la solution dont on veut mesurer le pH.

I.1.1 Structure MOS (Métal-Oxyde-Semi-conducteur) ou MOSFET

Le principe de fonctionnement du MOSFET est bien connu. Dans un substrat de silicium de type P (par exemple), on implante deux caissons de dopage N formant la source et le drain qui délimitent une zone centrale dans laquelle, par polarisation de la grille (oxyde mince métallisé), on crée un canal de conduction de même type que la source et le drain. L'instauration du canal nécessite donc une inversion du substrat en surface (les électrons devenant majoritaires), qui n'intervient que lorsque le champ électrique en surface du silicium atteint une valeur critique développée par une tension de grille appelée tension de seuil V_T. La structure d'un transistor MOSFET est présentée sur la figure II-2.

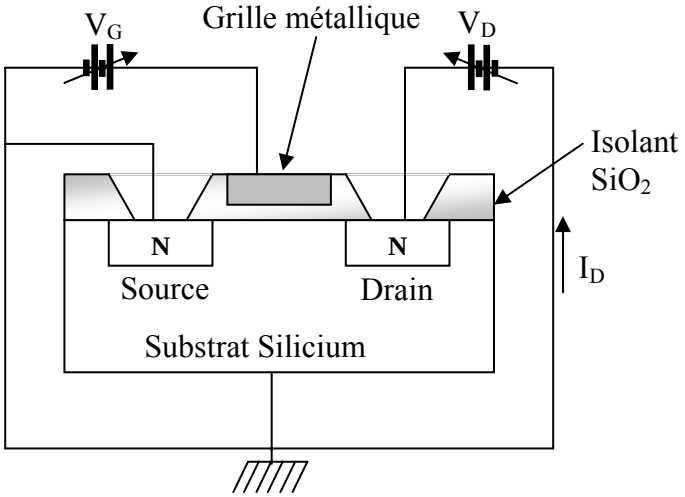


Fig. II - 2: Schéma du MOSFET.

Pour des valeurs inférieures à cette tension V_T, le canal n'est pas formé, il n'y a pas de courant entre source et drain, le transistor est bloqué. Pour des valeurs supérieures à cette tension V_T, le canal est ouvert, le transistor conduit et le courant I_{DS} entre source et drain est fonction des tensions appliquées V_{DS} (entre source et drain) et V_G (tension de grille). Le transistor est dans une zone de fonctionnement « ON SAT ». Lorsqu'on augmente les tensions de polarisation, le champ électrique développé au droit du drain induit un pincement du canal à partir duquel le courant I_{DS} est quasiment indépendant de la tension Drain-Source V_{DS}. On est alors en régime « ON ».

L'équation qui régit la tension de seuil d'un MOSFET s'écrit:

$$V_T = W_M - W_{Si} - 2\varphi_f - \frac{Q_{ox} + Q_{SS}}{C_{ox}} \qquad \textit{Eq. 1}$$

Où $W_M - W_{Si}$ reflète la différence des travaux de sortie entre la grille métallique W_M et le silicium W_{Si}. Q_{ox} et Q_{SS} sont respectivement les charges dans l'oxyde et à l'interface oxyde – silicium. φ_f caractérise le niveau de dopage du substrat.

I.1.2 ISFET

La structure d'un ISFET est identique à celle d'un MOSFET comme le montre la figure II-3. Dans le cas de l'ISFET, la métallisation de grille est remplacée par l'électrolyte et la solution de référence. La tension de seuil va donc être fonction des caractéristiques chimiques. De même que pour l'équation 1, nous pouvons écrire la tension de seuil sous la forme :

$$V_T = W_{Si} - W_{ref} + \varphi_0 - \frac{Q_{ox} + Q_{SS}}{C_{ox}} - 2\varphi_f = V_{T0} + \varphi_0 \qquad \textit{Eq. 2}$$

Où $W_{Si} - W_{ref}$ reflète la différence des travaux de sortie entre le silicium W_{Si} et l'électrode de référence W_{ref}. Ainsi, V_{T0} ne dépend que des caractéristiques du composant ISFET et φ_0 représente la différence de potentiel entre la membrane sensible et la solution électrolyte. Etant donné l'équilibre qui existe entre l'ion X^{Z+} à doser en solution et sa forme chimique dans la membrane sensible, φ_0 est fonction de l'activité de X^{Z+}.

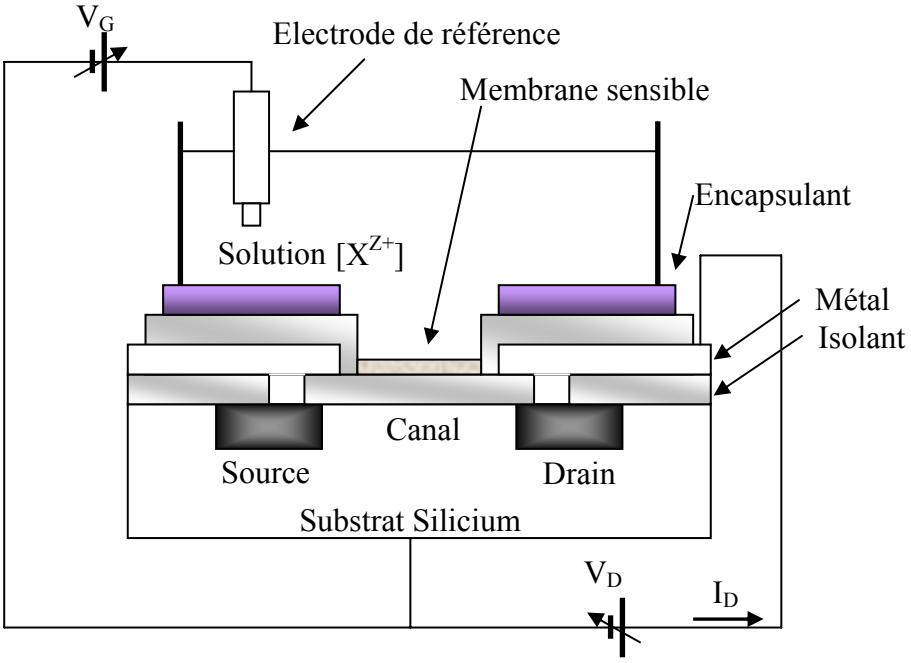


Fig. II - 3: Schéma de l'ISFET

Le principe de fonctionnement de l'ISFET est donc basé sur le piégeage des ions au niveau de la couche sensible. Les charges piégées vont induire une variation du potentiel chimique φ_0 et donc de la tension de seuil du transistor.

Les modèles qui permettent de calculer le potentiel chimique φ_0 font une analyse complète de l'interface électrolyte/solution. Parmi ces différents modèles, la théorie du site-binding[2] est celui qui semble convenir le mieux.

I.2 Propriétés électrochimiques de l'interface électrolyte/solide

Seule la zone de grille de l'ISFET est en contact avec l'électrolyte, la source et le drain étant protégés. On fait l'hypothèse que l'électrode de grille est idéalement bloquante et donc, aucune charge ne peut traverser l'interface lorsque le potentiel d'électrode varie. Le comportement de cette interface va être analogue à celui d'un condensateur. Son potentiel va donc être purement électrostatique et déterminé par la concentration des ions présents à la surface.

Dans ce cas, lors de la mise en contact de l'électrode et de l'électrolyte, l'impédance inter-faciale résulte en fait de deux contributions : la première capacité est la conséquence de la formation de la double couche décrite dans la théorie de Gouy – Chapman – Stern, la seconde capacité est relative aux réactions surfaciques avec les ions H+ et OH- de l'électrolyte.

Si la première contribution est facilement confirmée par une mesure directe de la capacité de la double couche, la deuxième contribution ne peut être directement mesurée. Il a donc été proposé par Yates *et al* en 1974[2], la théorie dite du site binding.

I.2.1 L'électrolyte

Dans un premier temps, considérons uniquement la solution d'électrolyte. La loi d'action des masses permet d'exprimer la densité de produit issu de la dissociation de l'eau :

$$H_2O \Leftrightarrow H^+ + OH^-$$
$$K_e = [H^+]\ [OH^-] = 10^{-14}\ \text{ions.cm}^{-3}$$

L'ajout d'acides ou de bases va modifier l'équilibre entre H^+ et OH^-.

Le processus de conduction dans un électrolyte est complexe. Les ions (surtout les cations) sont généralement hydratés et donc, un ensemble de molécules d'eau leur est associé. Leur mouvement dans l'électrolyte est donc sujet à diverses interactions parmi lesquelles nous pouvons citer :

- ions – ions,
- liaisons hydrogènes,
- résistance hydrodynamique.

Les interactions ions – ions sont correctement modélisées par la théorie de Debye-Huckël qui considère l'ion comme une charge ponctuelle et l'électrolyte comme un milieu diélectrique continu. Mais les interactions les plus importantes sont les interactions électrostatiques. Elles peuvent modifier sensiblement les propriétés de solutions à plus haute concentration.

I.2.2 Interface électrolyte – solide

Considérons maintenant l'interface électrolyte – solide. Lorsque deux phases sont mises en contact, il en résulte une redistribution des charges et des potentiels. La zone de charge d'espace va être formée de plusieurs couches de structures différentes qui vont définir la double couche électrique. Cette répartition des charges peut être décrite en combinant le modèle d'Helmholtz et celui de Gouy – Chapman. Il s'agit alors du modèle de Stern.

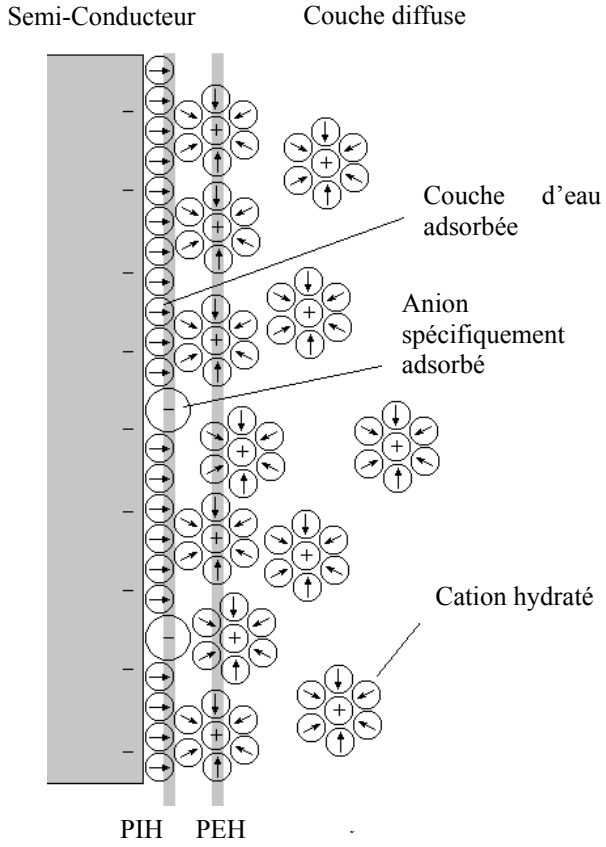


Fig. II - 4 : Schéma de principe de la double couche à l'interface solide - électrolyte

Ce modèle distingue clairement trois régions comme le montre la figure II-4.

La première région, la plus proche du solide, est appelée couche interne. Elle contient les molécules de solvant et certaines espèces dont on dit qu'elles sont spécifiquement adsorbées. Cette région, qui s'étend jusqu'au lieu des centres électriques des ions spécifiquement adsorbés est délimitée par plan interne d'Helmholtz (PIH).

La seconde région est limitée par le plan externe d'Helmholtz (PEH) et le PIH. Le PEH est défini par la distance minimale entre le lieu des centres de charge des ions solvatés et la couche d'ions spécifiquement adsorbés.

La troisième région, qui s'étend du plan externe d'Helmholtz jusqu'au sein de l'électrolyte comprend les ions non spécifiquement adsorbés. Il s'agit de la couche diffuse. Le potentiel de cette couche, qui dépend de la concentration de l'électrolyte est donné par l'équation de Poisson – Boltzmann.

En effet, cette dernière zone est comparable à la zone de charge d'espace des semi-conducteurs. La relation entre le potentiel électrique φ_0 (x) à une distance x du plan PEH et la densité de charge d'espace ρ(x) est donc :

$$\frac{d^2\varphi_0(x)}{dx^2} = -\frac{\rho(x)}{\varepsilon_r\varepsilon_0} \qquad \textit{Eq. 3}$$

où ε_r est la permittivité de l'eau et ε_0 celle du vide.

La distribution des ions dans la double couche sous l'action du potentiel et de l'agitation thermique est décrite par la statistique de Boltzmann :

$$C_i(x) = C_{i0}\exp\left(-\frac{q_i\varphi_0(x)}{kT}\right) \qquad \textit{Eq. 4}$$

où C_i et q_i sont respectivement la concentration et la charge de l'ion i.

La densité de charge est :

$$\rho(x) = \sum_i C_i q_i = \sum_i q_i C_{i0}\exp\left(-\frac{q_i\varphi_0(x)}{kT}\right) \qquad \textit{Eq. 5}$$

La combinaison des équations 1 et 3 conduit à l'équation Poisson-Boltzmann :

$$\frac{d^2\varphi_0(x)}{dx^2} = -\frac{1}{\varepsilon_r\varepsilon_0}\sum_i C_{i0}q_i\exp\left(-\frac{q_i\varphi_0(x)}{kT}\right) \qquad \textit{Eq. 6}$$

Pour un électrolyte symétrique, dans lequel les ions ont une charge de valeur absolue q :

$$q_+ = -q_- = q$$
$$C_+ = C_- = C$$

Il est possible d'intégrer l'équation 6 avec comme conditions aux limites :

$$\varphi_0(x) = \varphi_{0d} \text{ à } x = 0$$
$$\varphi_0(x) = 0 \text{ et } \frac{d\varphi_0}{dx} = 0 \text{ à } x \to \infty$$

La solution de l'équation 6 est alors donnée par[4] :

$$\frac{d\varphi_0(x)}{dx} = -\left(\frac{8kTC}{\varepsilon_r\varepsilon_0}\right)^{1/2} \cdot \sinh\left(\frac{q\varphi_0(x)}{2kT}\right) \qquad \textit{Eq. 7}$$

En utilisant la loi de Gauss, on obtient la charge de la couche diffuse :

$$\sigma_d = -(8\varepsilon_r\varepsilon_0 kTC)^{1/2} \cdot \sinh\left(\frac{q\varphi_{0d}}{2kT}\right) \qquad \textit{Eq. 8}$$

Il est maintenant possible de calculer la capacité différentielle c_d de la couche diffuse en différenciant l'équation précédente :

$$c_d = -\frac{d\sigma_d}{d\varphi_{0d}} = \left(\frac{2q^2\varepsilon_r\varepsilon_0 C}{kT}\right)^{1/2} \cdot \cosh\left(\frac{q\varphi_{0d}}{2kT}\right) \qquad \textit{Eq. 9}$$

Cette capacité diffuse, qui varie avec la concentration passe par un minimum. Cd croît rapidement de part et d'autre de ce minimum. Stern, en tenant compte de la taille finie des ions, et du fait qu'ils ne peuvent approcher la surface qu'à une distance finie, a montré que la capacité est en réalité constituée de deux composantes montées en série :

- une capacité indépendante du potentiel correspondant à la capacité des charges portées par le plan externe d'Helmholtz,
- une capacité en forme de V correspondant à la capacité de la charge réellement diffuse.

I.2.3 Système Electrolyte – Isolant – Silicium (EIS)

Pour les structures EIS, l'échange d'ions est le phénomène dominant dans la création d'un potentiel d'électrode. Ce phénomène sera bien évidemment favorisé dans le cas de dopage du semi-conducteur. S'il n'y avait pas de réactions interfaciales, (surface totalement bloquée), la distribution du potentiel dans un tel système serait donnée par les interactions électrostatiques uniquement.

Pour de tels systèmes, l'expérience a montré qu'il existait une déviation à la loi de Nernst. Il a donc fallu trouver un autre modèle.

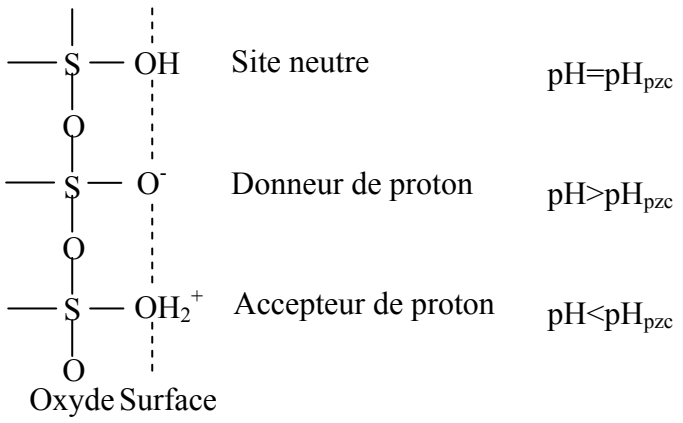


Fig. II - 5: Représentation schématique de la théorie du site-binding

La théorie du site binding est à l'heure actuelle la théorie qui semble le mieux convenir[3,4,5]. Cette théorie est basée sur l'existence de groupements silanol à la surface de l'isolant comme illustré sur la figure II-5. Ces groupements présentent un caractère amphotère et peuvent être, suivant le pH de la solution, chargés positivement, négativement ou neutres. Un pH particulier est celui qui correspond à l'état de charge électrique nulle à la surface de la membrane. On notera ce pH par pH_{pzc}, c'est à dire « point of zero charge pH ».

C'est la présence de ces groupements qui induit la déviation de comportement du système par rapport au comportement décrit par l'équation de Nernst.

Le modèle du site binding est donc basé sur les fondamentaux thermodynamiques des équilibres des réactions avec les groupements fonctionnels surfaciques et sur la théorie de Gouy-Chapman-Stern concernant la distribution des ions à l'interface électrolyte / solide.

La charge à la surface du solide va être générée par l'ionisation des groupements surfaciques due à leur réaction d'équilibre acido-basique avec les ions H^+ de l'électrolyte. La charge sera donc fonction de la concentration en ions hydrogène dans la solution et du potentiel de surface qui lui même dépend de la composition de l'électrolyte.

Par l'intermédiaire de ce modèle, la manière la plus simple d'établir la relation entre le potentiel de surface φ_0 et le pH de la solution est d'utiliser les constantes d'équilibres K_a (constante d'acidité) et K_b (constante de basicité) des réactions de dissociation des sites hydroxyles amphotères.

$$\mathrm{Si-OH} \leftrightarrow \mathrm{Si\text{-}O^-} + \mathrm{H_S^+} \qquad K_a = [\mathrm{Si-O^-}]\cdot[\mathrm{H_S^+}]/[\mathrm{Si-OH}] \qquad \textit{Eq. 10}$$

$$\mathrm{Si-OH} + \mathrm{H_S^+} \leftrightarrow \mathrm{Si\text{-}OH_2^+} \qquad K_b = [\mathrm{Si\text{-}OH_2^+}]/[\mathrm{Si-OH}]\cdot[\mathrm{H_S^+}] \qquad \textit{Eq. 11}$$

Où $[H_S^+]$ représente la concentration en ions H^+ à la surface de l'isolant et $[H^+]$ représente la concentration des ions H^+ dans l'électrolyte. Comme dans l'équation 4, la distribution des ions hydrogène dans l'électrolyte peut être décrite par la statistique de Boltzman :

$$[H_S^+] = [H^+]e^{-q\varphi_0/kT} \qquad \textit{Eq. 12}$$

La théorie du site binding permet ainsi de montrer que :

$$[H^+] = (K_a/K_b)^{1/2} e^{(q\varphi_0/kT)} F(\varphi_0) \qquad \textit{Eq. 13}$$

En prenant le logarithme de l'équation précédente, on aboutit à :

$$pH = -\log(K_a/K_b)^{1/2} - \frac{q\varphi_0}{kT(\ln 10)} - \log F(\varphi_0) \qquad \textit{Eq. 14}$$

Ainsi, en isolant le potentiel φ_0, on obtient :

$$\frac{q\varphi_0}{kT} + G(\varphi_0) = \ln(10)(pH_{pzc} - pH) \qquad \textit{Eq. 15}$$

Avec :

$$pH_{pzc} = -\frac{1}{2}\log(\frac{K_a}{K_b})$$

L'étude complète permet également de montrer que[3,4] :

$$G(\varphi_0) = \mathrm{argSh}(\frac{q\varphi_0}{\beta kT}) \qquad \textit{Eq. 16}$$

Avec :

$$\beta = \frac{2q^2 N_S}{\left(\frac{K_a}{K_b}\right)^{1/2} C_D kT}$$

Ce terme β va rendre compte de la sensibilité finale. Il est fonction de l'équilibre acide base relatif aux réactions de surface, du nombre total de sites amphotères à la surface de l'isolant N_S et de la capacité de la double couche (équation 9) C_D.

Lorsque $\beta >> \frac{q\varphi_0}{kT}$, on a :

$$G(\varphi_0) \approx \frac{q\varphi_0}{\beta kT} \qquad \textit{Eq. 17}$$

L'équation 15 deviendra alors :

$$\frac{q\varphi_0}{kT} = \frac{\beta}{\beta+1}\ln 10(pH_{pzc} - pH) \qquad \textit{Eq. 18}$$

Ainsi, la sensibilité de l'ISFET sera définie par :

$$S = \left|\frac{d\varphi_0}{dpH}\right| = \ln 10\frac{kT}{q}\cdot\frac{\beta}{\beta+1} \qquad \textit{Eq. 19}$$

I.3 Présentation des ISFETs utilisés

Au cours de cette étude, les capteurs que nous avons utilisés ont été réalisés et caractérisés par Mr William Sant[5]. Ils sont issus de deux procédés technologiques différents. Les structures réalisées se différencient par la valeur de leur tension de seuil. Pour le reste, elles sont identiques :

- taille de la puce : 5mm x 5mm et 2,5 mm x 2 mm,
- longueur du canal : L = 40 µm,
- largeur du canal : W = 800 µm,
- grille ionosensible : SiO_2 (50nm)/Si_3N_4(50nm),
- tension de seuil : V_T = 1,4 V ou 0,7V.

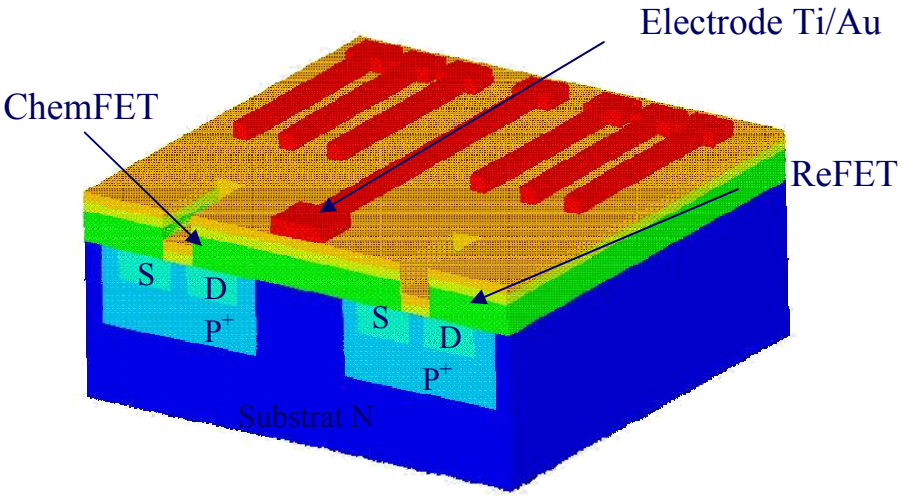


Fig. II - 6 : Schéma d'une vue en trois dimensions de la structure ISFET-REFET avec électrode intégrée et caissons d'isolation implantés

L'intérêt de telles structures est de présenter, sur la même puce, deux transistors à effet de champ ainsi qu'une électrode métallique. La membrane de l'ISFET est sensible à l'élément à détecter tandis que le REFET sera insensible à cet élément. Si U(pX) mesure le potentiel du à toutes les espèces chimiques présentes dans la solution et $U(pX_0)$ mesure le potentiel de ces mêmes espèces excepté l'espèce à détecter, alors la différence de ces deux mesures nous donne la valeur du potentiel de l'espèce à détecter :

$$U_{ISFET} = U(pX) + U_{dérive} + U_{électrode}$$
$$U_{REFET} = U(pX_0) + U_{dérive} + U_{électrode}$$
$$U_{ISFET} - U_{REFET} = U(pX) - U(pX_0)$$

Ainsi, une mesure différentielle permet de s'affranchir de toutes les influences parasites telles que :

- Problèmes d'électrode de grille non idéale
- Problèmes de dérive inhérents aux transistors
- Problèmes de sélectivité

La figure II-6 représente la structure des capteurs basés sur ce principe. De plus, il a pu être vérifié[5] que l'électrode intégrée fonctionnait convenablement mais avait une perte de rendement et que l'utilisation d'un simple fil d'or en guise d'électrode de référence diminuait de façon importante cette perte de rendement. Cette constatation a été très utile pour la suite de notre travail étant donné que pour beaucoup d'expériences nous avons uniquement utilisé la partie ISFET du composant et nous n'avions donc pas accès à l'électrode intégrée.

D'un point de vue pratique, il est nécessaire de reporter le composant sur un circuit imprimé (« Print Circuit Board » ou PCB) et de réaliser des connections électriques par micro-soudure avec du fil d'or. Cette encapsulation va également influer sur la durée de vie du capteur.

Enfin, si les domaines d'application des capteurs chimiques sont très variés, ils s'apparentent tous à un milieu aqueux. Il est donc nécessaire de protéger les micro-connections par un enrobage adéquat afin d'isoler et d'étanchéifier la partie circuit. De plus, dans le cas de l'utilisation des capteurs pour des analyses biomédicales, cet enrobage devra être réalisé avec une résine biocompatible. Cela peut nécessiter des montées en température qui ne sont pas compatibles avec la présence d'organismes vivants. Ainsi, nous avons envisagé un moyen de nous affranchir de cette étape. La solution que nous avons choisie consiste à éviter le contact entre le milieu aqueux et la connectique. Pour cela, nous avons envisagé de limiter le volume de réaction à la seule grille sensible du capteur chimique.

II Adaptation du capteur pH aux analyses biochimiques

II.1 Principe de la mesure

Le principe de la mesure que nous avons effectuée est basé sur une lecture directe de la variation du pH lors d'une réaction particulière. Dans notre cas, nous avons choisi d'observer la dégradation de glucose par une bactérie lactique : *Lactobacillus acidophilus*. Les souches que nous avons utilisées nous ont été gracieusement fournies par le Docteur Jean-Pierre Lepargneur du laboratoire d'analyses biomédicales CEDIBIO, Toulouse.

Les *Lactobacillus* (figure II-7) sont des bacilles gram positifs réguliers de culture difficile. Ils sont non sporulés. Habituellement aérobies (anaérobies facultatifs), il existe des souches ou des variantes des souches anaérobies stricts. Les lactobacilles sont immobiles. Ce sont des bactéries classiques du yaourt (en association avec *Lactococcus*) dénuées de pouvoir pathogène. Ces bactéries interviennent d'ailleurs dans d'autres produits alimentaires comme le saucisson ("sorte de yaourt de viande"), la choucroute... On rencontre des lactobacilles dans la flore intestinale et la flore vaginale (sous le fameux nom de *Lactobacillus acidophilus* ou flore de Döderlein). Ce sont des conditions écologiques qui favorisent la multiplication des lactobacilles dans le vagin (production de glycogène par la femme, imprégnation oestroprogestative).

Leur métabolisme est uniquement fermentaire : on distingue les homofermentaires fabriquant seulement de l'acide lactique (R ou S - D ou L), des hétérofermentaires (plusieurs produits de fermentation avec éventuellement du dioxyde de carbone). Les souches dont nous avons disposé suivent la voie homofermentaire (figure II-8) et il n'y a donc aucun autre produit que de l'acide lactique issu de la dégradation d'un hexose.

Fig. II-7 :*Lactobacillus Acidophilus*

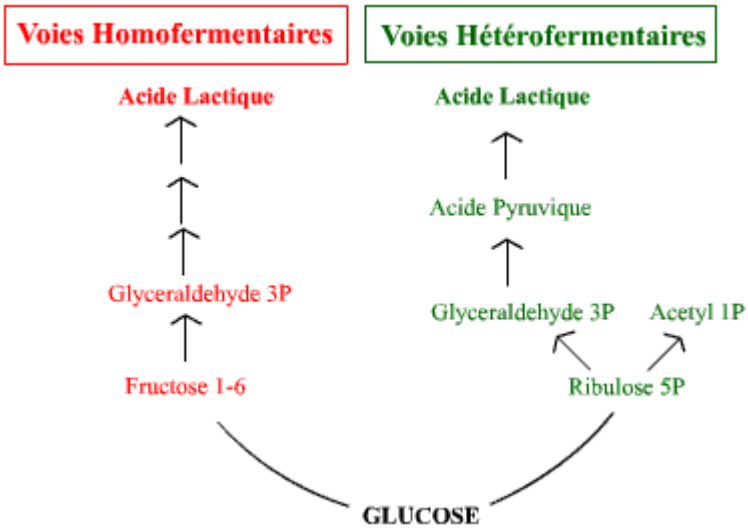


Fig. II-8 : Voies fermentaires lactiques

Le tableau II-1 exprime le degré d'affinité de *Lactobacillus acidophilus* pour différents sucres.

Amygdaline	+	Mannose	+
Arabinose	-	Mélézitose	-
Cellobiose	+	Mélibiose	**d**
Esculine	+	Raffinose	**d**
Fructose	+	Rhamnose	-
Galactose	+	Ribose	-
Glucose	+	Salicine	+
Gluconate	-	Sorbitol	-
Lactose	+	Sucrose	+
Maltose	+	Tréhalose	**d**
Mannitol	-	Xylose	-

+ : 90 % or more strains positive
- : 90 % or more strains negative
d : 11-89 % strains positive

Tab II - 1: Degré d'affinité de Lactobacillus Acidophilus pour différents sucres

Ainsi, l'idée de départ pour détecter l'activité des lactobacilles consistait à mesurer la variation de pH induite par l'apparition d'acide lactique issu de la voie homofermentaire des lactobacilles. Cette idée peut être résumée par le schéma de principe de la figure II-9.

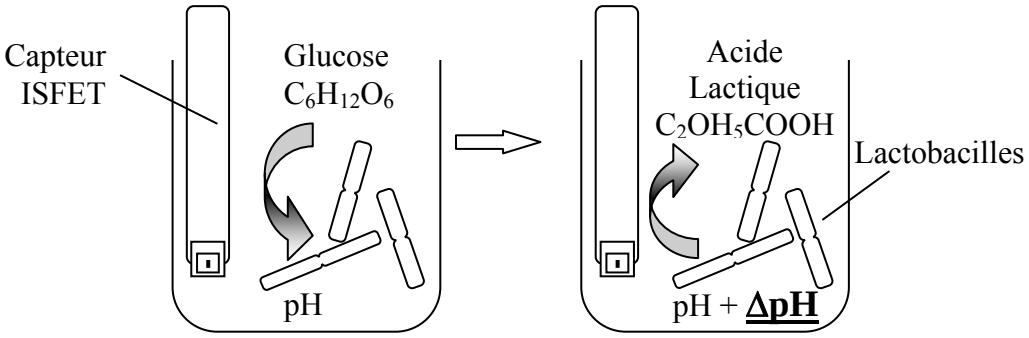


Fig. II - 9 : Schéma de principe de la détection de l'activité des lactobacilles grâce à un ISFET

Les premières mesures que nous avons effectuées correspondent exactement au montage présenté sur la figure II-9. Nous avons alors été confrontés à une absence de détection due à une trop faible concentration bactérienne au sein du milieu réactionnel. En effet, le protocole que nous avions adopté pour cultiver et prélever les bactéries (qui sera le même pour toutes les expérimentations) était le suivant :

- préparer une zone stérile avec un bec bunsen
- ensemencer 2 tubes contenant 10 mL de milieu MRS (milieu de culture sélectif utilisé pour la culture des lactobacilles à 55 $g.L^{-1}$) avec une souche de lactobacilles congelée conservée à -70°C

- incuber pendant 24 h à 37°C
- répartir dans 8 tubes de type eppendorffs
- centrifuger
- séparer le milieu des bactéries en conservant le culot dans le tube
- rincer avec de l'eau distillée
- centrifuger
- séparer le milieu des bactéries en conservant le culot dans le tube
- conserver le culot dans un bain de glace jusqu'à prélèvement

Composition (pour un litre de milieu) de milieu MRS (DeMan, Rogosa et Sharpe) :

- Glucose : 20,0 g
- Peptone : 10,0 g
- Extraits de viande de bœuf : 8,0 g
- Acétate de sodium, $3H_2O$: 5,0 g
- Extraits de levure : 4,0 g
- K_2HPO_4 : 2,0 g
- Citrate d'ammonium : 2,0 g
- $MgSO_4,7H_2O$: 0,2 g
- $MnSO_4,4H_2O$: 0,05 g
- Tween 80 : 1,0 mL

Ce protocole, très classique, permet d'obtenir des quantités variables de bactéries. Mais, dans tous les cas, cette quantité n'est pas suffisamment importante pour avoir une concentration assez élevée dans un volume de 2 ou 3 millilitres, nécessaire au bon déroulement de la mesure par le capteur chimique.

Il me semble important à ce niveau de parler de la taille de ces bactéries. En effet, nous travaillons sur des composants mêlant les échelles micronique et millimétrique. En effet, la grille sensible du capteur mesure 800 microns de long pour 40 microns de large et une bactérie a une taille de l'ordre du micron, tandis que la puce a une dimension de 5 millimètres de large et au moins autant de long. Cela pose des problèmes en ce qui concerne le volume minimum de solution nécessaire à la mesure. Ces volumes, de l'ordre de plusieurs millilitres impliquent l'utilisation d'une quantité de bactérie beaucoup trop importante pour espérer obtenir un résultat significatif.

A partir de cette constatation, nous avons imaginé la possibilité de réduire de façon conséquente le volume de solution bactérienne à mettre en contact avec la grille, de façon à augmenter fortement la concentration en bactérie dans le milieu ainsi que le rapport de

recouvrement de la grille par les lactobacilles. Nous pensions de cette façon améliorer la sensibilité du capteur.

La solution que nous avons envisagée consiste à limiter l'espace de dépôt de la solution à un volume de l'ordre du microlitre qui serait confiné sur la grille du capteur. Pour cela nous avons développé plusieurs méthodes.

II.2 Micro-cuves en plexiglas®

II.2.1 Réalisation

Les premières micro-cuves ont donc été réalisées en plexiglas®. Il s'agissait de cubes de 2 millimètres d'arête percés d'un trou de 0,8 millimètres de diamètre. La cavité ainsi formée avait donc approximativement un volume d'un microlitre. Nous avons utilisé une colle à base de silicone pour fixer la cuve sur le composant. Le positionnement de la cuve en plexiglas® a été fait sous loupe binoculaire de façon à voir apparaître, dans la cavité, la grille de l'ISFET comme le montre la figure II-10.

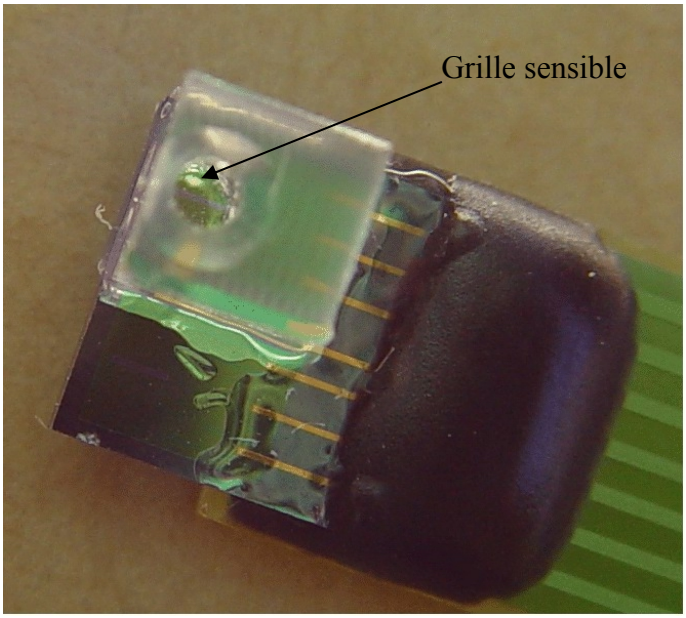


Fig. II - 10 : Positionnement de la micro-cuve de manière à faire apparaître la grille sensible dans la cavité

Une fois montée (figure II-11), la microcavité est remplie à l'aide d'une seringue et d'une aiguille de 300 microns de diamètre. Une fois remplie, la polarisation du milieu est assurée par l'intermédiaire d'un fil d'or d'un diamètre de 800 microns maintenu dans la cavité.

II.2.2 Résultats

Les premières mesures que nous avons effectuées concernaient l'étalonnage au pH du capteur. Pour cela, nous avons réalisé plusieurs mesures à pH 4, 7 et 10 dans des solutions tampons standard. La figure II-12 rend compte de cet étalonnage. Il apparaît que la variation de la tension de grille est linéaire en fonction de celle du pH. La sensibilité du capteur au pH peut être évaluée à 45 mV/pH. Cette valeur, bien qu'éloignée de la valeur théorique de 59 mV/pH donnée par la loi de Nernst, est assez élevée et donc exploitable étant données les conditions dans lesquelles nous travaillons.

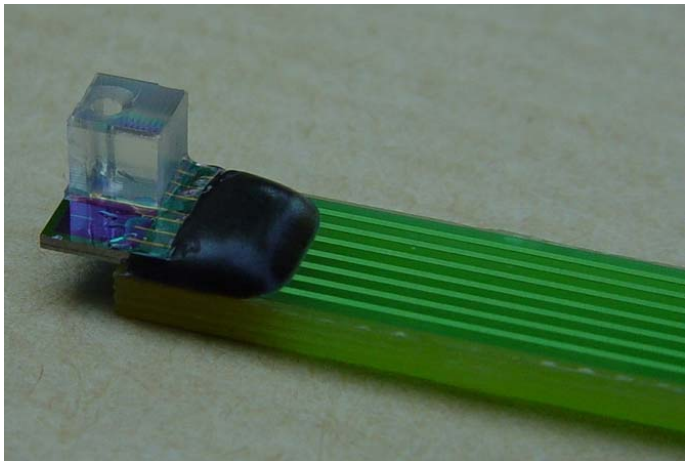


Fig. II - 11 : Vue d'ensemble de la cuve et du capteur

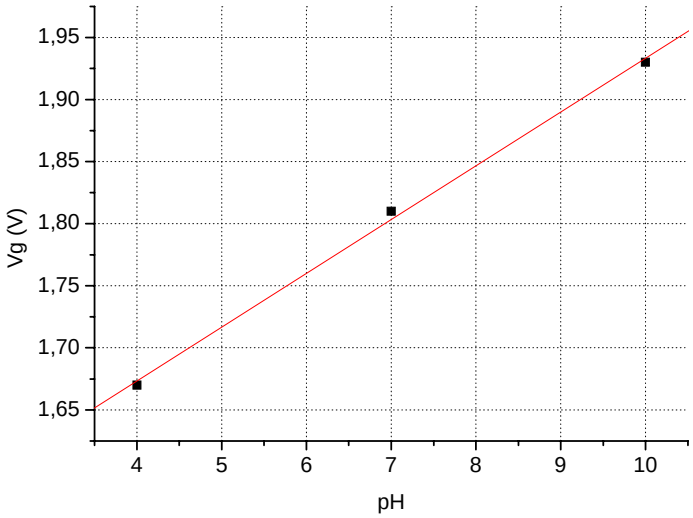


Fig. II - 12 : Variation linéaire de la tension de grille V_g du capteur en fonction du pH

Dans un second temps, nous avons remplacé la solution tamponnée par du milieu MRS, milieu de croissance des bactéries. Après une phase de latence d'une vingtaine de minutes pendant laquelle nous laissons le capteur se stabiliser, nous intégrons les bactéries dans la micro-cuve. Très rapidement, nous pouvons observer une chute importante du pH, qui

se poursuit, de façon moins intensive dans le temps. Après une heure de mesure, le pH semble relativement stabilisé comme l'indique les figure II-13 et II-14[6].

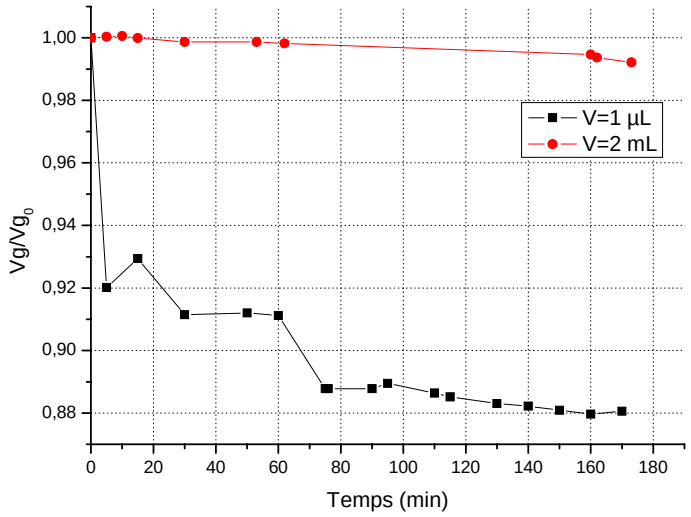


Fig. II - 13 : Comparaison de la sensibilité de l'ISFET à l'activité des lactobacilles en fonction du volume opératoire

Ainsi, cette première méthode a permis de montrer la faisabilité de ce type de mesure. L'intérêt d'un tel dispositif apparaît immédiatement sur la figure II-13. En effet, ce graphe permet de comparer la sensibilité du capteur équipé d'une micro-cuve à celle d'un capteur mesurant le pH dans une solution de 2 millilitres. La tension de grille apparaît en valeur relative car nous n'avons pas utilisé le même capteur pour ces deux mesures. De plus, il faut préciser que le capteur utilisé pour la mesure dans le volume de 2 millilitres avait une sensibilité assez proche de la sensibilité théorique donc la chute est vraiment très minime.

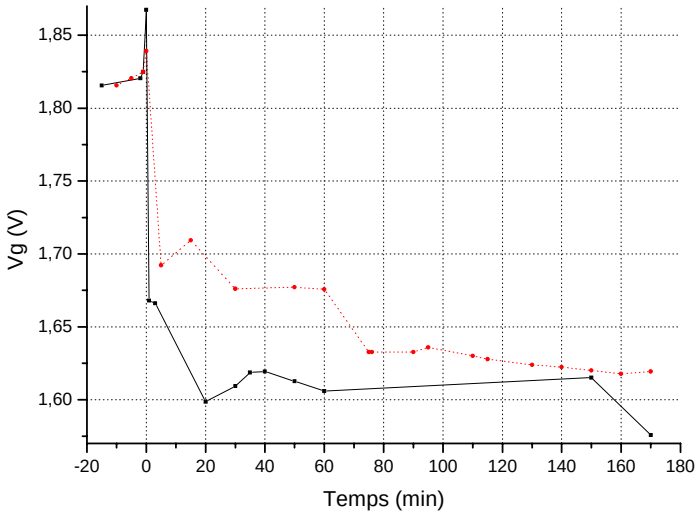


Fig. II - 14 : Diminution du potentiel de grille au cours du temps due à la présence des lactobacilles

Après avoir soigneusement rincé la cuve à l'eau puis avec du milieu MRS, nous avons recommencé la même manipulation. La figure II-13 montre que le résultat est identique à la première série de mesures.

La première chute de pH, quasi-immédiate, ne peut être attribuée à la production d'acide lactique. Il s'agit plutôt d'un effet de dilution des bactéries dans le milieu. En effet, même après rinçage et centrifugation, il reste toujours de l'acide présent dans le milieu de culture initial. Par contre, la diminution du pH qui a lieu après dix minutes de mesure peut être attribuée à la production d'acide lactique par les bactéries. En effet, d'une part cette souche est issue d'un milieu naturel au pH acide (souche vaginale) et donc, par une production d'acide, la bactérie tend à reproduire les conditions qui lui sont le plus favorables en utilisant le glucose à sa disposition. D'autre part, des mesures réalisées en plongeant les bactéries dans un milieu légèrement tamponné comme le MRS, mais sans glucose ne montrent pas cette diminution du potentiel hydrogène.

Néanmoins, nous avons été rapidement confrontés à un problème de reproductibilité dans l'étape de report de la micro-cuve sur le capteur. En effet, la colle utilisée se répandait la plupart du temps dans la microcavité rendant ainsi l'accès à la grille impossible. De plus, lorsque nous arrivions à fixer correctement la cuve, il était assez fréquent de la décoller au cours de la manipulation en introduisant notamment l'électrode en or.

Pour pallier tous ces problèmes, nous avons envisagé de créer un support dans lequel la cuve serait intégrée (figure II-15).

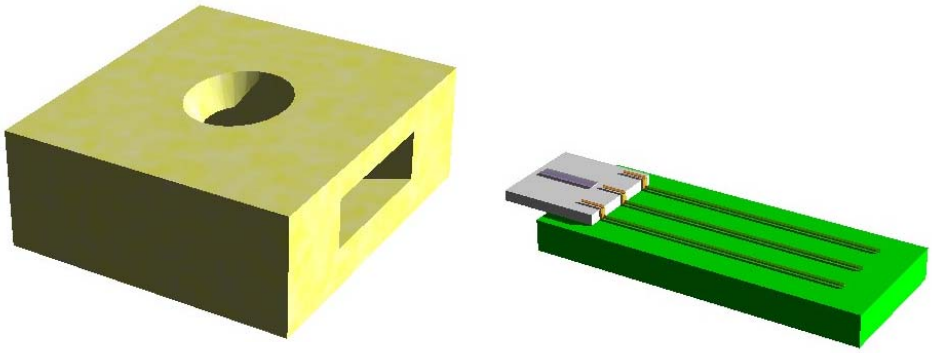


Fig. II - 15 : Support avec micro-cuve intégrée

La difficulté que nous avons rencontrée tient au report des puces sur le PCB et surtout à la dimension des puces qui n'est pas rigoureusement la même. Donc, le support et la micro-cuve étant fixes, il est apparu également un problème de reproductibilité. De plus, il était

assez fréquent de décoller le composant et de casser les connections en or en insérant le capteur dans ce support rigide. En effet, l'interstice permettant au capteur de rentrer dans le bloc solide a dû être très ajusté pour éviter tout mouvement du composant et du fait des variations d'épaisseurs dues à la présence du PCB, le passage était parfois trop étroit.

Cette solution aurait mérité d'être développée un peu plus en avant en envisageant d'adapter ce support pour le composant uniquement et en intégrant un système de connectique propre. Mais nous avons voulu privilégier l'application de ce type de microsystème aux analyses biomédicales.

Pour ce faire, il a fallu impérativement s'orienter vers un système à usage unique et donc nous nous sommes à nouveau tournés vers le concept de la micro-cuve à reporter sur le composant. Nous avons décidé d'opter pour un autre matériau que le plexiglas®, qui ne nécessiterait pas l'utilisation d'une colle. Pour cela, nous avons choisi un polymère particulier, de plus en plus répandu dans le domaine de la microélectronique et surtout dans celui de la micro fluidique : le polydiméthylsiloxane (PDMS).

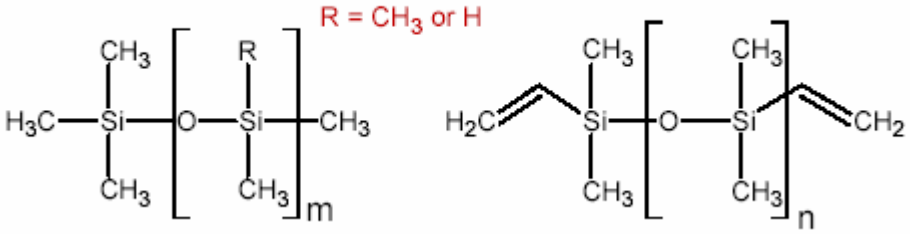
II.3 Micro-cuves en PDMS

II.3.1 Présentation du Polydiméthylsiloxane

Le PDMS est un élastomère largement répandu dans le domaine des micro et nano-technologies notamment par le biais de techniques émergente telles la micro-impression ou « micro contact printing »[7] ou encore, la micro-fluidique[8]. Hormis ses propriétés électriques, ses caractéristiques chimiques confèrent à ce polymère un grand intérêt en terme d'adhésion, de greffage, de moulage, de stabilité et de transparence. De plus, la simplicité et la reproductibilité de la réaction qui transforme les précurseurs du PDMS en polymère en font un matériau plus qu'attractif dans les procédés technologiques actuels qui requièrent des qualités d'adaptation à la fabrication collective à un coût le plus bas possible.

II.3.1.1 Caractéristiques chimiques

En général, le PDMS utilisé en laboratoire est délivré sous la forme d'un kit en deux parties. La première contient des chaînes polydiméthylsiloxane d'une soixantaine de monomères terminées par un groupement vinyle. La seconde partie est composée d'une solution de copolymères méthylhydrosiloxane / diméthylsiloxane d'une dizaine de monomères chacun et d'un catalyseur à base de platine. Une représentation semi développée de ces composés est donnée sur la figure II-16.



Chaîne de copolymères méthylhydrosiloxane diméthylsiloxane

Chaîne polydiméthylsiloxane terminée par un groupement vinyle

Fig. II - 16 : Formules semi développées des composés nécessaires à la préparation du polymère PDMS

La réaction qui permet la création de liaisons Si-CH_2-CH_2-Si provient d'une hydrosilylation, résultant d'une réaction de polyaddition des liaisons Si - H sur les terminaisons vinyles. Cette réaction, qui permet d'obtenir finalement le polymère est présentée sur la figure II-17

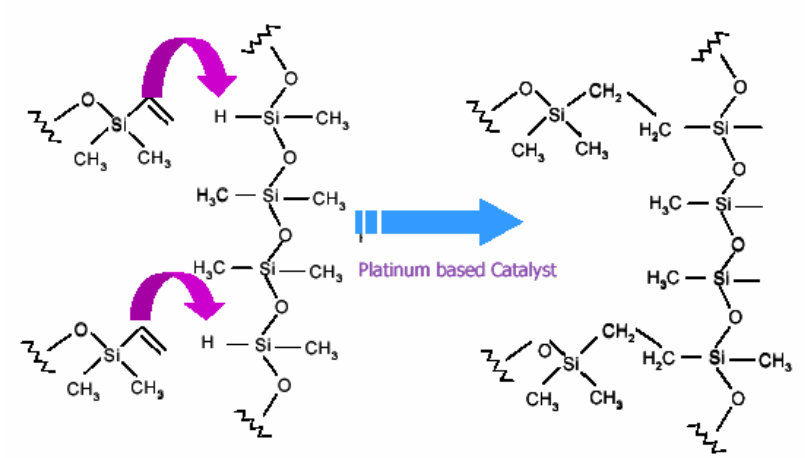


Fig. II - 17 : Réaction de réticulation des précurseurs du PDMS

II.3.1.2 Domaines d'applications du PDMS

Le PDMS ne trouve pas encore beaucoup d'applications directes dans l'industrie. Il est utilisé dans le domaine de l'impression à grande échelle pour le transfert d'images (Presstek, Inc). Il peut être également utilisé, dans l'industrie chimique comme base de préparation d'émulsions de silicone, antimousse ou encore comme lubrifiant. Par contre, dans un avenir proche, il est très grandement pressenti dans la création de membranes sélectives dans les industries chimiques pour séparer notamment les composés organiques volatils des effluents rejetés[9,10]. Il pourra également être utilisé comme moule.

Pour le moment, l'utilisation du PDMS est plutôt réservée au domaine de la recherche. Il est notamment utilisé dans les procédés de nanolithographie. Il a été montré que la reproduction de micro et nanostructures était possible, en utilisant des paramètres de pression et de température très accessible par rapport aux procédés habituels pour les matériaux thermoplastiques[6]. Les mêmes auteurs ont également démontré que le PDMS, une fois à l'état réticulé, était compatible avec les techniques classiquement utilisées dans les procédés technologiques comme le lift-off, la gravure RIE ou l'électrodéposition. De plus, les dimensions dont il est question avec le PDMS sont comprises dans une large gamme. Des microstructures peuvent être imprimées dans des films d'épaisseur inférieure à 1 micron tandis que des microstructures peuvent être reportées dans des couches de 100 microns.

Le PDMS trouve également beaucoup d'applications dans le domaine de la micro-fluidique et celui des lab-on-chip[11]. En effet, ses caractéristiques permettent des interactions très faibles avec de nombreuses biomolécules ce qui assure une non-dénaturation des solutions biologiques. De plus, les structures obtenus par micro et nano impression peuvent directement être utilisées en tant que micro-canaux et micro-chambres dans lesquels sont mélangés et analysés les réactifs et les échantillons. La surface très lisse et très régulière du PDMS est également très avantageuse dans le cadre de la micro-fluidique de même que sa transparence qui permet de coupler de tels dispositifs avec de la détection basée sur la fluorescence.

Un autre grand avantage du PDMS est de pouvoir être scellé très facilement sur des surfaces planes sans nécessiter des techniques d'ancrages élaborées. En effet, il est possible pour les groupements siloxanes de former des liaisons hydrogènes avec, par exemple, la surface oxydée de silicium par l'intermédiaire de groupements hydroxyls terminaux comme présenté sur la figure II-18.

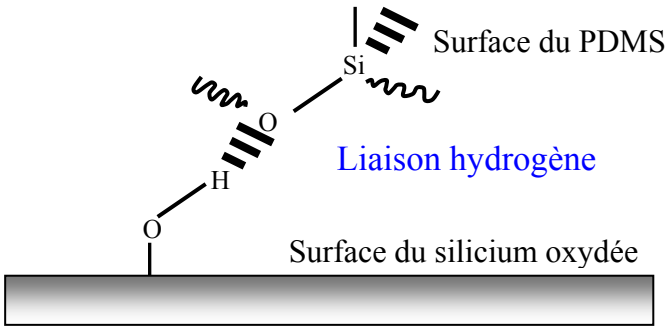


Fig. II-18 : Description schématique de la liaison hydrogène entre les chaînes de PDMS et la surface oxydée du Silicium

La surface oxydée peut être obtenue avec l'oxyde natif du silicium ayant subi un traitement UVOCS (ultraviolet ozone cleaning system) ou en utilisant un procédé conventionnel à base d'acide fluorhydrique suivi d'une oxydation par traitement à l'acide sulfurique et peroxyde d'hydrogène (H_2SO_4 – H_2O_2)[12]. De même, il existe également des traitements anti-adhésifs bien établis qui permettent le démoulage du PDMS sans problème.

II.3.2 Conception de cuves en PDMS ouvertes

II.3.2.1 Réalisation des cuves

Dans l'optique d'un procédé de fabrication collective, nous avons donc choisi de travailler avec le PDMS pour réaliser ces nouveaux systèmes. Pour ce faire, nous avons réalisé un moule en téflon® présenté sur la figure II-19. Celui-ci nous a permis d'obtenir, après une thermo-réticulation du polymère[13], une micro-cuve circulaire. La cuve a été reportée directement sur le silicium après avoir subi un traitement plasma O_2 afin de rendre l'adhésion du PDMS sur le substrat plus efficace[7] en modifiant ses caractéristiques de surface. Une fois alignée sur la grille à l'aide d'un microscope, la cuve est scellée sur le capteur à l'aide de PDMS non réticulé. L'ensemble sèche à l'air libre pendant 24 heures puisque il est impossible de mettre le capteur à l'étuve. En réalité, le passage à température relativement élevée du PDMS permet simplement l'accélération de la réaction de réticulation. Celle-ci se fait également à température ambiante mais beaucoup plus lentement. Le système prêt à être utilisé est présenté sur la figure II-20.

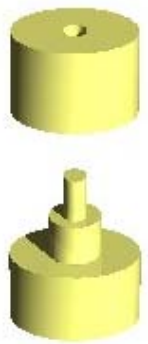


Fig. II - 19 : Détail du moule en téflon®

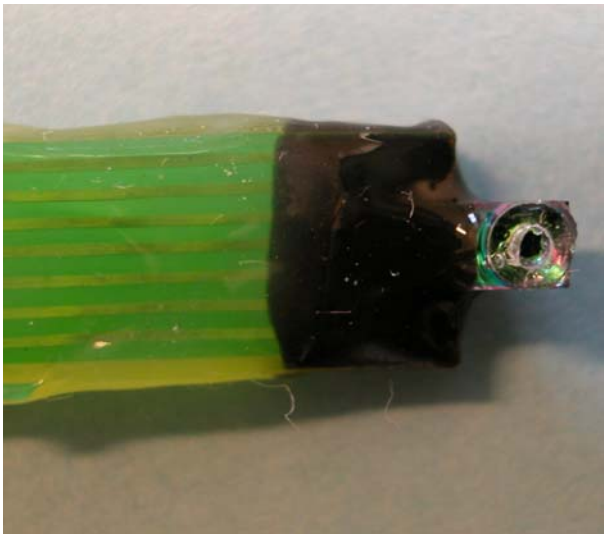


Fig. II - 20 : Micro cuve en PDMS reportée sur un ISFET

Une fois montées, les cuves sont remplies de la même manière que les cuves en plexiglas®. Nous avons utilisé le même type d'aiguille très fine et, l'ouverture supérieure, créée après démoulage, était suffisamment large pour permettre le passage du fil d'or qui nous a servi d'électrode de référence.

II.3.2.2 Résultats

De la même façon que pour la première génération de cuves en plexiglas, nous avons au préalable effectué des étalonnages des systèmes au pH. La réponse type que nous avons obtenue est présentée sur la figure II-21. Bien que la tension de grille puisse être légèrement différente en fonction des capteurs, la variation en fonction du pH est toujours la même. La sensibilité de ce montage au pH peut être évaluée à 35 mV/pH. Le fait que cette valeur soit assez éloignée de la sensibilité théorique de Nernst de 59 mV/pH peut être imputé d'une part à l'utilisation d'un fil d'or en tant qu'électrode de référence et d'autre part, éventuellement, à un volume qui a été divisé par deux par rapport aux cuves précédentes.

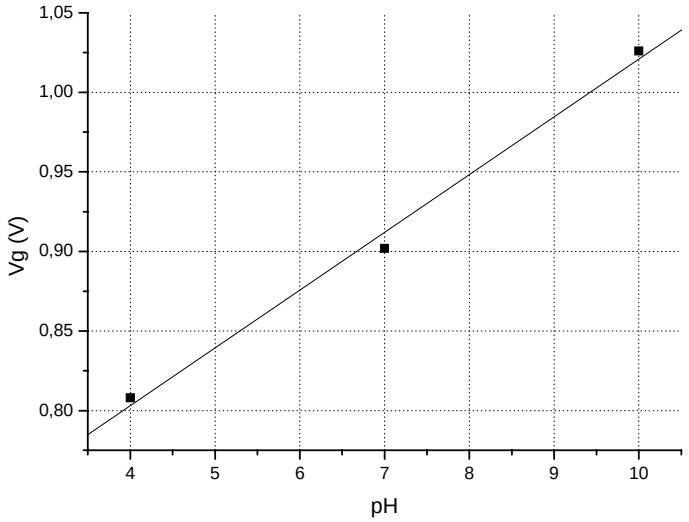


Fig. II - 21 : Variation linéaire de la tension de grille V_g du capteur en fonction du pH

Dans un seconde temps, nous avons réitéré nos tests concernant la consommation de glucose par les lactobacilles. Dans les mêmes conditions que précédemment, nous avons mesuré la variation de la tension de grille au cours du temps. Nous obtenons à nouveau une chute de tension traduisant une baisse du pH très rapide qui se poursuit pendant plus de 8 heures. En considérant la sensibilité de 35 mV/pH évoquée un peu plus haut, nous pouvons estimer la chute de pH sur la première heure à un peu plus d'une unité. Nous retrouvons donc le même comportement que dans le cas des cuves en plexiglas®.

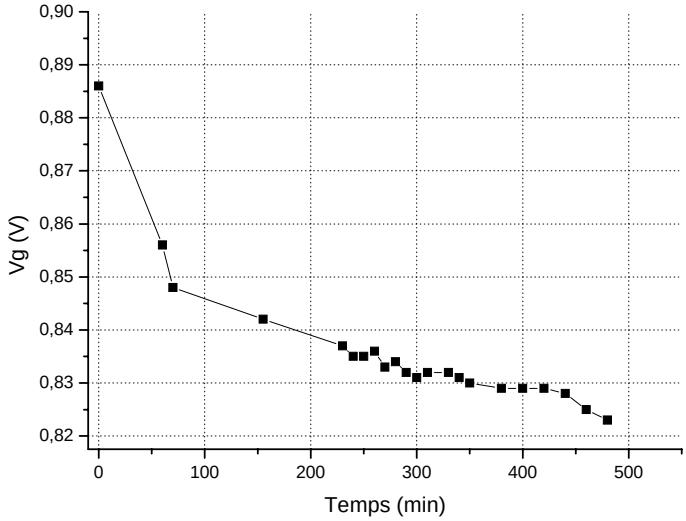


Fig. II - 22: Diminution du potentiel de grille au cours du temps due à la présence des lactobacilles

Dans l'ensemble, nous nous sommes retrouvés confrontés à deux types de problèmes. Le premier s'est inscrit en amont des mesures proprement dites. En effet, la géométrie sphérique de la micro-cuve rendait l'alignement avec la grille très difficile ainsi que le scellage sur le substrat, même sous microscope. De plus, la cavité étant ouverte manuellement après le démoulage, il restait toujours des dépôts de « poussière » de PDMS qui empêchait l'alignement avec la grille de façon précise. Ainsi, le report, très long et très fastidieux, de ces cuves ne s'est fait qu'avec un rendement très faible (de l'ordre de un capteur utilisable pour dix montés soit 10 %).

Le second problème que nous avons rencontré concernait l'ouverture de la cuve et l'insertion de l'électrode. En effet, le PDMS est un matériau très malléable contrairement au plexiglas et lorsque on insère le fil d'or, qui est d'un diamètre très proche de celui de l'ouverture de la cuve, cela engendre des déformations. Si ces déformations n'entraînent pas de rupture de la cuve, elles permettent au liquide d'être en contact avec l'air en agrandissant la cavité et favorisent ainsi une évaporation prématurée du milieu réactionnel. Cette évaporation engendre bien évidement des problèmes de stabilisation quant à la mesure effectuée par le capteur. En effet, le volume diminuant, la concentration augmente de façon incontrôlée, et très rapidement, la totalité du liquide a disparu. Ainsi, nous avons fréquemment vu apparaître le genre de résultats présentés sur la figure II-23 qui ne peuvent donner lieu à aucune exploitation.

Pour palier les différents problèmes rencontrés, nous avons opté pour une modification de la géométrie générale de la micro-cuve. Nous avons cependant souhaité conserver le matériau PDMS pour ses propriétés de thermoformage et son inertie vis-à-vis des éléments biologiques que nous utilisons.

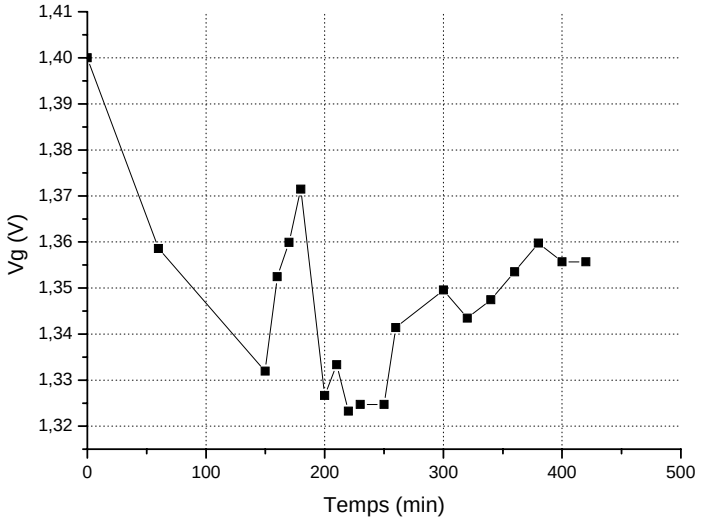


Fig. II - 23 : Variations « aléatoires » de la tension de grille dues à l'évaporation du liquide

II.3.3 Conception de cuves en PDMS fermées

II.3.3.1 Réalisation des cuves

Nous avons donc décidé de modifier totalement la géométrie des cuves. Non seulement, nous avons opté pour une géométrie parallélépipédique, mais de plus, nous avons cherché un moyen de nous affranchir du problème d'évaporation que nous avons rencontré précédemment. La solution que nous avons choisie est présentée sur la figure II-24. Si la cavité est toujours cylindrique, les parois extérieures, planes, sont ajustées aux dimensions de la puce afin de faciliter le report. Enfin, l'innovation vient de la partie supérieure de la cuve qui est fermée. La présence de cet opercule permet non seulement d'éviter tout problème d'évaporation mais également de conserver le milieu réactionnel relativement stérile. En effet, après le report de la cuve sur le capteur, il n'y a plus de contact entre l'air ambiant et le milieu de mesure sachant que le traitement de surface UVOCS des cuves avant report permet d'obtenir une surface libre de tout contaminant organique.

En ce qui concerne la réalisation de ces cuves, nous nous sommes servi du moule présenté sur la figure II-24 b. Ce moule a été réalisé au Masuzawa Lab., CIRMM/LIMMS, de l'université de Tokyo.

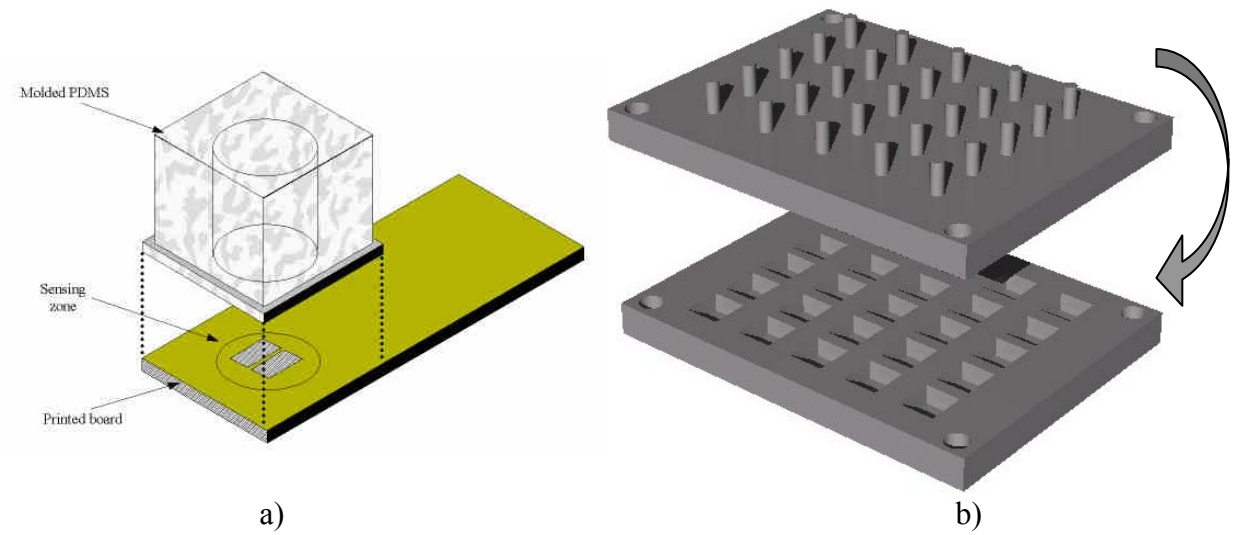


Fig. II - 24 : *a) Schéma de principe de la micro-cuve reportée sur le composant b) Schéma du moule matriciel en acier*

Un moule positif des cuves a tout d'abord été usiné par fraisage puis utilisé par EDM (Electro Discharge Machining) afin d'obtenir la partie concave inférieure. Le même processus a été utilisé pour obtenir la partie supérieure en perçant des trous puis en utilisant cette partie percée pour obtenir les cylindres qui formeront la cavité. De plus, le moule était équipé d'entretoises qui permettaient de fixer l'épaisseur de l'opercule supérieure à 300, 500 ou 1000 microns. Pour toutes nos expériences, nous avons préférentiellement utilisé l'entretoise de 300 microns. Enfin, l'état de surface du moule fabriqué par EDM a permis d'obtenir une micro-cuve transparente ce qui a rendu possible un alignement relativement facile du dispositif sur la zone sensible du capteur.

Une fois la cuve positionnée, pour plus de sécurité, nous avons entouré le composant et la cuve de PDMS non réticulé afin de réaliser un scellage définitif. Ce scellage s'avère nécessaire pour la suite du montage. En effet, pour introduire le liquide réactionnel au sein de la cuve, nous avons dû percer la paroi avec une aiguille fine de 300 microns de diamètre que nous avons laissée à demeure en tant que micro canal de remplissage. Nous avons également percé la paroi opposée de manière à laisser sortir l'air emprisonné dans la cuve lors du remplissage et également pour pouvoir vidanger la cuve lors des étalonnages pH que nous avons réalisés. En effet, dans ce cas là, il était nécessaire de pouvoir faire toutes les mesures avec le même micro-système.

La figure II-25 présente le montage sous différents angles de vues. En ce qui concerne la polarisation du milieu réactionnel, nous avons exploité deux procédés. Le premier, présenté également sur la figure II-25, consistait à insérer un fil d'or, très fin (de l'ordre de 50 microns) dans l'aiguille de sortie. Ce fil a été soudé sur le fil d'or qui nous a servi jusqu'à présent

d'électrode. L'autre méthode que nous avons employée a consisté à métalliser à l'or fin l'aiguille de sortie et à prendre le contact directement dessus.

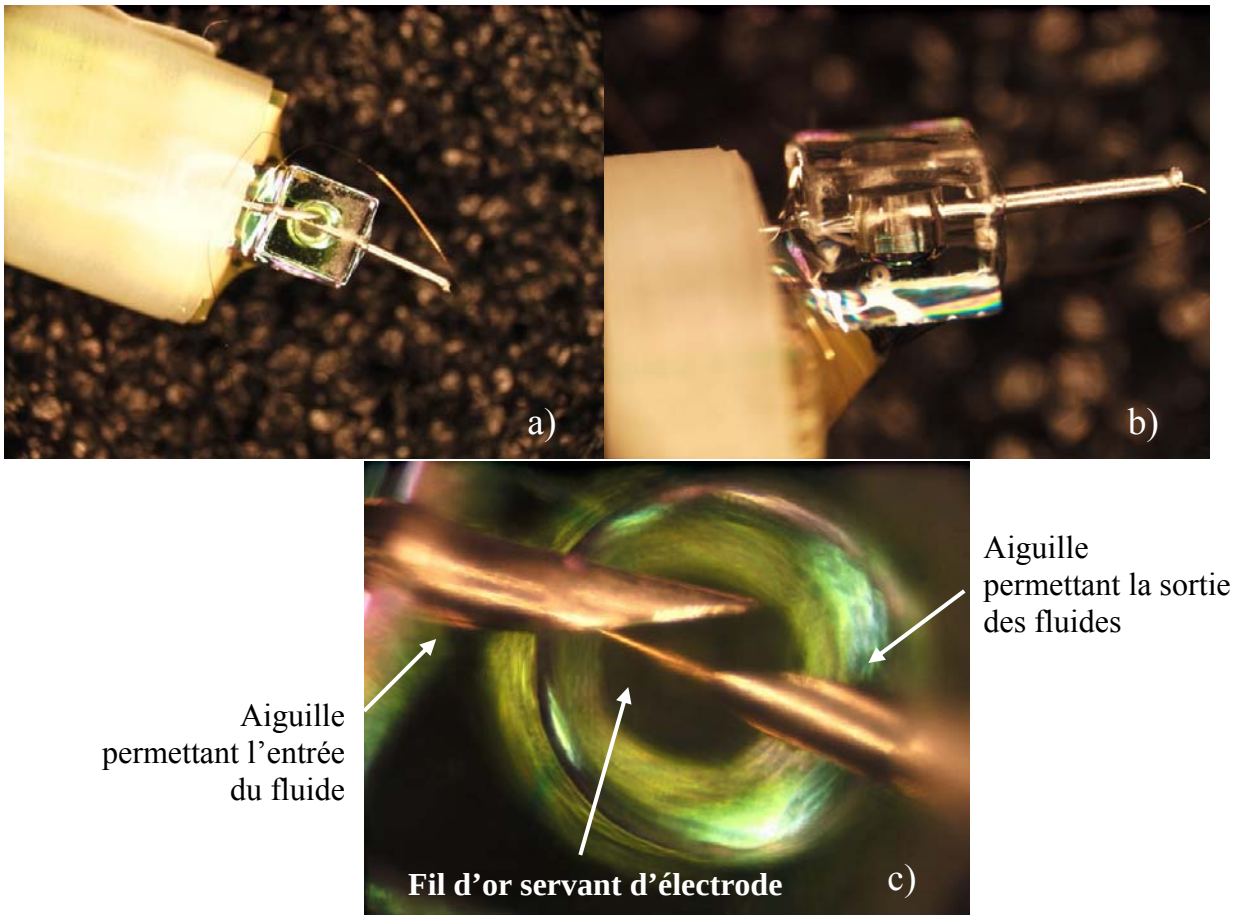


Fig. II - 25 : a) Vue de dessus de la cuve reportée sur le capteur b) Vue de coté de cette même cuve avec les aiguilles permettant l'entrée et la sortie des fluides c) Détail de l'intérieur de la cavité avec les aiguilles d'entrée et de sortie

Les premières expérimentations, tout comme pour les cuves précédentes, ont consisté en un étalonnage au pH des capteurs équipés du microsystème.

II.3.3.2 Résultats

II.3.3.2.1 Etalonnage pH

De la même façon que précédemment, le pH a été mesuré par le même capteur dans des solutions tampons commerciales pour trois valeurs de pH différentes : 4,01 ; 7 ; 10,01. Pour des raisons de facilité de mise en œuvre, nous avons réalisé toutes les mesures en utilisant l'aiguille métallisée en guise de pseudo-électrode de référence.

La réponse obtenue est linéaire[6] comme le montre la figure II-26 et la sensibilité du capteur au pH peut être évaluée à 30 mV/pH. Tout comme pour les micro-cuves précédentes, cette faible sensibilité s'explique par le volume utilisé qui est vraiment minimal (1 microlitre) et par l'utilisation d'une aiguille métallisée comme électrode de référence.

Mais la reproductibilité des résultats en ce qui concernait la mesure du pH nous a incité à reproduire les manipulations que nous avions faites au préalable afin d'évaluer l'existence d'activité des bactéries en présence de glucose.

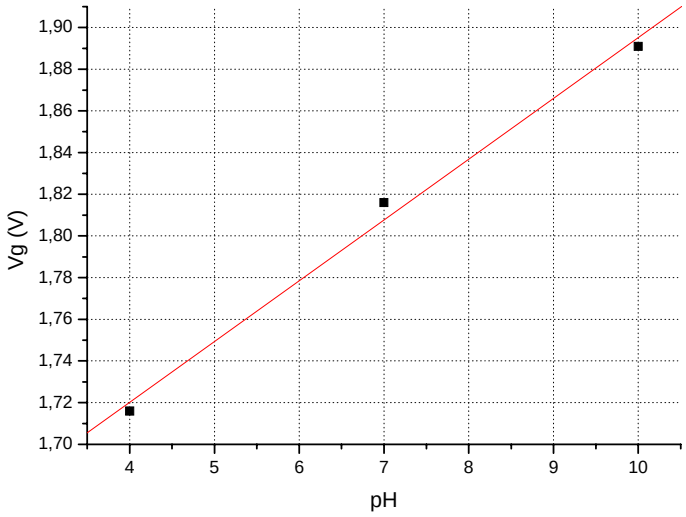


Fig. II - 26 Variation linéaire de la tension de grille V_g du capteur en fonction du pH

II.3.3.2.2 Détection de l'activité en présence de glucose

Afin d'éviter d'avoir une valeur de pH finale trop faible, car une acidité trop élevée aurait pu nuire à terme au PDMS, nous avons décidé de travailler dans un milieu tamponné. Pour cela, nous avons choisi une solution d'EDTA (ethylene-diamine-tetra-acetic acid) tamponnée à pH 7,4. Deux séries de mesures ont été effectuées. La première a consisté à vérifier la stabilité du pH d'une solution de lactobacilles dans un tampon EDTA. Pour ce faire, nous avons mesuré la tension de grille avant l'ajout des bactéries, et juste après. Nous pouvons constater qu'après un laps de temps d'une demi heure, la mesure est identique à celle effectuée dans un tampon EDTA seul.

Il faut noter qu'une différence apparaît entre l'étalonnage effectué sur la figure II-26, pour lequel un pH de 7 correspond à une tension de grille de 1,82 V et la valeur mesurée pour le tampon EDTA qui est de 1,72 V. Cet écart de mesure (pour un même pH) est dû aux variations (d'ordre technologique) de la tension de seuil d'un capteur à l'autre. En effet, il est possible de voir apparaître une variation de l'ordre de 10 % de cette tension de seuil[5].

Après avoir vérifié la stabilité de la mesure de la tension de grille du capteur plongé dans la solution bactérienne tamponnée, nous avons réitéré la manipulation en ajoutant cette fois-ci du glucose (20 $g.L^{-1}$) dans la solution initiale. Ainsi, après stabilisation de la mesure (environ 10 minutes), nous avons injecté les bactéries dans la micro-cuve. Très rapidement, nous avons pu observer la chute de pH attendue correspondant à la consommation du glucose par les bactéries et ainsi à l'apparition d'acide lactique. La variation de pH étant très importante, elle ne peut totalement être absorbée dans l'effet tampon de l'EDTA et apparaît tout de même lors de la mesure comme le montre la figure II-27.

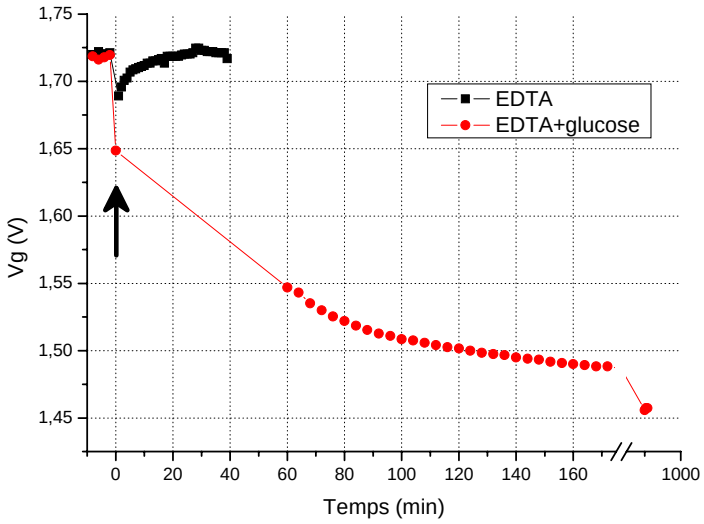


Fig. II - 27 : Variations du potentiel de grille au cours du temps pour une solution de lactobacilles en présence ou non de glucose[6]

On peut constater qu'il existe également une chute de pH dans le cas d'une solution d'EDTA sans glucose même si elle est rapidement « absorbée » par l'effet tampon de la solution. Cela est dû au fait que la solution de bactérie que l'on ajoute est initialement très acide. En effet, les bactéries relarguent pendant quelques temps de l'acide lactique résultant de la métabolisation du glucose présent dans le milieu de culture où elles se trouvaient précédemment. Une fois tout l'acide lactique rejeté, le pH se stabilise.

Ce résultat ne permet pas, bien sûr, de quantifier l'activité bactérienne. D'une part nous ne connaissons pas exactement la sensibilité du capteur (puisqu'il ne s'agit pas de celui utilisé pour l'étalonnage pH) et d'autre part, l'effet tampon de l'EDTA amoindrit fortement la variation du pH qui pourrait éventuellement nous permettre de calculer la quantité d'acide produite. Mais l'objectif que nous nous étions fixé dans un premier temps, et que nous avons atteint était simplement de détecter l'activité de *lactobacillus* en présence d'un sucre qu'il est capable de métaboliser.

Pour compléter ces mesures et commencer à établir une comparaison avec les kits API trouvés dans le commerce, nous avons testé la réaction des lactobacilles vis-à-vis d'un autre sucre. Nous avons choisi le sorbitol. En effet, en se reportant au tableau II-1, on constate que les lactobacilles n'ont aucune affinité pour le sorbitol et donc, en théorie, ne devraient pas produire d'acide lactique en sa présence. Comme pour la série de mesures précédente, nous avons travaillé dans un milieu tamponné pour nous affranchir des phénomènes de relargage d'acide par les bactéries lors des mises en solution. Nous avons repris le même plan de manipulation en mesurant tout d'abord les variations de la tension de grille du capteur en contact avec une solution contenant uniquement de l'EDTA et du sorbitol (20 $g.L^{-1}$). Après avoir constaté que la mesure était stable, nous avons injecté les bactéries dans la micro-cuve à l'aide de l'aiguille prévue à cet effet. Après une heure, aucune chute de pH n'a été enregistrée (figure II-28).

Afin de vérifier le bon fonctionnement du capteur (un disfonctionnement intempestif n'est jamais à exclure), nous avons injecté dans la cuve une solution d'EDTA et de glucose (20 $g.L^{-1}$) puis les lactobacilles. La chute de la tension de grille, et donc du pH, est immédiate comme le montre la figure II-28. Cela confirme d'une part le bon fonctionnement des capteurs, mais cela valide également le principe de détection de l'activité des lactobacilles à l'aide de micro-volumes.

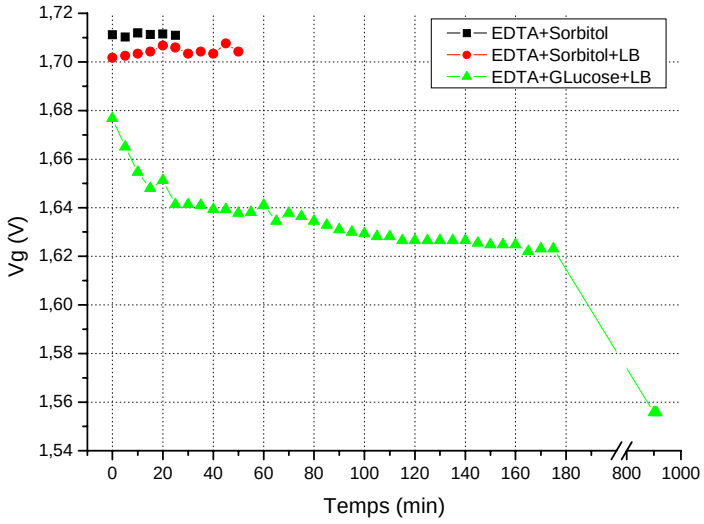


Fig. II - 28 : Variations du potentiel de grille au cours du temps pour une solution de lactobacilles en présence de glucose et de sorbitol

II.4 Conclusions et perspectives

Nous avons démontré dans ce chapitre l'intérêt à travailler avec les volumes les plus réduits possibles afin d'augmenter de manière significative la sensibilité du capteur. La démarche que nous avons adoptée pour cela nous a conduits à développer plusieurs types de procédés qui ont évolué pour aboutir à un système fabriqué en PDMS. Le procédé final utilisant ce matériau que nous avons présenté permet déjà d'envisager une fabrication collective.

Une fois le système mis en place, nous avons démontré que les réponses des capteurs étaient très cohérentes par le biais de mesures dans des solutions tampons à pH bien définis et constants. Le même montage nous a permis de mettre en évidence l'activité bactérienne liée à la présence de glucose dans une solution tamponnée. A partir de là, nous avons souhaité comparer notre dispositif expérimental aux tests habituellement utilisés pour l'identification de souches bactériennes : les galeries API fabriquées par Biomérieux (figure II-1). Un exemple d'utilisation d'un de ces tests, basés sur des réactions colorimétriques est donné en annexe. Pour pouvoir établir des bases de comparaison, nous avons étudié et démontré la différence de comportement des capteurs en fonction des hydrates de carbone (glucose et sorbitol) associés aux bactéries.

Le tableau II-2 synthétise quelques uns des points de comparaison que nous avons pu établir. L'avantage primordial des micro-cuves par rapport aux techniques classiques réside dans le gain de temps. Ce gain apparaît à deux niveaux :

- Pendant la phase de culture ; le volume étant très diminué, la quantité de bactéries nécessaire aussi et donc le temps de culture s'en trouve raccourci également.
- Pendant la phase de mesure ; cela apparaît clairement sur les courbes présentées. Le temps requis pour avoir une réponse stabilisée et assurée (baisse du pH ou pas) oscille entre 30 et 60 min au lieu de 18 heures pour une technique de caractérisation classique.

	Cuve (Galerie API)	Micro-cuves
Volume nécessaire par test	150 µL	1 µL
Temps de culture nécessaire	18 à 24 heures	< 18 heures
Temps d'incubation du test	18 à 24 heures	< 1 heure

Tab II - 2 : Comparaison des critères de détection de la réactivité des lactobacilles à différents hydrates de carbone en fonction du procédé utilisé

Ainsi, la mise en place de ce système apparaît comme très prometteuse. D'autres séries de tests ont été réalisées avec d'autres sucres notamment (fructose) et d'autres substrats

(urée) mais ne sont pas présentés ici. En effet, l'inconvénient majeur de ce système, pour le moment, est le manque de reproductibilité dans la phase de montage et la difficulté pour sceller de manière correcte la cuve sur le composant. Cela a engendré beaucoup de « casse » matérielle surtout lors de la phase de remplissage de la cuve. La phase de mesure, plus ou moins longue, a également été source de problèmes de descellement de la cuve entre autres. Ainsi, les mesures que nous avons obtenues n'ont pu être exploitées correctement du fait du manque de reproductibilité mais elles sont encourageantes.

Pour pallier tous ces problèmes inhérents à la fixation de la cuve, un nouveau système est en cours de réalisation. Il s'agira d'un procédé permettant de reporter la cuve, toujours fabriquée en PDMS, directement sur le composant rendant ainsi inutile le report de la puce sur le PCB. De plus, ce système qui sera développé dans le cadre de la thèse de Mr Benoît Torbiero, ne nécessitera plus de scellage supplémentaire ce qui évitera tous les problèmes de recouvrement de la grille sensible et permettra d'appliquer un protocole de mesure bien établi.

Bibliographie

[1] P. Bergveld
Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements, IEEE Trans. Biomed. Eng. BME-17, 70–71, 1970.

[2] D.E. Yates, S. Levine and T.W. Healy
Site-binding model of the electrical double layer at the oxide/water interface, J. Chem. Soc. Faraday Tans, Vol. 70, pages 1807-1818, 1974

[3] P. Bergveld
ISFET, Theory and Practice, IEEE Sensor Conference Toronto, October 2003

[4] A. Amari
Etude de la réponse au pH de structures microélectroniques à membranes de nitrure de silicium fabriqué par LPCVD, Thèse de docotorat de l'UPS de Toulouse, 1984

[5] W. Sant
Développement des micro-capteurs chimiques CHEMFETs pour des applications à l'hémodialyse, Thèse de doctorat de l'UPS de Toulouse, 2004

[6] M.L. Pourciel-Gouzy, W. Sant, I. Humenyuk, L. Malaquin, X. Dollat, P. Temple-Boyer
Development of pH-ISFET sensors for the detection of bacterial activity, (2004), In Press, Corrected Proof, Sens. Actuators B

[7] H. Yong Shim, S. Hoon Lee, D. June Ahn, K-D. Ahn and J-M. Kim
Micropatterning of diacetylenic liposomes on glass surfaces, Mat Sci Eng C, Volume 24 (2004), Issues 1-2, Pages 157-161

[8] ALTERNATIVE LITHOGRAPHY Unleashing the Potentials of Nanotechnology, pp169-203
Edited by Clivia M. Sotomayor Torres, Institute of Materials Science and Department of Electrical & Information Engineering, University of Wuppertal, Germany Kluwer Academic Publishers Boston/Dordrecht/London, 2003.

[9] http://www.energie-plus.com/news/archivestory.php/aid/302/DOSSIER_COV_-_S%E9paration_par_techniques_membranaires.html

[10] http://www.psrc.usm.edu/mauritz/diffuse.html

[11] T. Fujii
PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications, Microelectron Eng, Volume 61-62, Pages 907-914, 2002.

[12] H. Brunner, T. Vallant, U. Mayer, and H. Hoffmann
Stepwise Growth of Ultrathin SiO_x Films on Si(100) Surfaces through Sequential Adsorption/Oxidation Cycles of Alkylsiloxane Monolayers, Langmuir, Volume 12, Pages 4614 – 4617, 1996.

[13] L. Malaquin
Dispositifs ultra-sensibles pour le Nanoadressage électrique. Application à la détection de Biomolécules, Thèse de doctorat de l'INSA de Toulouse, 2004

Chapitre III

Après avoir proposé une approche basée sur une mesure directe du pH pour détecter l'activité de bactéries, nous nous proposons d'aborder le problème de la détection d'éléments en utilisant cette fois ci une mesure indirecte du pH. Pour cela, nous allons faire appel à un intermédiaire, une enzyme, qui va être capable de provoquer et d'amplifier une réaction donnant lieu à une modification de pH. Cette variation de pH sera directement proportionnelle à la concentration du substrat spécifique de l'enzyme utilisée avec le capteur.

Nous allons donc nous attacher, par le biais de ce travail, à remplir un cahier des charges, lourd, inhérent aux difficultés d'intégration d'éléments biologiques au sein d'un procédé de fabrication collective classique, utilisant les techniques habituelles de microélectronique.

Les trois principaux verrous technologiques sont cités ci-dessous :

- Respect de l'élément pendant la phase de préparation et pendant la phase de stockage,
- Choix cohérent du polymère avec les caractéristiques de biomimétisme et de biocompatibilité,
- Développement de procédés adaptés à la technologie silicium.

L'approche que nous avons choisie pour tenter de débloquer ces verrous consiste en l'insertion d'enzymes au sein d'un polymère déposé sur la grille sensible du capteur pH-ISFET. Pour cela, après avoir étudié le principe de la mesure enzymatique, nous avons tenté d'optimiser un procédé de fabrication collective en faisait évoluer une technique de dépôt manuelle vers une technique utilisant les méthodes dites « classiques » des micro-technologies : dépôt à la tournette et photolithographie. Dans un second temps, nous avons étudié la durée de vie des enzymes inclues dans le polymère ayant subi les diverses phases du procédé technologique.

I Etude du principe de détection

Le principe de détection que nous avons utilisé est présenté sur la figure III-1. Pour cela, nous avons choisi d'employer la méthode de piégeage décrite dans le premier chapitre. Ainsi, après avoir insérées les enzymes dans la matrice polymérique, celle-ci est déposée sur la zone sensible au pH du capteur. Lors de la mise en contact avec le substrat spécifique de l'enzyme choisie, les produits issus de la réaction vont engendrer une variation de pH qui sera détectée par le capteur pH- ISFET. Cette méthode de détection s'appuie bien évidemment sur un choix bien particulier du type d'enzyme à utiliser. En effet, pour être applicable, il faut qu'un des produits libérés induise directement une variation de pH. Pour cela, il doit s'agir d'un acide ou d'une base.

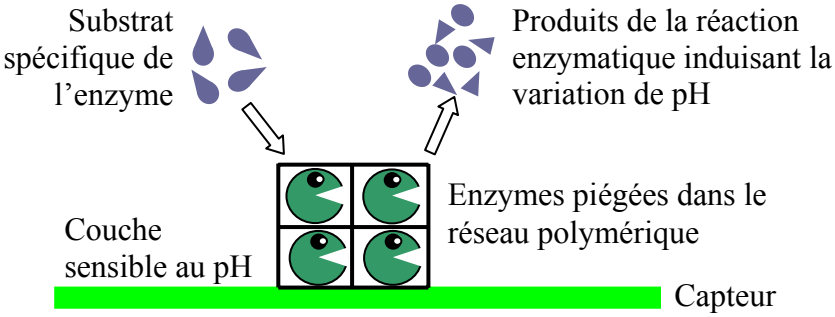


Fig III- 1 : Principe de la détection enzymatique appliquée aux capteurs pH-ISFETs

I.1 Enzymes utilisées

Les enzymes sont organisées en différentes classes suivant des critères de spécificités. La nomenclature des enzymes s'écrit de manière générale sous la forme : E.C. X.X.X.X. (E.C. : "Enzyme Commission"). Dans cette notation, le premier « X » correspond aux six types de réactions catalysées par les enzymes comme détaillé dans le tableau III-1

1er X	Réaction catalysée	
X = 1 : oxydoréductases (E. C. 1.X.X.X)	Oxydo-réduction	Transfert d'électron
X = 2 : transférases (E. C. 2.X.X.X)	Transfert de groupes	Transfert de groupes chimiques
X = 3 : hydrolases (E. C. 3.X.X.X)	Hydrolyse	Transferts de groupes fonctionnels à l'eau
X = 4 : lyases (E. C. 4.X.X.X)	Addition de groupe à des atomes engagés dans des doubles liaisons	Addition de groupes sur double liaison ou formation de double liaison par soustraction de groupe
X = 5 : isomérases (E. C. 5.X.X.X)	Isomérisation (de position de groupe ou de fonction)	Transfert de groupe à l'intérieur d'une molécule pour former un isomère
X = 6 : ligases (E. C. 6.X.X.X)	Condensation de deux molécules	Formation de liaison C-C, C-S, C-O ou C-N par réaction de condensation.

Tab III- 1 Nomenclature des enzymes : signification du premier terme

Le second "X" va permettre un classement supplémentaire en fonction de la nature du groupe du donneur d'électrons sur lequel l'enzyme agit. Un exemple est donné dans le tableau III-2 pour le groupe des oxydoréductases. Le troisième terme va donner un classement supplémentaire en fonction de la nature du groupe accepteur d'électrons sur lequel l'enzyme agit comme décrit dans le tableau III-3.

Enfin, le quatrième et dernier terme permet un classement supplémentaire en fonction du substrat sur lequel l'enzyme agit. Des exemples sont donnés dans le tableau III-4.

	2ème X	l'enzyme agit sur :
le 2ème "X" permet un classement supplémentaire en fonction de la nature du groupe du donneur d'électrons sur lequel l'enzyme agit	X = 1 : E. C. 1.1.X.X	le groupe CH-OH du donneur d'électrons
	X = 2 : E. C. 1.2.X.X	la fonction aldéhyde ou oxo du donneur d'électrons
	X = 3 : E. C. 1.3.X.X	le groupe CH-CH du donneur d'électrons
	etc ...	
	X = 19 : E. C. 1.19.X.X	la flavodoxine réduite
	X = 97 : E. C. 1.97.X.X	autres oxydoréductases

Tab III- 2 : Nomenclature des enzymes : signification du second terme

	3ème X	l'accepteur d'électrons est:
Considérons le groupe 1.4 des oxydoréductases qui agissent sur le groupe CH-NH2 du donneur d'électrons : le 3ème "X" permet un classement supplémentaire en fonction de la nature du groupe accepteur d'électrons sur lequel l'enzyme agit	X = 1 : E. C. 1.4.1.X	NAD+ ou NADP+
	X = 2 : E. C. 1.4.2.X	un cytochrome
	X = 3 : E. C. 1.4.3.X	l'oxygène
	X = 4 : E. C. 1.4.4.X	un groupe disulfure
	X = 7 : E. C. 1.4.7.X	une protéine fer - soufre
	X = 99 : E. C. 1.4.99.X	autres accepteurs

Tab III- 3 Nomenclature des enzymes : signification du troisième terme

	4ème X	Nom de l'enzyme
Considérons le groupe 1.4.1 des oxydoréductases qui utilisent le NAD+ ou le NADP+ comme accepteur d'électrons : le 4ème "X" permet un classement supplémentaire en fonction du substrat sur lequel l'enzyme agit	X = 1 : E. C. 1.4.1.1	alanine déshydrogenase
	X = 2 : E. C. 1.4.1.2	glutamate déshydrogenase
	X = 3 : E. C. 1.4.1.3	glutamate déshydrogenase (NAD(P)+)
	X = 4 : E. C. 1.4.1.4	glutamate déshydrogenase (NAD(P)+)
	etc ...	
	X = 19 : E. C. 1.4.1.19	tryptophan déshydrogenase
	X = 20 : E. C. 1.4.1.20	phenylalanine déshydrogenase

Tab III- 4 Nomenclature des enzymes : signification du quatrième terme

En ce qui concerne l'utilisation des enzymes pour les capteurs, le choix va se faire en fonction des produits finaux de la réaction. En effet, le capteur pH-ISFET étant capable de détecter une variation de pH, l'intérêt sera d'utiliser des enzymes répondant à ce critère.

Le choix de l'uréase (EC 3.5.1.5) s'est imposé pour différentes raisons. Ce travail de thèse a été mené en parallèle avec celui de Mr William Sant qui, dans le cadre d'une thèse CIFRE, a travaillé sur le développement de capteurs destinés à l'hémodialyse[1]. Dans le type d'analyses médicales qui étaient envisagées, la détection de l'urée occupait une place primordiale.

C'est donc naturellement que nous nous sommes tournés vers l'enzyme dont l'urée est le substrat. De plus, il s'avère que cette uréase correspond tout à fait aux critères recherchés pour l'utilisation des ISFETs en tant que capteurs enzymatiques puisque elle fait partie de la classe des hydrolases. En effet, suivant la nomenclature définie ci-dessus, on peut savoir qu'elle agit sur les liaisons C-N (autres que les liaisons peptidiques) et sur les amines linéaires. De plus, étant donné que son substrat spécifique est l'urée, il s'agira donc d'une urée aminohydrolase. Enfin, en observant la réaction chimique (figure III-2) qu'elle catalyse, on voit clairement que l'apparition des produits va engendrer une modification du pH qui pourra être détectée par le capteur chimique.

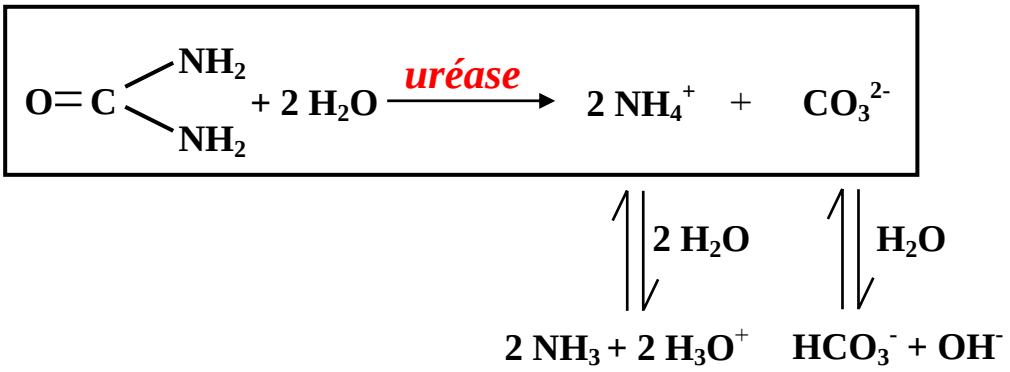


Fig III- 2 : Hydrolyse de l'urée en présence d'uréase

Cette réaction va provoquer l'apparition de différents produits qui vont tous, d'une manière ou d'une autre, influer sur le pH. C'est pour cela qu'avant toute chose, nous avons tenu à mettre en place un modèle, simple, qui nous permettrait de prévoir l'évolution du pH d'un milieu lors de la mise en contact de l'uréase et de son substrat.

I.2 Modélisation de la variation du pH en solution lors de la réaction enzymatique

Le modèle que nous avons choisi d'utiliser est basé sur l'équation de dissociation de l'urée en considérant les formes non dissociées des acides et des bases en présence :

$$CO(NH_2)_2 + 2H_2O \rightarrow 2NH_3 + H_2CO_3$$

Les couples acides/bases impliqués vont être les suivants :

$$NH_4^+ + H_2O \rightleftharpoons NH_3 + H_3O^+ \qquad K_1=5{,}62.10^{-10}$$

$$H_2CO_3 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H_3O^+ \qquad K_2=4{,}30.10^{-7}$$

$$HCO_3^- + H_2O \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H_3O^+ \qquad K_3=5{,}61.10^{-11}$$

$$H_2O \rightleftharpoons OH^- + H_3O^+ \qquad K_e=10^{-14}$$

K_1, K_2, K_3 étant les constantes de dissociation respectives des trois premières réactions et K_e étant le produit ionique de l'eau.

Si on écrit les valeurs de ces quatre constantes, nous obtenons en posant $[H_3O^+]=h^+$:

$$K_1 = \frac{[NH_3].h^+}{[NH_4^+]} \qquad \textit{Eq. 1}$$

$$K_2 = \frac{[HCO_3^-].h^+}{[H_2CO_3]} \qquad \textit{Eq. 2}$$

$$K_3 = \frac{[CO_3^{2-}].h^+}{[HCO_3^-]} \qquad \textit{Eq. 3}$$

$$K_e = [OH^-].h^+ \qquad \textit{Eq. 4}$$

Si on note C_d la concentration d'urée dissociée, nous pouvons écrire :

$$[NH_4^+] + [NH_3] = 2C_d \qquad \textit{Eq. 5}$$

$$[H_2CO_3] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] = C_d \qquad \textit{Eq. 6}$$

De plus, si on écrit l'équation d'électroneutralité, nous avons :

$$[NH_4^+] + h^+ = [OH^-] + C_t + [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] \qquad \textit{Eq. 7}$$

Dans laquelle C_t est la concentration d'équilibrage due au pH de la solution initiale, noté pH_0, soit :

$$C_t = h_0^+ - \frac{K_e}{h_0^+}$$

Où h_0^+ est la concentration initiale en ions hydronium qui définit pH_0. C_t peut donc encore s'écrire :

$$C_t = 10^{-pH_0} - 10^{-(14-pH_0)} \qquad \textit{Eq. 8}$$

L'équation 4 nous permet d'écrire : $[OH^-] = \frac{K_e}{h^+}$

De plus, les équations 1 et 5 donnent :

$$[NH_4^+] = 2C_d - [NH_3]$$

$$K_1 = \frac{[NH_3].h^+}{2C_d - [NH_3]}$$

Nous pouvons alors isoler les concentrations en ammoniaque et en ion ammonium :

$$\begin{cases} [NH_3] = \dfrac{2C_d.K_1}{K_1 + h^+} \\ [NH_4^+] = \dfrac{2C_d.h^+}{K_1 + h^+} \end{cases}$$

De la même façon, grâce aux équations 2, 3 et 6, nous pouvons écrire :

$$[H_2CO_3] = \frac{[HCO_3^-].h^+}{K_2}$$

$$[CO_3^{2-}] = \frac{[HCO_3^-].K_3}{h^+}$$

et $$\frac{[HCO_3^-].h^+}{K_2} + [HCO_3^-] + \frac{[HCO_3^-].K_3}{h^+} = C_d$$

soit : $$[HCO_3^-](\frac{h^+}{K_2} + 1 + \frac{K_3}{h^+}) = C_d$$

Ainsi, il en résulte que :

$$\begin{cases} [HCO_3^-] = \dfrac{C_d K_2 h^+}{h^{+2} + K_2 h^+ + K_2 K_3} \\ [H_2CO_3] = \dfrac{C_d h^{+2}}{h^{+2} + K_2 h^+ + K_2 K_3} \\ [CO_3^{2-}] = \dfrac{C_d K_2 K_3}{h^{+2} + K_2 h^+ + K_2 K_3} \end{cases}$$

Enfin, à partir de l'équation 7, nous pouvons déduire la concentration en ions hydronium :

$$\left(\frac{2.C_d}{K_1 + h^+} + 1\right).h^+ - C_t - \frac{K_e}{h^+} - C_d.K_2.\frac{h^+ + 2.K_3}{h^{+2} + K_2 h^+ + K_2 K_3} = 0 \qquad \textit{Eq. 9}$$

Ainsi, connaissant h+, il est facile de déduire les variations du pH et de déterminer les concentrations des diverses espèces chimiques en présence dans le milieu, en fonction du temps.

L'équation 9 peut alors être mise sous la forme d'un polynôme de degré 5 :

$$C_5 h^{+5} + C_4 h^{+4} + C_3 h^{+3} + C_2 h^{+2} + C_1 h^+ + C_0 = 0 \qquad \textit{Eq. 10}$$

avec:

$C_5 = 1$

$C_4 = 2C_d + K_1 + K_2 - C_t$

$C_3 = K_2 . (C_d + K_1 + K_3) – C_t . K_2 . (K_1 + K_2) – K_e$

$C_2 = K_1 . K_2 . (K_3 – C_d) – C_t . K_2 . (K_1 + K_3) – K_e . (K_1 + K_2)$

$C_1 = -K_1 . K_2 . K_3 . (C_t + 2 . C_d) – K_e . K_2 . (K_1 + K_3)$

$C_0 = -K_e . K_1 . K_2 . K_3$

Nous avons utilisé le logiciel Matlab® pour résoudre cette équation et tracer les courbes donnant les variations du pH, de pNH_3, pNH_4^+, pH_2CO_3, $pHCO_3^-$ et pCO_3^{2-}.

Pour cela, nous avons fait appel à une hypothèse bien connue au niveau de la cinétique enzymatique qui va régir cette réaction. En effet, suivant l'hypothèse de Michaelis, un substrat S est transformé en produit P grâce à l'activité catalytique d'une enzyme E. Leonor Michaelis, Maud Menten, Victor Henri ont proposé un schéma réactionnel selon lequel l'activité enzymatique est liée à la formation d'un complexe {Enzyme—Substrat} spécifique et transitoire.

$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

La première étape est rapide et équilibrée. La seconde étape, plus lente, module la vitesse de l'ensemble. Au début on peut négliger la réaction inverse. La vitesse initiale de la réaction est donc : $v_i = k_2 [ES]$ où k_2 est aussi appelée constante catalytique k_{cat}.

L'équation Michaelis-Menten, qui permet de lier la vitesse initiale et la concentration en substrat s'écrit alors :

$$v_i = \frac{v_{max}.[S]}{K_M + [S]} \qquad \textit{Eq. 11}$$

dans laquelle K_M représente la constante de dissociation du complexe {ES}, c'est à dire l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Plus K_M est petit, plus l'enzyme a de l'affinité pour le substrat. K_M a la dimension d'une concentration (entre 10^{-8} et 10^{-2} mol.L^{-1}).

Quant à v_{max}, cela correspond à la vitesse initiale maximale de la réaction quand tout l'enzyme (Etotal) est sous la forme {ES}, cas où le substrat est en large excès par rapport à l'enzyme. v_{max} représente l'activité catalytique de l'enzyme encore notée a. Suivant ce modèle de Michaelis-Menten, les variations de la concentration en fonction de la vitesse initiale sont données sur la figure III-3.

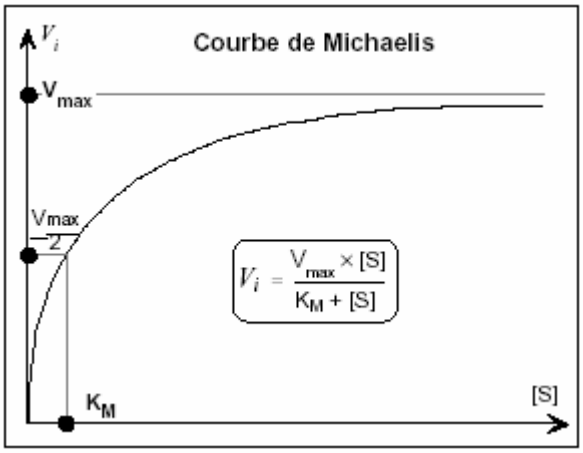


Fig III- 3 : Courbe de Michaelis

A partir de la représentation de Michaelis, nous avons fait une hypothèse simplificatrice : nous nous sommes placés dans la zone dans laquelle la vitesse ne dépend plus de la concentration en substrat, c'est-à-dire pour un [S] très grand. L'équation de Michaelis-Menten devient donc :

$$v_i = v_{max} = a$$

Ainsi, à partir de cette hypothèse, nous avons pu, dans notre modélisation de la dissociation de l'urée écrire la concentration C_d d'urée dissociée sous la forme suivante :

$$C_d = \frac{a.t}{V} \qquad \textit{Eq. 12}$$

où a représente l'activité de l'enzyme, c'est-à-dire le nombre de moles d'urée dissociées par seconde, ou encore, la moitié du nombre de moles de molécules d'ammoniac produites (deux moles produites pour une mole d'urée dissociée). V représente le volume de a solution en litres et t est le temps en secondes.

Le programme réalisé sous Matlab® est présenté en annexe. Il a permis de modéliser les variations du pH et des concentrations des différents produits avec les hypothèses simplificatrices préalablement citées. Les calculs ont été effectués pour différentes valeurs du pH initial. Les paramètres a et V ont été gardés constants et nous avons fait varier le temps. En effet, dans l'équation 12, modifier les paramètres a ou V revient uniquement à changer l'échelle des variations temporelles. C'est pour cela que nous avons fixé les valeurs de l'activité et du volume pour toutes les mesures. Afin de nous rapprocher le plus possible des conditions de mesure liées au capteur et après un calcul des quantités d'enzymes déposées sur la grille sensible, nous avons arrêté les valeurs suivantes :

$$a = 10^{-8}\ \text{mole.s}^{-1} \text{ et } V = 10^{-3}\ \text{L}.$$

Les figures III-4 a) et b) présentent les courbes typiques obtenues à l'aide du logiciel de calcul avec un pH initial de 7, ce qui correspond au cas standard des mesures réalisées ultérieurement. A la vue des premiers résultats, la potentialité du principe de la mesure que nous avons choisi est démontrée. En effet, la dissociation de l'urée en présence d'uréase est responsable d'une augmentation de la basicité, i.e. d'une augmentation de pH, de l'ordre de 2 unités pH en 10 minutes. Même si ce cas est idéal (concentration en urée infinie), la variation de pH, même moins importante, pourra être détectée sans problème par le capteur pH-ISFET (sensibilité ≈ 50 mV/pH).

L'analyse des figures III-4 a) et b) permet de mieux comprendre le fonctionnement général de l'uréase. Pour cela, il convient de rappeler que plus une base est forte, plus sa constante d'acidité K_a est faible et donc, son pK_a est plus élevé. Voici les valeurs de pK_a des trois couples considérés ici :

Force de l'acide

H_2CO_3 / HCO_3^-	pK=6,36
NH_4^+ / NH_3	pK=9,25
HCO_3^- / CO_3^{2-}	pK=10,25

Force de la base

Ainsi, l'augmentation de la basicité doit être principalement due aux couples HCO_3^- / CO_3^2 et NH_4^+ / NH_3. En fait, notre modélisation montre que le système tend à égaliser les concentrations en espèces HCO_3^-, NH_4^+ et NH_3 (figure III-4 b). Cela démontre qu'en régime établi, la dissociation de l'urée en présence d'uréase se fait de la manière suivante :

$$CO(NH_2)_2 + 2H_2O \rightarrow NH_3 + NH_4^+ + HCO_3^-$$

De plus, l'égalité des concentrations en espèces NH_4^+ et NH_3 fixe la valeur du pH à la valeur du pKa du couple NH_4^+ / NH_3 (équation 1), i.e à 9,25 (figure III-4 a).

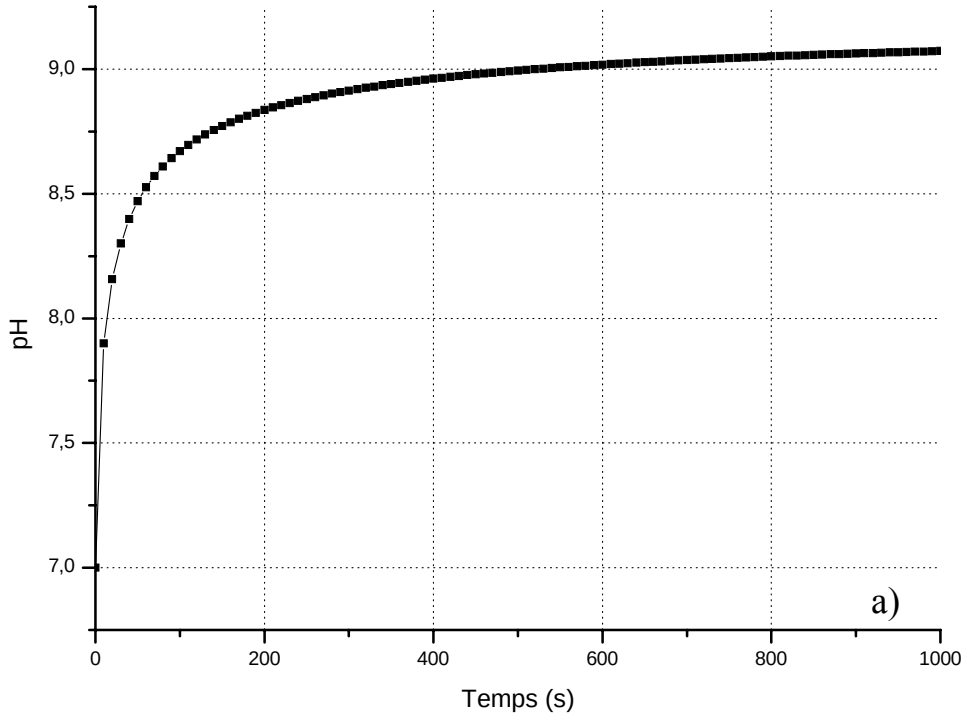


Fig III- 4a : Modélisation des variations du pH issues de la dissociation de l'urée par l'uréase

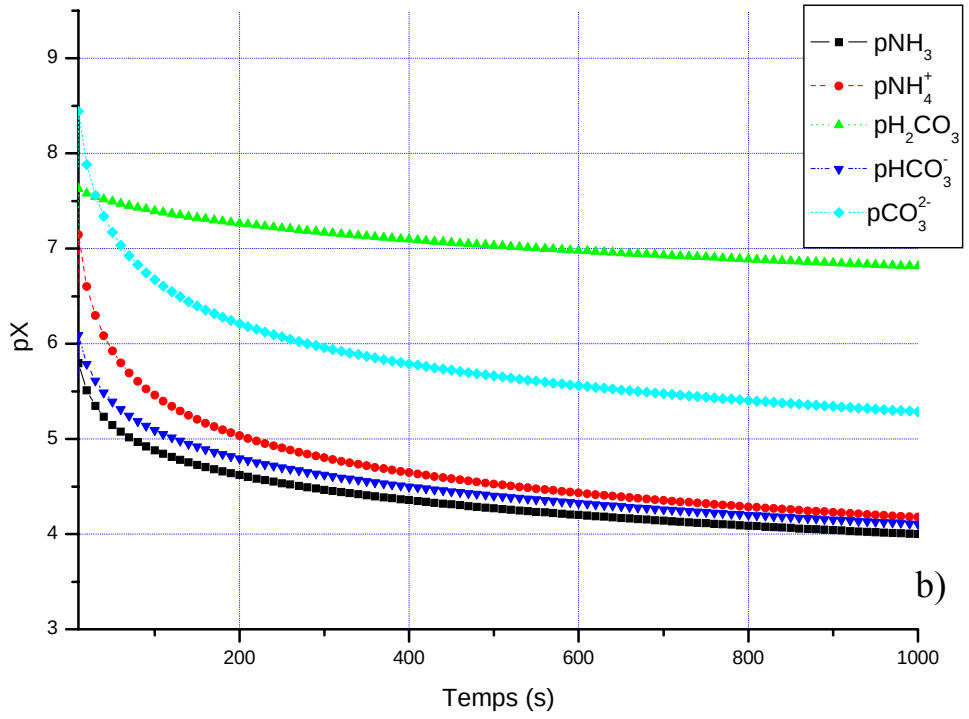


Fig III- 4b : Modélisation des variations des concentrations des différents produits issus de la dissociation de l'urée par l'uréase

Nous avons étudié le système chimique en modifiant la valeur du pH initial du milieu réactionnel. En faisant varier ce pH de 3 à 11, nous pouvons mettre en évidence les différences de comportements dues aux couples acido-basiques en présence (figure III-5). Mais dans tous les cas, comme on peut le constater sur la figure III-5, la valeur finale du pH du milieu tend toujours vers 9,25, pKa du couple NH_4^+ / NH_3.

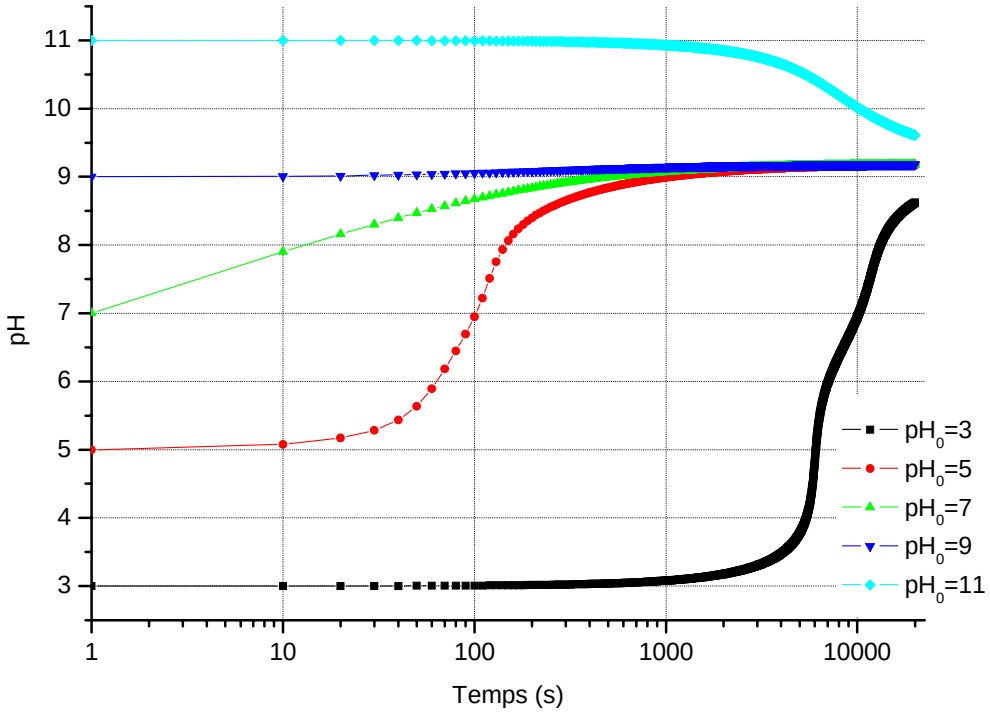


Fig III- 5 : Modélisation des variations du pH en fonction du pH initial

On voit ainsi nettement, en milieu basique (pH_0 = 11) la prédominance des bases NH_3 et CO_3^{2-}, cette dernière disparaissant rapidement au profit de la forme mono acide HCO_3^- du fait des équilibres acide-base. A l'inverse dans le cas d'un pH initial fortement acide (pH_0=3), ce sont les espèces NH_4^+ et H_2CO_3 qui sont d'abord majoritaires. Au cours du temps, la forme di-acide laisse petit à petit la place à la forme mono acide de l'acide carbonique pour tendre vers une configuration d'équilibre sensiblement la même que celle obtenue à partir du pH initialement basique.

La figure III-6 présente une particularité : au cours d'une phase initiale, toutes les pentes des droites sont égales. En effet, si on se reporte à la figure III-5, on peut constater que pour les pH initiaux éloignés de 9,25 il existe une phase de latence pour laquelle le pH va être constant. Ceci est particulièrement vrai pour pH_0 = 3 ou pH_0 = 11. Or, en se référant aux équations 1, 2 et 3, nous pouvons déduire que dans cette zone de pH constant, le rapport des concentrations : $\frac{[NH_3]}{[NH_4^+]}$, $\frac{[HCO_3^-]}{[HCO_3]}$ et $\frac{[CO_3^{2-}]}{[HCO_3^-]}$ va également rester constant.

Cela se traduit sur le graphe III-6 par l'égalité des pentes lorsqu'on trace les courbes suivant une échelle logarithmique.

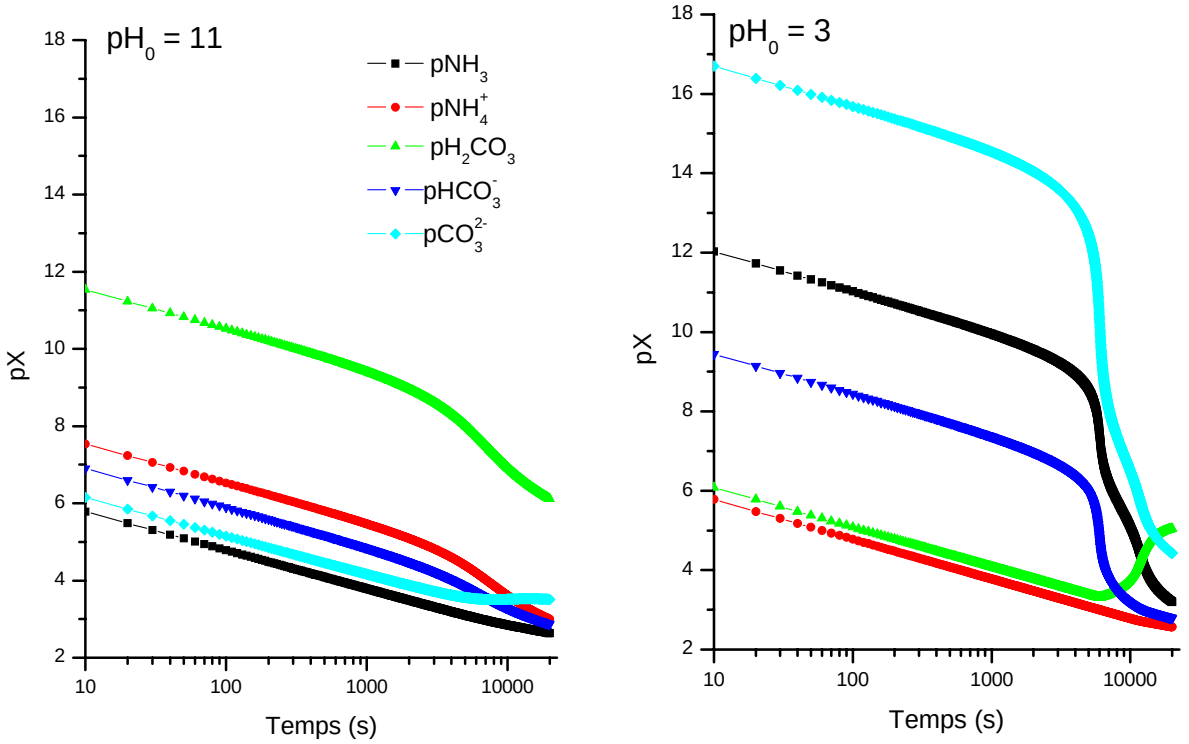


Fig III- 6 : Modélisation des variations des concentrations différents produits issus de la dissociation de l'urée par l'uréase en fonction du pH initial

Ce phénomène est lié au choix d'une variation linéaire de C_d avec le temps (équation 12). En effet, la fabrication des différentes espèces est directement fonction de cette valeur ainsi que proportionnelle à la valeur des différentes constantes de dissociation préalablement définies. Cet équilibre sera rompu dès lors que le pH variera de façon significative et les concentrations tendront à s'équilibrer autour du point d'équilibre du pH lié à la valeur du pKa du couple NH_4^+ / NH_3. Cela s'illustre sur la figure III-7 où on peut distinguer en particulier le cas où le pH initial est déjà de 9.

On voit que l'équilibre du pH est déjà atteint, de ce fait, la pente est toujours la même étant donné que les rapports de concentration ne varient quasiment pas. Sur la même figure est exposé le cas où le pH initial est de 5. La durée de la phase de stabilité est modérée et on voit très vite les rapports de concentration se moduler pour atteindre toujours le même équilibre final.

Cette modélisation, initialement mise en place pour étudier l'apparition des produits issus de la dissociation de l'urée par l'intermédiaire de l'uréase présente bien évidemment des limitations. Tout d'abord nous nous sommes placés dans le cas idéal d'un volume infini et d'absence de saturation due à la concentration en substrat. Il faudra tenir compte de la

limitation qui va apparaître dès lors que nous allons mesurer des concentrations d'urée élevées.

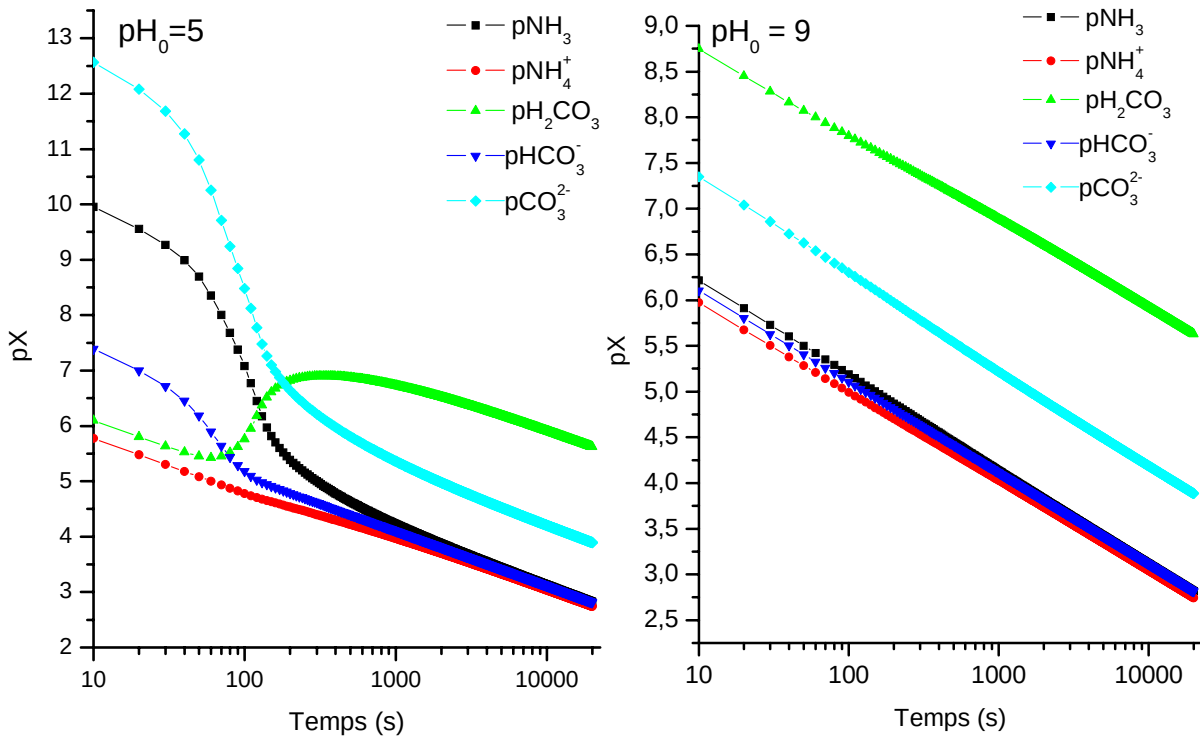


Fig III- 7 : Modélisation des variations des concentrations différents produits issus de la dissociation de l'urée par l'uréase en fonction du pH initial

De plus, nous n'avons pas, dans ce cas, envisagé le cas d'une diffusion des espèces ioniques à travers une membrane et à travers un fluide soumis à un flux constant. Tous ces paramètres seront pris en compte lors de la mise en place d'un modèle plus complet dans le cadre du stage de Mr Thibaut Cazaban (Avril – Juin 2004).

Enfin, il est intéressant de remarquer que cette étude est transposable à toute enzyme appartenant à la même classe que l'uréase. Dès qu'il va s'agir d'une hydrolase agissant sur les amines primaires, nous verrons apparaître un produit tel que l'ammoniaque et pourrons ainsi appliquer cette étude. Ainsi, cela nous permet également de préciser que toute enzyme de classe équivalente pourra être utilisée dans le cadre des mesures potentiométriques que nous souhaitons réaliser à l'aide des capteurs ISFETs.

Une fois ce modèle mis en place, nous avons pu procéder aux premiers essais. Pour cela, nous avons du développer un protocole de dépôt des enzymes sur la grille sensible du capteur ISFET.

Suite aux études préalables réalisées au laboratoire d'Ingénierie de Fonctionnalisation des Surfaces (IFOS) de l'Ecole Centrale de Lyon, nous avons envisagé d'insérer l'uréase au

sein d'un polymère particulier, le polyvinyl alcool, bien connu dans le domaine industriel mais peu ou pas utilisé dans le cadre de la micro électronique. Nous allons dans un premier temps présenter ce polymère.

II Le polyvinyl alcool (PVA)

II.1 Caractéristiques chimiques

Parmi les polymères utilisés, le polyvinyl alcool (PVA) apparaît régulièrement. Ce polymère d'origine synthétique possède de telles propriétés, qu'il est facilement adaptable à des applications très différentes.

Le PVA que nous avons utilisé se présente sous la forme d'un fluide incolore, hydrosoluble, inflammable appartenant à la classe des polymères organiques. Il est présent dans diverses industries. Il entre dans la composition des agents d'apprêtage qui confèrent aux papiers ou aux textiles une résistance aux huiles et aux graisses, aux solvants et à l'oxygène. Il entre aussi dans la composition d'adhésifs ou d'émulsifiants ou il peut encore servir de matériau de base pour d'autres résines. Cette diversité de fonctionnalités provient de ses propriétés chimiques.

La méthode de fabrication consiste en une saponification contrôlée du polyvinyl acétate. Les groupements acétates vont être éliminés à l'aide d'acides ou de bases sans rupture de la structure à longue chaîne de la molécule. Sa formule est classiquement représentée sur la figure III-8.

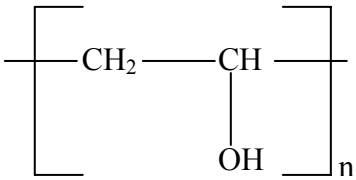


Fig III- 8: Formule chimique du polyvinylalcool

La quantité de groupements acétyls résiduels va influencer les propriétés. En effet, plus la réaction sera complète, plus le produit sera soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques. Une élimination incomplète des groupements acétyls aura tendance à inverser ces propriétés.

Le pic d'absorption maximale d'UV a été déterminé aux alentours de 325 nm pour le polyvinyl alcool.

II.2 Utilisations du PVA dans l'industrie

Les propriétés chimiques des alcools polyvinyliques ressemblent à celles des alcools les plus simples. Les réactions avec les aldéhydes sont particulièrement utiles dans la préparation d'autres résines. Le polyformal de vinyle ou le polyacétal de vinyle obtenus par le mélange du PVA et de formaldéhyde ou d'acétaldéhyde sont employés dans la préparation de laques, d'enduits ou de films. Le polybutyral de vinyle, obtenu par le mélange de PVA et de butyraldéhyde est quand à lui un film adhésif, dur et clair, résistant à l'eau, utilisé dans la stratification des verres afin de les rendre incassables.

Le PVA est utilisé en tant que tel de façons diverses et variées. La liste suivante n'est certainement pas exhaustive mais permet d'avoir une idée de l'importance de ce produit :

✓Cosmétique

Il est utilisé comme liant, pour la création de films, comme agent aqueux pour augmenter la viscosité. Mais, le PVA n'apparaît en fait que dans la composition de 2 % des produits cosmétiques suivant une répartition donnée dans le tableau III-5[2].

Produit	Concentration (%)
Masques faciaux	10 %
Masques	3 %
Ombres à paupières	3 %
Rouges à lèvres	2 %
Soins de la peau (visage et cou)	10 % (PVA hydrolysé)

Tab III- 5 : Concentration (en %) de PVA dans différents produits cosmétiques (FDA, 1992)

✓Agroalimentaire

Il est utilisé comme additif indirect pour la nourriture.

✓Industrie du plastique

Il entre dans la composition de moules (composants), d'éponges artificielles ou de tuyauterie pour carburants. Il peut aussi être utilisé pour le recouvrement de surfaces.

✓Produits pharmaceutiques

Il est utilisé surtout pour augmenter la viscosité et comme lubrifiant dans les solutions ophtalmologiques.

✓Applications cliniques

Il existe des éponges et mousses de PVA utilisées en tant que matériel embolique pour les opérations chirurgicales. Des films de PVA sont aussi étudiés en tant que porteurs d'antigènes vers des tumeurs cibles, ou en tant que support de spermicides.

Après des études biologiques générales, le PVA a été déclaré non immunogène, c'est à dire n'induisant pas la fabrication d'anticorps.

L'injection sous cutanée ou par intraveineuses chez des rats a fait apparaître quelques lésions ou cas d'hypertension. Mais d'autres études animales n'ont montré aucun signe d'irritation ou de sensibilisation. Enfin, au niveau humain, le PVA a été décrit comme étant non mutagène, non cancérigène et non irritant oculairement parlant[2].

En regard de ces conclusions, le PVA apparaît comme un polymère très prometteur dans le cadre de la microélectronique appliquée au domaine biomédical. De plus, étant déjà utilisé en très grande quantité dans l'industrie, il s'agit d'un produit très peu coûteux.

II.3 Positionnement du PVA dans le développement des biocapteurs

Pour la plupart des applications aux microcapteurs, le PVA est utilisé en tant que matrice d'immobilisation. Les cas dans lesquels il constitue lui-même l'élément de détection sont très rares. Par exemple, des capteurs d'humidité ont été élaborés en se basant sur la variation d'impédance du polymère en fonction du taux d'humidité[3].

Pour le piégeage des particules, il peut être employé seul mais également mélangé à d'autres composés. Ainsi, il est possible de trouver dans la littérature des matrice composées d'une part de PVA et d'autre part de fibres de soie[4], de gel de silice[5] ou encore de polyaniline[6].

Dans tous les cas, les particules sensibles emprisonnées sont diverses et variées. La malléabilité de ce polymère ainsi que son caractère fortement hydrophile offre la possibilité d'emprisonner un panel de produits biologiques assez étendu. Ainsi, il peut être utilisé en tant que matrice de support pour :

- La fluorescéine,
- Des nucléotides,
- Des enzymes,
- Des protéines,
- Des bactéries.

La plupart des études réalisées concernant le PVA en tant que matrice portent surtout sur l'immobilisation d'enzymes ou de protéines dans des gels de polyvinyl alcool. En effet, le

PVA est particulièrement adapté car sa structure chimique peut permettre une stabilisation des protéines par liaison aux chaînes polymériques.

Les méthodes d'immobilisation sont diverses et variées : par liaisons covalentes, par adsorption, réticulation par réactif bifonctionnel[3], congélation et décongélation[4,5], irradiation γ ou photopolymérisation[6,7].

En général, cette dernière méthode est associée à l'utilisation groupements styrylpyridinium rattachés au PVA par l'intermédiaire d'une cycloaddition. Cela permet la réticulation du polymère dans des conditions plus favorables aux matériaux biologiques piégés à l'intérieur. En effet, lorsqu'il est soumis aux UV, il réticule pour donner un réseau selon les mécanismes décrits sur la figure III-9.

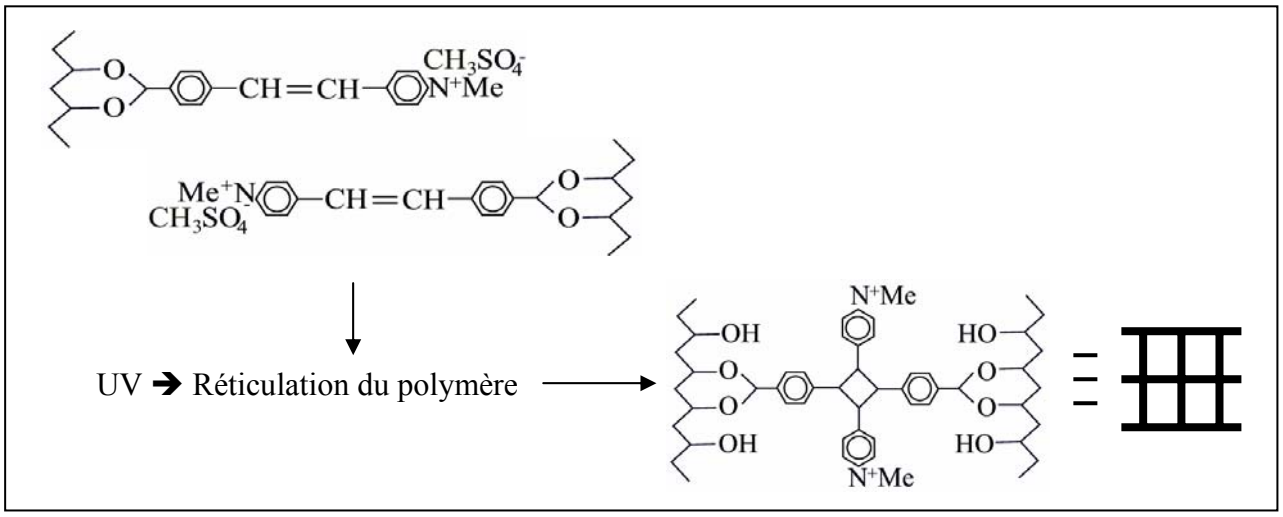


Fig III- 9: Réticulation du polyvinyl alcool sous UV initiée par les groupements styrylpyridinium

La structure de réseau polymérique obtenue est alors comparable aux micropores dans les oxydes métalliques. Mais les cavités formées sont d'une taille assez importante pour pouvoir contenir des éléments biologiques tels que les enzymes ou les protéines. De plus, sa grande affinité pour l'eau permet de conserver un taux d'humidité résiduelle dans le réseau assez important pour s'assurer de la durée de vie du matériel biologique.

En 1998, Yang et Chen ont utilisé le PVA réticulé comme couche sensible pour des capteurs d'humidité[3]. La grande affinité de ce polymère pour l'eau lui permet d'absorber et de désorber l'humidité atmosphérique. Le changement de teneur en eau dans le polymère est suivi par mesure de la variation d'impédance.

Jusqu'à présent, les membranes polymériques ainsi obtenues ont été déposées préalablement sur la partie sensible du capteur principalement sous forme de microgouttes[7,8]. Une fabrication industrielle de tels micro-capteur implique la mise au point et l'optimisation de méthodes de dépôt compatibles avec les méthodes technologiques classiquement utilisées en micro-électronique.

III Mise au point d'un protocole de dépôt

Afin de valider le principe de détection appliqué, nous avons, au préalable, simplement déposé le PVA sur la grille sensible du capteur ISFET à l'aide d'une micro-pipette.

III.1 Dépôt à la micropipette

Les premiers essais que nous avons effectués ont consisté à déposer un microlitre de d'une solution de PVA diluée à 50 % en masse avec de l'eau dé ionisée. Les caractéristiques du PVA que nous avons utilisé sont présentées dans le tableau III-6.

PVA		Teneur solide (%massique)	pH	Viscosité (Pa.s)	Teneur en Sbq (mol%)
D.P	D.S				
1700	88 %	13,2 ± 0,3	5,5 ~ 7	8000 ± 1500	1,26 ± 0,04

D.P. Degré de polymérisation D.S. Degré de saponification

Tab III- 6 : Caractéristiques de la résine SPP-H-13 données par le fournisseur

Ce PVA, référencé SPP-H-13, est fabriqué par la société TOYO GOSEI KOGYO Co., LTD (Japon) et nous a gracieusement été offert par la société PCAS (Longjumeau – FRANCE).

III.1.1 Protocole

Après avoir dilué le PVA à 50 % en masse avec de l'eau, la résine est laissée sous agitation magnétique pendant toute la nuit, à l'abri de la lumière à cause du photo-initiateur.

Nous effectuons les manipulations de dépôt au sein de la centrale de technologie du LAAS dans une zone exempte de rayonnement UV. Après avoir prélevé un microlitre de cette solution, nous le déposons sur le nitrure de la grille du composant. Le polymère est ensuite exposé aux UV à l'aide d'une source manuelle ponctuelle distillant une puissance minimum de 40 mW/cm² à 365 nm. Les premiers dépôts réalisés ont montré un défaut d'adhérence sur le nitrure de la grille sensible. Nous avons donc utilisé, pour renforcer l'adhésion des dépôts de polymère sur le nitrure un promoteur d'adhérence : le poly (4-vinylpyridine) (PVP).

Le PVP, utilisé dilué à 2 % en masse dans de l'éthanol, a renforcé l'adhérence de façon notable. L'évaporation du solvant est assurée par un recuit très rapide à basse température du fait du caractère très volatil de ce composé. Ensuite, le PVA est déposé de la même façon que précédemment sur le PVP. La figure III-10 représente l'extrémité d'un composant ISFEC (Ion Sensitive Field Effect Capacitance) dont la grille en nitrure est plus grande que celle d'un ISFET et qui demandait donc moins de précision pour les premiers essais.

Nous avons également étudié le profil d'un tel dépôt par profilométrie mécanique. Les résultats obtenus donnent des épaisseurs toujours dans la même gamme, de l'ordre de 10 à 20 microns. Mais comme cela est démontré sur la figure III-11, il existe, d'une part, une profonde irrégularité dans l'épaisseur et les dimensions de la couche déposée et donc, d'autre part, un manque total de reproductibilité d'une couche à l'autre.

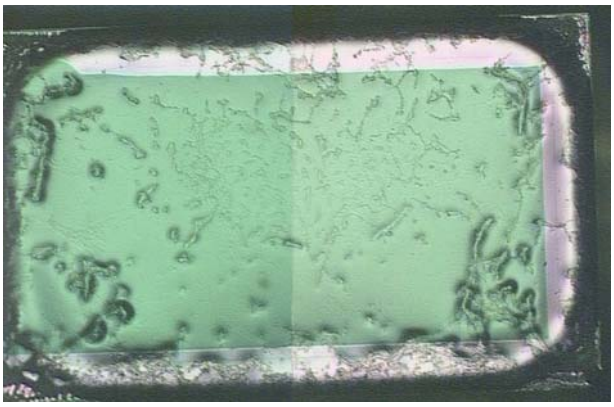


Fig III- 10 : Dépôt de PVA à la micropipette sur un composant ISFEC.

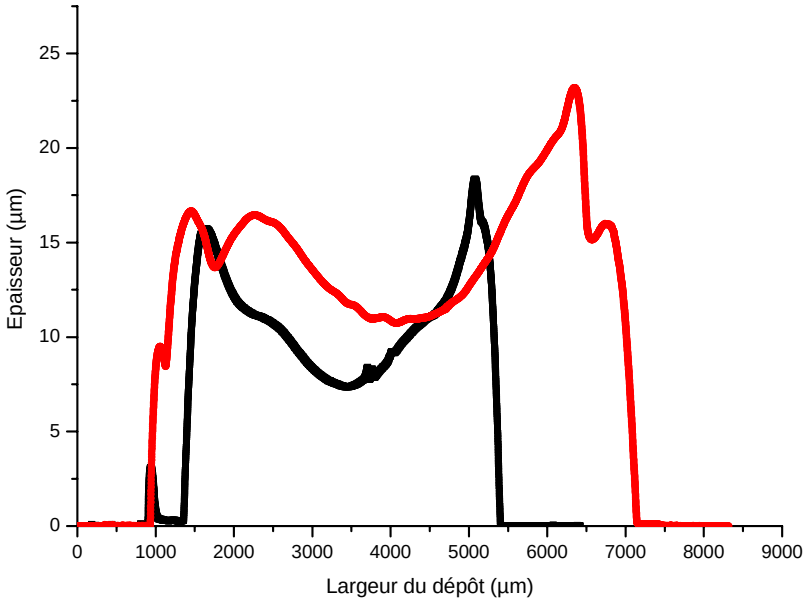


Fig III- 11 : Comparaison du profil de deux dépôts réalisés de façon identique

III.1.2 Résultats

Une fois le procédé de dépôt de PVA à la micro-pipette mis au point, il peut être adapté à la réalisation de couches enzymatiques. Il convient alors, lors de la phase de dilution du polymère, de rajouter l'enzyme considérée selon un certain pourcentage en masse.

De telles études ont été effectuées par Nicole Jaffrezic *et al.*[9] Les résultats obtenus, présentés sur la figure III-12, permettent de démontrer la possibilité de détecter de l'urée avec des sensibilités de détection de l'ordre de 20 mV pour une variation de 0,1 mole d'urée.

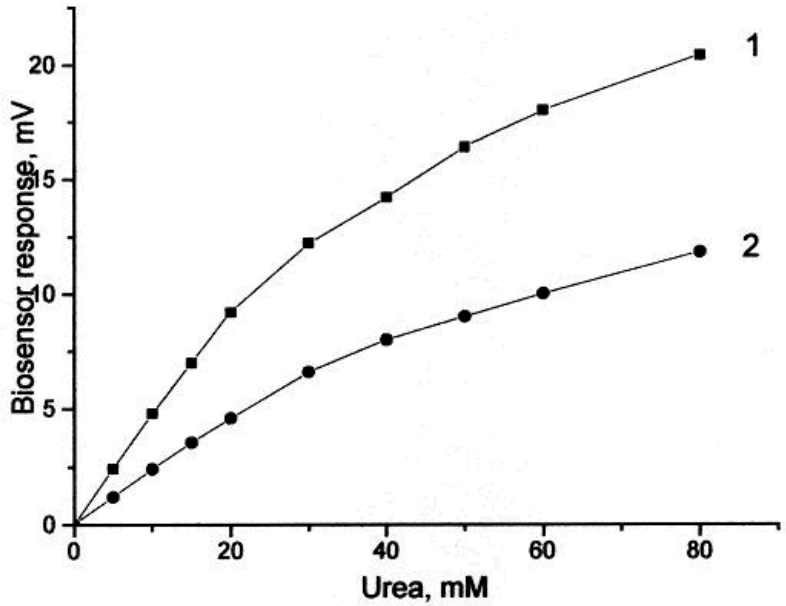


*Fig III- 12 : Courbes de calibrations pour la détection de l'urée grâce aux pH-ISFET (**1**) 5mM tampon phosphate, (**2**) 150mM NaCl + 5%BSA, pH 7.4*[9]

Sur la figure III-12, deux types de milieux ont été distingués. On voit qu'un milieu de travail composé de tampon phosphate classique favorise grandement la qualité de la réponse du capteur puisque la sensibilité est quasiment multipliée par deux par rapport à un milieu non tamponné et fortement ionique. La présence de protéines ne semble pas non plus particulièrement influencer de façon bénéfique l'enzyme. De plus, Jaffrezic *et al.* ont montré qu'en les stockant dans une atmosphère sèche à 4-6°C, la réponse des biocapteurs ne diminuaient pas pendant au moins trois mois[9].

Ainsi, ces premiers résultats avec un dépôt de PVA à la micropipette nous ont paru très encourageants. Néanmoins, dans l'optique d'une industrialisation potentielle d'un tel type de capteur, il nous a paru obligatoire de développer un protocole de dépôt de couches enzymatique qui serait reproductible et surtout compatible à la fois avec les techniques classiques de photolithographie et également avec le caractère biologique des éléments sensibles à incorporer au sein du PVA. Pour cela, nous avons effectué une étude systématique des divers paramètres que nous pouvions contrôler au cours de procédés de dépôt à la tournette et de développement sous ultraviolets appliqués aux alcools polyvinyliques.

III.2 Procédé de fabrication collective

III.2.1 Etude préliminaire

Avant toute chose, nous allons étudier théoriquement le comportement hydrodynamique du fluide pendant la phase d'étalement à la tournette[10].

Lorsqu'une couche d'un polymère newtonien, à savoir un polymère dont la viscosité va être constante en fonction de la vitesse, est déposée sur la surface plane d'un substrat circulaire, la loi fondamentale de la dynamique permet d'écrire :

$$-\eta \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} = \rho \omega^2 r \qquad \textit{Eq. 13}$$

Où z est l'axe de rotation, r est le rayon, v est la vitesse radiale, ω est la vitesse de rotation, η et ρ sont la viscosité et la masse volumique de la solution polymérique. Pour une valeur de r donnée, l'équation 13 peut être résolue afin de déterminer la vitesse radiale en fonction de z :

$$v(z) = \frac{r\omega^2}{\nu}(hz - \frac{z^2}{2}) \qquad \textit{Eq. 14}$$

Où ν = η/ρ est la viscosité cinématique et h est l'épaisseur de la couche de polymère.
Alors, l'équation de continuité permet d'écrire :

$$\frac{\partial h}{\partial t} = -\frac{1}{r}\frac{\partial (rq)}{\partial r} \qquad \textit{Eq. 15}$$

Où q est l'écoulement radial par unité de circonférence, soit :

$$q(r) = \int_0^h v(z)dz \qquad \textit{Eq. 16}$$

Avec les équations 14 et 16, l'équation 15 devient :

$$\frac{dh}{dt} = -\frac{2\omega^2 h^3}{3\nu} \qquad \textit{Eq. 17}$$

S'il n'y pas de phénomène d'évaporation de la solution polymérique, i.e. si ν est constant, la solution de l'équation 17 est donnée par :

$$h(t) = h_0\left(1 + \frac{4\omega^2 h_0^2 t}{3\nu}\right)^{-1/2} \qquad \textit{Eq. 18}$$

Où h_0 est l'épaisseur initiale de la solution de polymère.

Selon l'équation 18, il apparaît que l'épaisseur h décroît avec le temps vers 0. Pour produire un film solide, l'évaporation doit donc être prise en compte. Ainsi, nous pouvons considérer la solution polymérique comme un mélange de soluté solide et de solvant liquide. Afin de simplifier l'étude théorique, le soluté et le solvant seront caractérisés par leur épaisseur équivalente : s(t) et l(t). En tenant compte de ces définitions, l'épaisseur du polymère h(t) et la teneur x(t) en soluté seront données par :

$$h(t) = s(t) + l(t) \qquad \textit{Eq. 19}$$

$$x(t) = \frac{s(t)}{h(t)} \qquad \textit{Eq. 20}$$

Etant donné que la viscosité cinématique dépend de la teneur en soluté, l'équation 17 ne peut pas être résolue. Toutefois, en prenant en compte les termes d'écoulement et d'évaporation, nous pouvons écrire les conditions suivantes pour le soluté et le solvant :

$$\frac{ds}{dt} = -x\frac{2\omega^2 h^3}{3\nu} \qquad \textit{Eq. 21}$$

$$\frac{dl}{dt} = -(1-x)\frac{2\omega^2 h^3}{3\nu} - e \qquad \textit{Eq. 22}$$

Où e est l'évaporation surfacique du solvant par unité de temps.

La résolution de ce système mathématique n'est pas possible. Toutefois, D. Meyerhofer a montré, numériquement, que la solution exacte peut être décrite en considérant deux régimes hydrodynamiques différents[11].

Dans un premier temps, la solution polymérique est caractérisée par une grande épaisseur h. Dans ce cas, le phénomène d'évaporation peut être négligé. En prenant en compte l'équation 17, les équations 21 et 22 deviennent :

$$\frac{ds}{dt} = -x\frac{2\omega^2 h^3}{3\nu} = x\frac{dh}{dt} \qquad \textit{Eq. 23}$$

$$\frac{dl}{dt} = -(1-x)\frac{2\omega^2 h^3}{3\nu} = (1-x)\frac{dh}{dt} \qquad \textit{Eq. 24}$$

En se basant sur les équations 20 et 23, nous pouvons écrire que la teneur x(t) est constante, égale à la teneur initiale x_0 :

$$s(t) = x(t)h(t) \Leftrightarrow \frac{ds}{dt} = \frac{dx}{dt}h(t) + x(t)\frac{dh}{dt}$$

$$\frac{ds}{dt} = x\frac{dh}{dt} \Rightarrow \frac{dx}{dt} = 0 \Leftrightarrow x = cte = x_0$$

Par conséquent, puisque la viscosité cinématique ν est aussi constante, égale à sa valeur initiale ν_0, les équations 23 et 24 permettent d'écrire :

$$\frac{s(t)}{s_0} = \frac{l(t)}{l_0} = \frac{h(t)}{h_0} = \left(1 + \frac{4\omega^2 h_0{}^2 t}{3\nu_0}\right)^{-1/2} \qquad \textit{Eq. 25}$$

Cependant, plus l'épaisseur diminue, plus le terme concernant l'écoulement devient négligeable. Ainsi, dans un second temps, l'évaporation devient seule responsable de la diminution de l'épaisseur. Après intégration, les équations 29 et 30 donnent les épaisseurs s(t) et l(t) du soluté et du solvant. :

$$s(t) = cte = s_i \qquad \textit{Eq. 26}$$

$$l(t) = -e \cdot t + l_i \qquad \textit{Eq. 27}$$

Où s_i et l_i sont les constantes d'intégration relatives à la transition entre le régime initiale et le régime final.

L'épaisseur finale du polymère h_f sera atteinte lorsque l(t) = 0. Elle sera alors donnée par :

$$h_f = s_f + l_f = s_i = x_i h_i = x_0 h_i \qquad \text{Eq. 28}$$

La transition entre les deux régimes initial et final est définie pour :

$$(1 - x)\frac{2\omega^2 h^3}{3\nu} = e \qquad \textit{Eq. 29}$$

Sinon :

$$h_i = \left(\frac{3\nu_0 e}{(1 - x_0)2\omega^2}\right)^{1/3} \qquad \textit{Eq. 30}$$

Ainsi, selon les équations 29 et 30, l'épaisseur finale est donnée par :

$$h_f = x_0\left(\frac{3\nu_0 e}{(1 - x_0)2\omega^2}\right)^{1/3} \qquad \textit{Eq. 31}$$

Nous obtenons ainsi l'épaisseur de PVA déposée en fonction de la vitesse de rotation et des paramètres hydrodynamiques de la solution polymérique.

III.2.2 Etude du dépôt à la tournette

La première étude de ce protocole a consisté à déposer le PVA, considéré comme une résine photosensible négative grâce à la présence des groupements styrylpyridinium, avec une tournette Gyrset RC-8, Suss-Microtec S.A. (France) puis à mesurer les épaisseurs obtenues en fonctions des vitesses de rotation et des taux de dilution du PVA avec l'eau.

La dilution est effectuée de la même manière que pour le dépôt à la micro-pipette, à savoir que cela se fait en masse. Mais, le PVA étant composé d'eau à plus de 90 %, la masse volumique de celui-ci est très proche de celle de l'eau. Donc, quand on parle de dilution en masse cela revient quasiment à parler en terme de dilution volumique.

Le dépôt à la tournette s'est alors fait de manière classique, c'est-à-dire en contrôlant la vitesse de rotation (l'accélération étant gardée constante à 5000 $tr.min^{-2}$) et le temps de rotation. Les résultats d'épaisseur obtenus seront présentés dans la partie III.2.4.

III.2.3 Etude de la réticulation sous UV

Après avoir étalé la résine sur le substrat de silicium, la couche de PVA est exposée à un rayonnement ultraviolet afin de générer la réticulation de polymère qui va donner naissance à la couche sensible. Nous rappelons ici que cette réticulation va être engendrée par la présence de groupements -méthyl pyridinium méthylsulfate- (SbQ) qui constituent le photoinitiateur suivant la réaction présentée sur figure III-9.

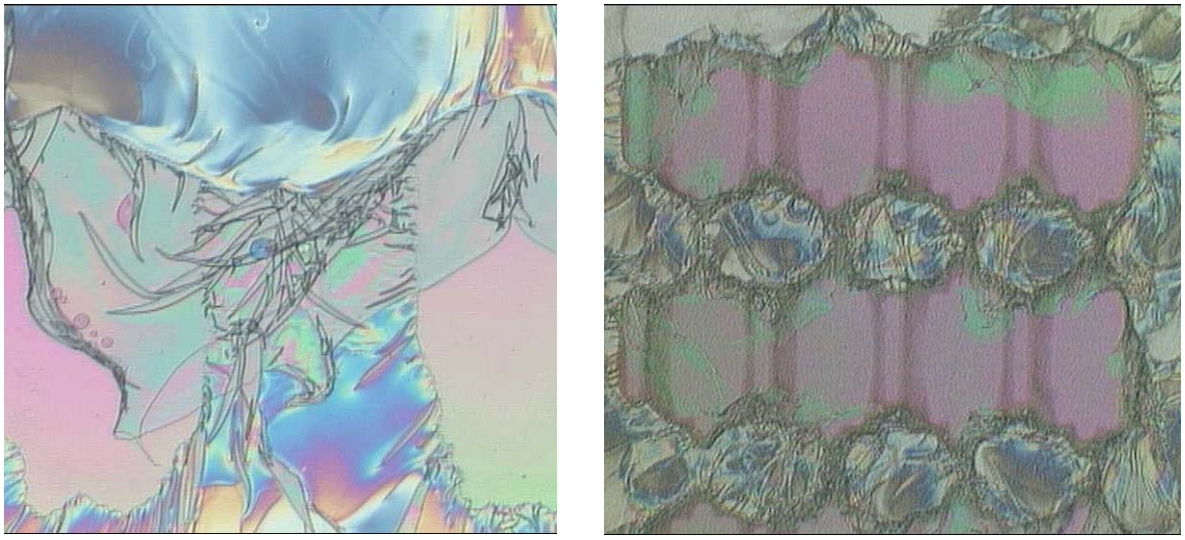


Fig III- 13 : Cas de dépôts de résine sous exposés et non totalement réticulés

Pour les premiers essais de réticulation nous avons défini le temps de façon tout à fait aléatoire puisque nous n'avions pas d'idée du temps nécessaire pour réticuler de telles épaisseurs de polymère en fonction de la puissance de la lampe utilisée.

De ce fait, les premiers résultats ont montré des défauts de réticulation très important soit avec un décollement immédiat de la résine lors de la mise en contact avec le solvant soit avec une dégradation due à la surchauffe de la résine engendrée par la chaleur dégagée par la lampe. La figure III-13 montre le cas typique d'un motif de résine exposé trop peu de temps aux UV et n'ayant pas été totalement réticulé. En effet, seule la surface est solidifiée, le mécanisme n'a pas eut le temps de se propager dans la masse du polymère.

Afin de déterminer le temps nécessaire à la réticulation en fonction de l'épaisseur et de la dilution, nous avons employé une technique développée au sein de l'équipe TEAM dans la centrale de technologie du LAAS. Nous avons mesuré le flux lumineux traversant le dépôt de résine au cours de la réticulation. Pour cela, nous avons déposé le polymère à la tournette sur un substrat de verre, transparent. L'hypothèse que nous avons faite étant que lorsque le flux lumineux traversant le polymère ne variait plus, c'est que la réticulation était complète et qu'il n'y avait plus de modification de la structure chimique. Un exemple de variations typiques du flux lumineux pendant la phase d'exposition du PVA est donné sur la figure III-14.

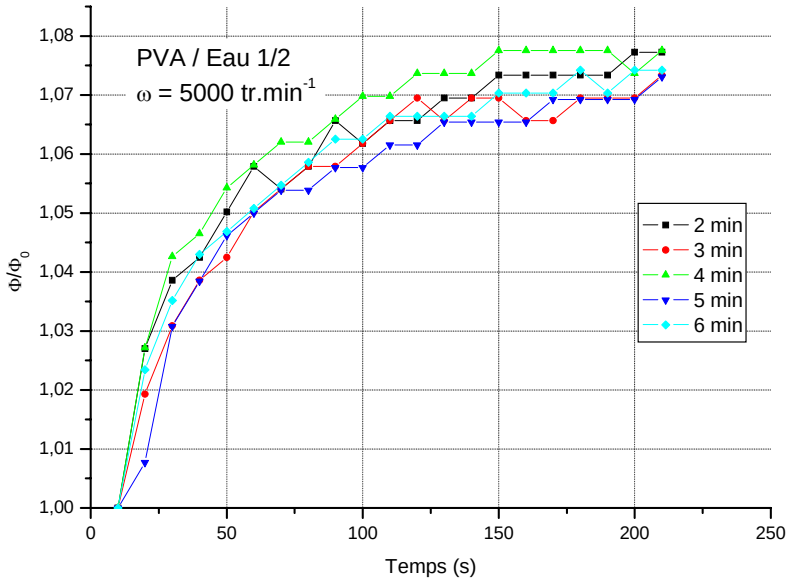


Fig III- 14 : Variation du flux lumineux traversant la résine au cours de la réticulation

Nous avons été dans l'obligation, surtout pour la résine la plus visqueuse, d'insérer avant l'exposition aux UV une phase de pré-recuit. En effet, sans cette étape, nous n'arrivions pas à provoquer la réticulation dans la masse su polymère déposé. Nous obtenions toujours une résine surchauffée en surface et collée au masque à travers lequel le substrat est exposé alors que le PVA près de la surface du silicium n'était toujours pas réticulé. En intégrant cette étape de recuit, très léger en raison de l'insertion future d'éléments biologiques, nous favorisons la propagation du processus de réticulation au sein de la couche.

Nous pouvons voir sur la figure III-14 que si le temps de pré-recuit n'influe pas obligatoirement sur le temps d'insolation nécessaire, par contre il agit sur la structure du polymère. En effet, on peut supposer que pour un pré-recuit de 4 min, le réseau polymérique étant mieux structuré, il laissera passer un flux plus important.

Ainsi, cette étape de mesure des flux nous a permis de déterminer, en première approximation, pour chaque dilution de la solution polymérique et pour chaque vitesse de dépôt un temps d'insolation ainsi qu'un temps de pré-recuit. Les temps qui sont donnés sur la figure III-15 ont finalement été déterminés après plusieurs essais.

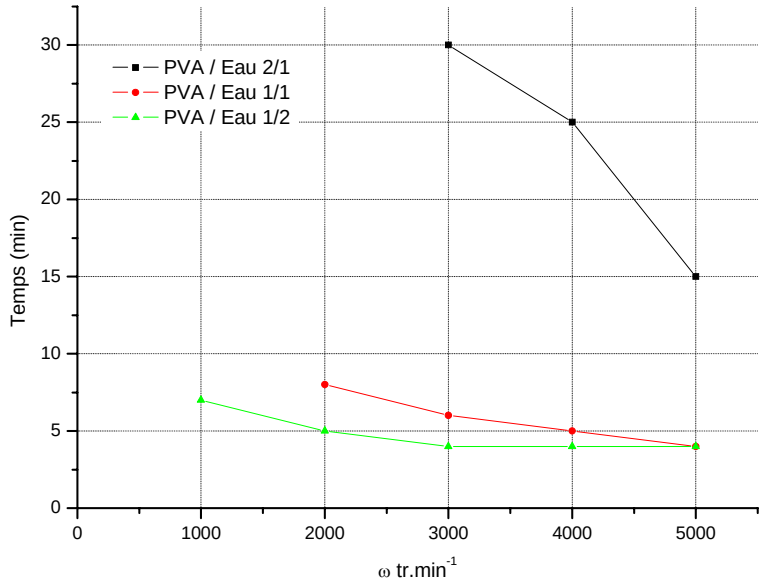


Fig III- 15 : Temps d'insolation nécessaires pour chaque dilution et chaque vitesse de rotation : variation entre 4 et 30 minutes

Il n'y a pas de résultats pour les faibles vitesses de rotation et les faibles dilutions car d'une part les épaisseurs étaient trop importantes et d'autre part, le dépôt réalisé à la tournette n'était pas homogène du fait de la viscosité vraiment trop importante. Sinon, les résultats sont cohérents avec les observations faites au préalable. Les temps nécessaires les plus longs sont ceux pour la dilution la moins importante et donc, la viscosité et l'épaisseur les plus grandes à vitesse de rotation équivalente. En effet, pour une dilution à un taux de 2 volumes de PVA pour un volume d'eau, le temps d'insolation est supérieur à 15 min, même pour les épaisseurs les plus faibles. Il est évident que de tels temps ne peuvent pas être intégrés dans un procédé classique de micro-technologie. En fonction de ces résultats, nous avons décidé de travailler uniquement avec les deux autres dilutions afin de rester dans des limites acceptables et applicables pour un procédé de fabrication collective.

Après cette étape d'exposition aux rayonnements ultraviolets, nous avons également inséré une phase de recuit, toujours très faible. Le temps de ce recuit a été optimisé par le

biais de l'étude de la phase de développement. Nous rappelons ici que le PVA est considéré comme une résine négative. Ainsi, tautologiquement, le PVA non réticulé va se diluer dans son solvant : l'eau. Ainsi, les zones du dépôt qui n'auront pas été exposées aux UV vont immédiatement disparaître lors de la mise en contact avec l'eau. Suivant les indications du fabricant, il est apparu que le développement des motifs se faisait de meilleure façon avec de l'eau chaude (la température n'était pas spécifiée). Toujours dans l'optique d'un process intégrant des éléments biologiques, nous avons opté pour une température du bain de développement de 40°C.

Tout comme pour la phase de post-recuit, l'amélioration amenée par l'utilisation d'eau légèrement chauffée apparaît surtout au niveau de la résolution des motifs obtenus. En effet, la mise en place de ces deux étapes a permis l'obtention de bordures du motif bien nettes comme en témoigne la figure III-16. En effet, la différence est évidente en ce qui concerne la structure des bordures du motif.

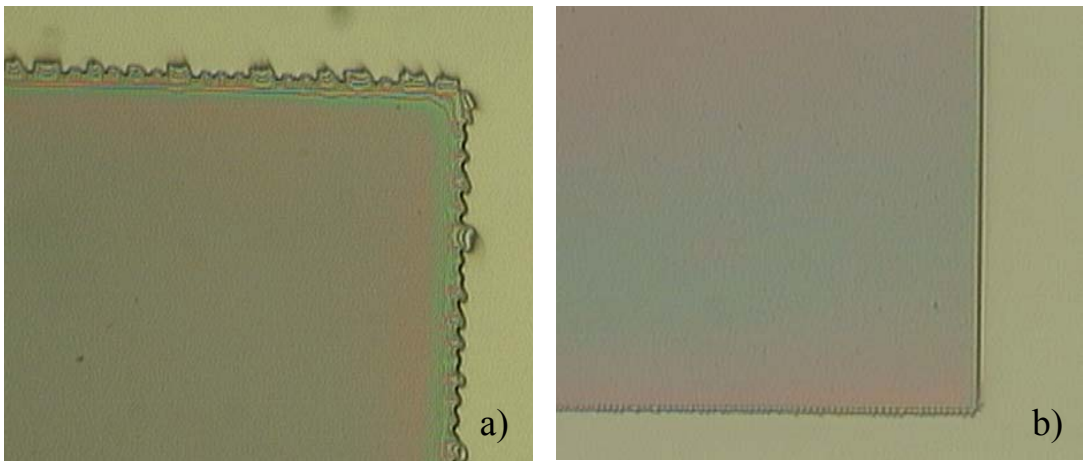


*Fig III- 16 : Mise en évidence de la différence de résolution des motifs obtenus **a**) sans post-recuit **b**) avec post-recuit*

III.2.4 Résultats technologiques

Afin de valider ce procédé de dépôt, nous avons réalisé deux types de motifs de dimensions très différentes : 1 cm² et 8.10^{-4} cm². Le premier modèle a été créé dans un but bien particulier : permettre, ultérieurement, une caractérisation biologique des dépôts enzymatiques réalisés. La taille du second motif correspond à celle de la grille sensible des capteurs pH-ISFET. Nous avons également caractérisé la résolution des motifs et la reproductibilité de ce protocole l'aide de profilométrie mécanique. Cette technique nous a renseigné de manière fiable sur l'état de surface des dépôts ainsi que sur l'aspect franc des bordures. Les résultats caractéristiques que nous avons obtenus par cette méthode sont présentés sur la figure III-17.

On peut s'apercevoir sur cette figure que le comportement du polymère va peu ou pas varier en fonction des dimensions du motif. En effet, si pour le plus grand des deux (surface 1 x 1 cm²), nous observons un profil bombé, c'est qu'en réalité nous suivons le rayon de courbure de la plaquette. En traçant le profil du motif sur une largeur de plus d'un centimètre nous voyons apparaître ce défaut présent sur la majorité des wafers de silicium et habituellement invisible du fait de la faible dimension balayée (quelques microns). En tenant compte de ce rayon de courbure qui induit une flèche de 0,5 microns, nous pouvons observer une épaisseur de dépôt homogène de l'ordre de 0,8 microns.

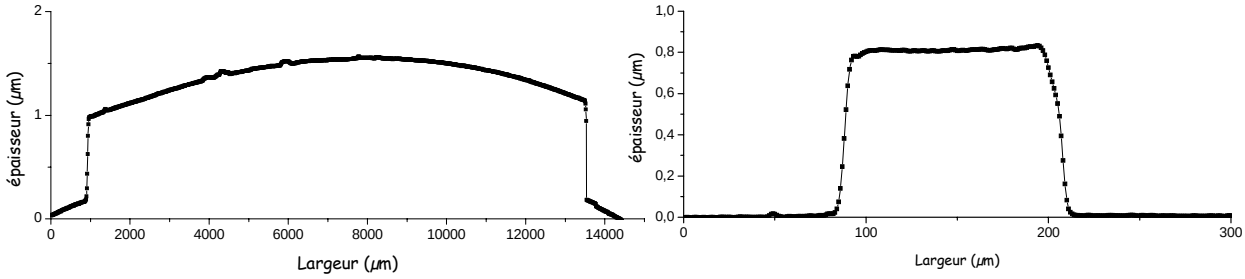


Fig III- 17 : Profils obtenus pour les deux types de motif : Influence des dimensions sur l'épaisseur et la répartition du polymère

Ainsi, ce phénomène n'est généralement pas observé du fait des très faibles dimensions habituellement utilisées pour les motifs en résine et il n'apparaît pas sur le second type de motifs que nous avons réalisé. En effet, ceux-ci sont de dimensions beaucoup plus faibles (surface 0,8 x 0,1 mm²) et ils n'ont montré aucune déformation du type de celle observée précédemment comme en témoigne la figure III-17. De plus, on peut se rendre compte ici de la bonne résolution que nous obtenons en ce qui concerne les flancs des dépôts. En effet, nous pouvons constater que les parois sont droites et sans déformation. Enfin, il faut noter également que la dimension du motif ne semble pas influencer l'épaisseur finale du dépôt puisque elle tend vers 0,8 micron pour le motif de 0,08 mm² comme pour celui de 1 cm². Ainsi, il est probable que le processus de réticulation n'est pas dépendant de la quantité de polymère à réticuler mais uniquement de l'épaisseur du dépôt. Enfin, nous n'avons pas constaté de différence en ce qui concerne l'adhésion du polymère sur le silicium. Des études concernant le vieillissement des dépôts en milieux aqueux ont été réalisées. Après plusieurs mois de contact avec une solution aqueuse, les dépôts sont toujours présents et fermement adhérés sur la surface.

Dans tous les cas immédiatement après l'application du protocole mis au point, l'observation des deux types de dépôts ne laisse pas voir de différence comme le montrent les photos présentées sur la figure III-18.

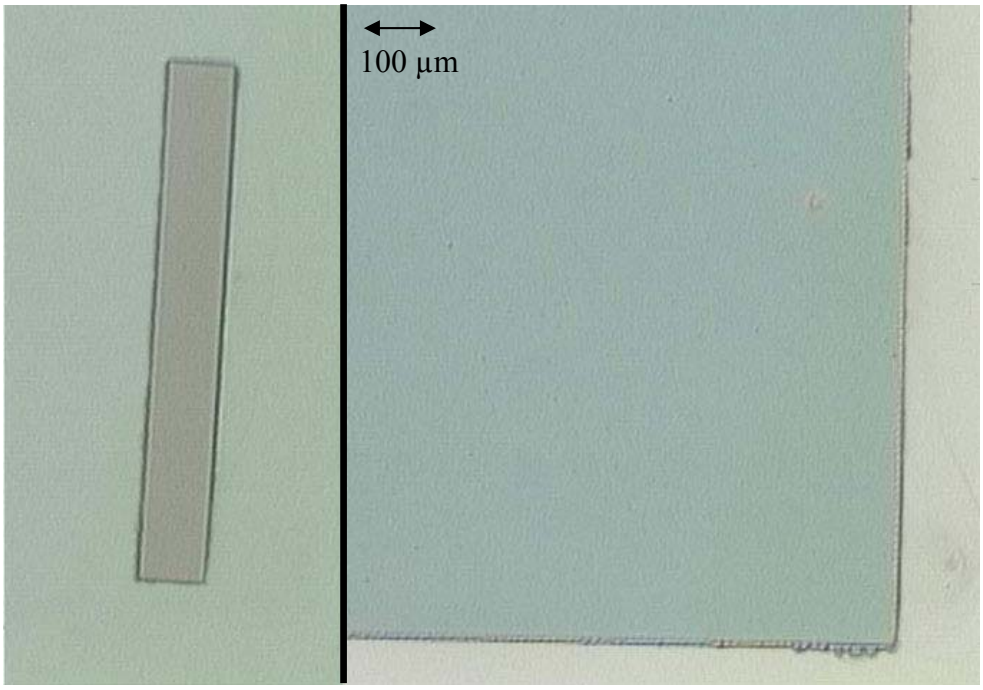


Fig III- 18 : Détail des motifs finaux obtenus par application du protocole défini

Aucune différence au niveau de la qualité de l'accroche et de l'adhésion du polymère n'a non plus été constatée lors des tests de vieillissement de la résine dans l'eau. Nous avons laissé les substrats, porteurs des deux types de dépôts, en contact avec de l'eau pendant plusieurs heures voire plusieurs jours (jusqu'à trois mois pour les couches enzymatique dans une solution tamponnée). D'un côté, nous n'avons pas détecté de décrochement spontané du polymère mais d'un autre côté, nous avons pu observer un changement au niveau de la surface des motifs pour les plus grandes surfaces. En effet, ceux-ci ont fini par présenter des craquelures dues, sans doute, à une accumulation et donc un surplus d'eau au sein du motif, le polymère se comportant en quelques sortes comme une éponge).

Finalement, la mise au point du procédé technologique et la caractérisation profilométrique des motifs en PVA déposés ont permis d'étudier les épaisseurs déposées. Ainsi, la figure III-19 représente les variations de l'épaisseur h du film de PVA déposé à la tournette en fonction de deux paramètres : la vitesse de rotation de la tournette ω (l'accélération étant gardée constante à 5000 $tr.min^{-2}$) et la dilution du polymère avec de l'eau. On constate que l'épaisseur varie de 0,2 à 2 microns de façon tout à fait cohérente. En effet, cette épaisseur augmente lorsque la vitesse de rotation ou le taux de dilution diminuent.

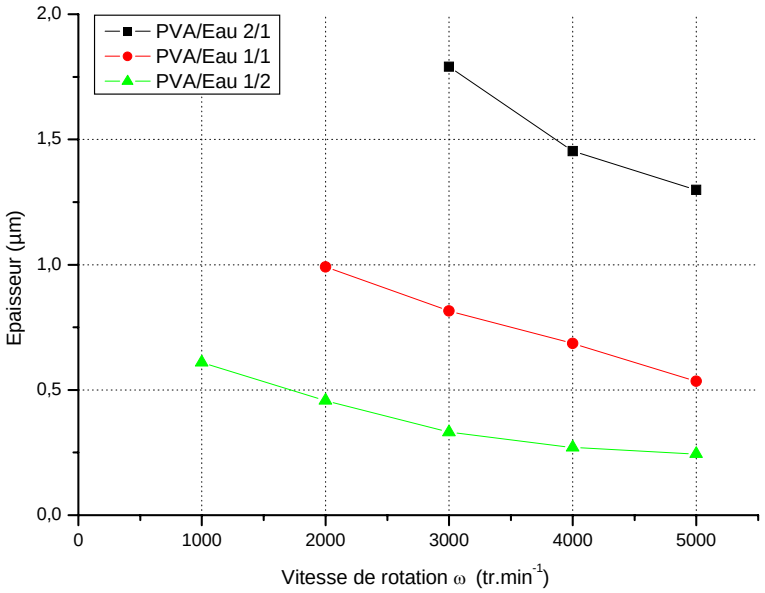


Fig III- 19 : Variations de l'épaisseur de la couche de PVA déposée en fonction de la vitesse de rotation ω et du taux de dilution

En reprenant la figure III-19 en coordonnées logarithmiques, nous pouvons nous apercevoir que ce modèle correspond tout à fait au comportement du PVA (figure III-20). En effet, Les pentes des courbes ainsi obtenues avoisinent toutes une valeur de -0,66 ± 0,03, i.e. l'épaisseur déposée h_f varie en $\omega^{-2/3}$ (équation 31).

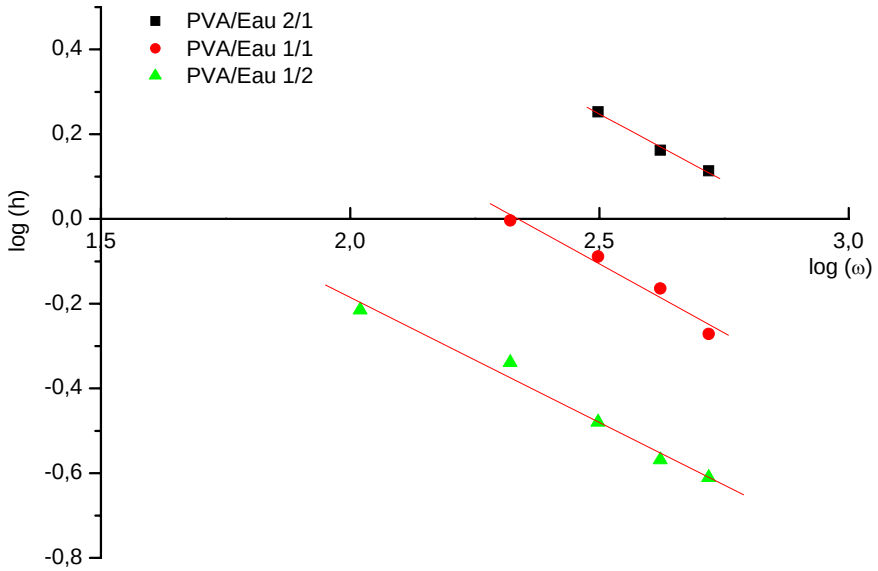


Fig III- 20 : Accord entre la théorie et la pratique concernant l'épaisseur de polymère déposée : les pentes des droites sont toutes voisines de -0,66.

Pour aller plus loin, nous avons mesuré la viscosité des solutions de PVA à l'aide d'un viscosimètre Haake VT550. Ces expériences ont été effectuées au Centre de Bioingénerie Gilbert Durand de l'INSA de Toulouse avec le soutien de Mlle Nathalie Doubrovine et l'accord du professeur Jean-Marie François. Les résultats nous ont permis de calculer les différentes caractéristiques hydrodynamiques des trois solutions de PVA étudiées. Ces valeurs sont données dans le tableau III-7. Grâce à elles, nous avons pu enfin évaluer l'évaporation surfacique de l'eau, dans ce contexte bien précis à 0.3 x 10^{-9} $m.s^{-1}$ par l'intermédiaire de l'équation 31.

Dilution	C_0	ρ ($kg.m^{-3}$)	η (Pa.s)	ν ($m^2.s^{-1}$)
PVA/Eau 2/1	0.0885	1.0020	0.963	0.961
PVA/Eau 1/1	0.0665	1.0015	0.245	0.245
PVA/Eau 1/2	0.0425	1.0010	0.053	0.053

Tab III- 7 : Caractéristiques hydrodynamiques des différentes solutions de PVA

III.2.5 Etude de dépôts multiples

Nous venons de montrer que le protocole mis au point a conduit à la fabrication de dépôt de PVA bien définis et réalisés avec les techniques de fabrication collective habituellement utilisées en microélectronique. Après toutes les études préalables, nous avons opté pour la création de dépôts d'un micron d'épaisseur. Toutefois, nous avons envisagé également la possibilité de créer des dépôts avec des épaisseurs autres. Si nous n'avons pas rencontré de problèmes pour les épaisseurs inférieures au micron (dilution de la solution mère de PVA plus importante), il n'en a pas été de même pour les épaisseurs supérieures au micron. Comme nous l'avons évoqué précédemment, lorsque l'épaisseur de résine déposée sur le substrat est trop importante, nous rencontrons des difficultés pour réticuler l'intégralité de la masse de polymère. Cela est surtout vrai lorsque on augmente la viscosité du polymère déposé.

Nous avons donc trouvé une autre solution pour créer des couches plus épaisses : nous avons superposé plusieurs couches d'épaisseur micronique. Pour ce faire, nous avons toujours appliqué le même protocole plusieurs fois d'affilée. La principale contrainte qui est apparue concernait la couche inférieure. Elle devait être exempte de tout défaut sinon, lors de l'étalement de la couche suivante, cela se propageait à toute la plaquette. De cette manière, nous avons pu empiler jusqu'à quatre couches de l'ordre d'un micron chacune.

La figure III-21 montre la photo de deux couches empilées ainsi que le profil correspondant.

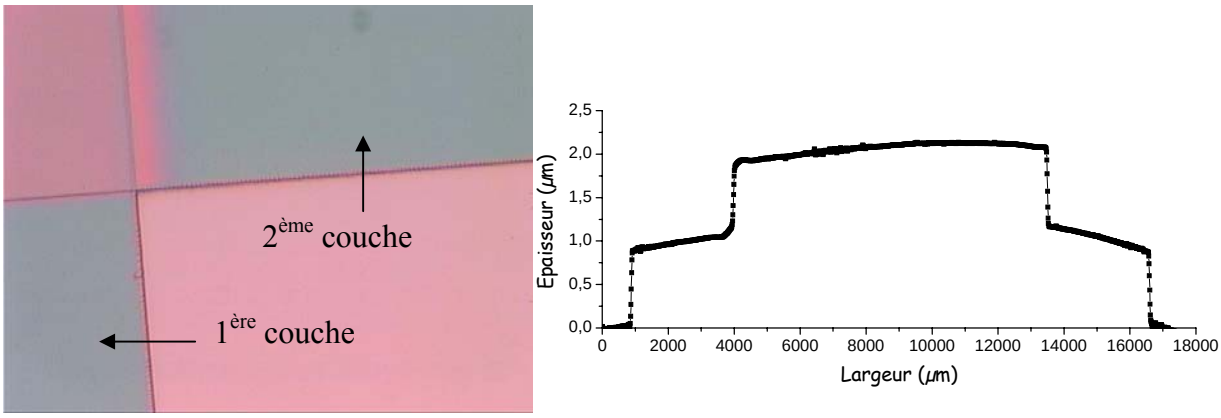


Fig III- 21 : Détail de l'empilement de deux couches de PVA et profil correspondant

Grâce à ce profil, nous pouvons constater que les deux couches déposées, indépendamment l'une de l'autre ont bien un micron d'épaisseur chacune. La légère pente observée sur la droite du profil est due au recouvrement des deux couches et à la marche que forme la couche initiale. Nous n'avons pas rencontré de problème d'adhérence entre les deux couches de polymère. Pour aller plus loin, nous avons créé de cette manière un dépôt constitué de quatre couches superposées de PVA comme en atteste la figure III-22, que ce soit avec les petits ou les grands motifs.

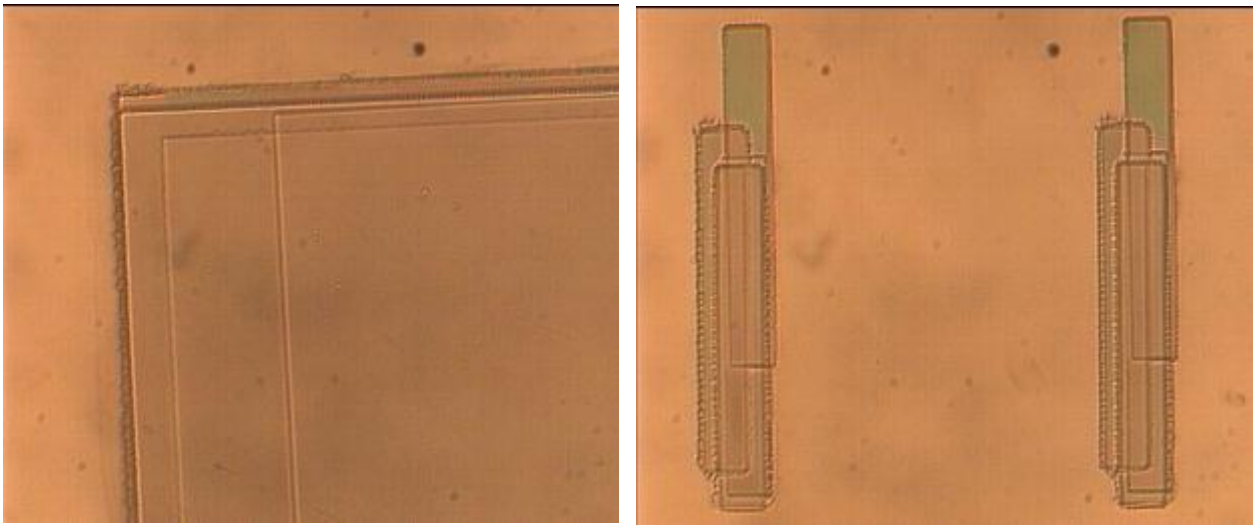


Fig III- 22 : Empilement de quatre couches de polymères

L'application de ce procédé multicouche devrait permettre de palier le problème relatif à l'obtention de couches épaisses. De plus, cela laisse entrevoir une possibilité dans le dépôt de couches possédant plusieurs types de fonctions sensibles ou encore, cela pourrait permettre de protéger une couche contenant un élément particulièrement fragile.

III.2.6 Création de couches enzymatiques

Après avoir développé le protocole de dépôt du PVA par enduction à la tournette et réticulation sous rayonnement ultraviolet, nous avons inséré dans cette solution des enzymes, tout comme cela a été fait pour le dépôt à la micropipette.

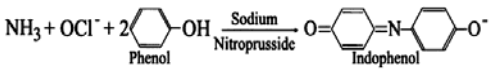
Afin de pouvoir effectuer une comparaison avec les expérimentations précédentes, nous avons également utilisé de l'uréase pour créer ces couches enzymatiques. Mais nous avons testé en parallèle plusieurs solutions pour la dilution des enzymes. En effet, nous avons réalisé trois milieux différents, mais relativement simples toujours afin de rester dans l'optique d'un protocole de création des couches sensibles compatible avec les microtechnologies. Nous avons utilisé de l'eau dé ionisée directement accessible dans la centrale de technologie, une solution saline de NaCl à 9 $g.L^{-1}$ (eau physiologique) et enfin, un tampon phosphate classique à pH 7. Ces deux dernières solutions ont été choisies pour pouvoir effectuer une comparaison avec les travaux effectués par Mme Nicole Jaffrezic-Renault sur les microgouttes[7]. Nous avons également travaillé sur la quantité d'enzymes à incorporer pour avoir une sensibilité maximale au sein du plot de PVA. Nous avons aussi étudié le comportement de dépôts constitués de 1 % et 3% en masse d'enzymes. Le protocole de dépôt du polymère n'a pas été modifié malgré l'insertion d'entités biologiques. Il avait été développé pour prendre en compte les contraintes que cela peut représenter.

III.2.6.1 Principe de l'étude de l'activité enzymatique

L'étape suivante, pour nous, était de nous assurer de la qualité de la couche et surtout de l'existence d'une activité enzymatique dans le dépôt immédiatement après et au cours des jours et de semaines qui suivent la réalisation du motif. Pour cela, nous avons effectué des dosages de l'activité enzymatique grâce à un principe basé sur celui de l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay) directement sur les motifs de 1 cm² préalablement décrits. L'intégralité de ces mesures a été réalisée avec Mme Marie Ange Teste, au sein de l'équipe Physiologie Moléculaire Microbienne des Eucaryotes dirigée par le professeur Jean Marie François au Centre de Bioingénerie Gilbert Durand de l'INSA de Toulouse.

En fait, pour estimer l'activité de l'uréase au sein du PVA, nous avons mesuré la concentration en ammoniaque, issue de l'hydrolyse de l'urée en présence d'uréase, après quelques minutes de contact entre le plot de PVA contenant l'uréase et une solution d'urée de concentration connue. Ainsi, suivant les équations 32 et 33, en utilisant une solution alcaline d'hypochlorite de sodium et du phénol en présence d'un catalyseur (nitroprusside de sodium), le produit final est un indophénol, que l'on va pouvoir quantifier par l'intermédiaire d'une mesure optique.

$$CO(NH_2)_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{urease}} 2NH_3 + H_2CO_3 \qquad \textit{Eq. 32}$$



Eq. 33

La concentration en ammoniaque est directement proportionnelle à l'absorbance de l'indophénol mesurée à 570 nm. L'activité enzymatique est alors calculée en fonction du temps de réaction, i.e, le temps de contact entre la solution d'urée et le plot de résine enzymatique.

Concrètement, la solution d'urée est déposée sur chaque plot à l'aide d'une micropipette et le substrat de silicium était stocké à 37°C durant le temps de la réaction. Les mesures ont été effectuées, à chaque fois, à trois temps de réaction différents : 1, 5 et 10 minutes. Le protocole de préparation des diverses solutions et des différentes manipulations est donné en annexe. Pour chaque série de mesures, nous avons tracé une courbe étalon permettant de relier la densité optique (DO) lue pour une concentration en ammoniaque. Pour cela, nous avons réalisé la réaction décrite par l'équation 33 avec trois concentrations en NH_3 : 1, 5 et 10 millimolaires. Une courbe type est donnée sur la figure III-23.

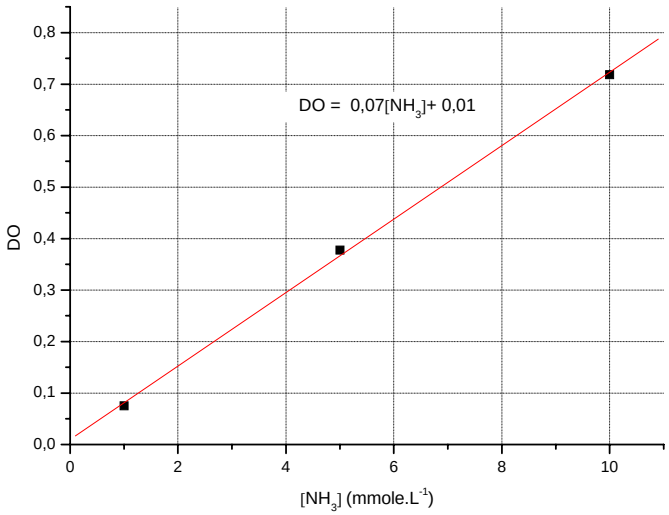


Fig III- 23 : Courbe étalon DO / [NH_3] réalisée pour chaque série de mesures

Grâce à cette courbe, nous pouvons évaluer la production d'ammoniaque des plots en fonction du temps et remonter ainsi à l'activité enzymatique du plot. Nous avons, bien entendu, réalisé pour chaque mesure un test à blanc, sans enzyme, pour pouvoir nous affranchir de l'effet que pourrait avoir le PVA sur la réaction décrite par l'équation 32 puisque celle-ci a lieu directement sur le polymère.

Après avoir tracé cette courbe, nous réalisons la mesure de l'activité enzymatique proprement dite. Pour cela, nous déposons une solution d'uréase, de concentration connue et fixe (2 mmol.L^{-1}) sur le plot de résine. Expérimentalement, la quantité de solution déposée a été évaluée à 70 µL pour obtenir un recouvrement maximal du motif. Nous effectuons trois prélèvements : à 1, 5 et 10 min. Après avoir suivi le protocole conduisant à la réaction décrite par l'équation 33, nous obtenons les mesures de densité optique. Sachant que cette DO est proportionnellement reliée à la concentration en ammoniaque (cf. figure III-23), nous pouvons écrire :

$$DO_{t_2} - DO_{t_1} = \Delta DO = \alpha([NH_3]_{t_2} - [NH_3]_{t_1}] = \alpha\Delta[NH_3] \qquad \textit{Eq. 34}$$

Où α représente le coefficient de proportionnalité entre la DO et $[NH_3]$ (en mmol.L^{-1}) et t_1 et t_2 sont les temps de réaction en minutes. Ainsi, nous pouvons maintenant raisonner en nombre de moles d'ammoniaque produites afin de pouvoir exprimer l'activité de l'uréase :

$$\Delta n_{NH_3} = \frac{\Delta DO}{\alpha}.10^{-3}.70.10^{-6}\,\text{mole} = \frac{70\Delta DO}{\alpha}.10^{-3}\,\text{micromole} \qquad \textit{Eq. 35}$$

Où Δn_{NH_3} représente la quantité de moles de NH_3 créées pendant l'intervalle de temps (t_2–t_1) dans le volume déposé sur le motif, soit 70 µL.

Ainsi, sachant que l'activité de l'uréase, en unité internationale, peut être définie comme étant le nombre de µmoles de NH3 produites par minute dans les conditions normales de pression et de température, nous pouvons écrire que l'activité A du plot de résine sera donnée par :

$$A = \frac{70\Delta DO}{\alpha(t_2 - t_1)}.10^{-3}\,U = \frac{70\Delta DO}{\alpha(t_2 - t_1)}\,mU \qquad \textit{Eq. 36}$$

En fonction des données du fournisseur chez qui nous avons acheté l'uréase, (EC.3.5.1.5 type III chez SIGMA, 15 000 à 50 000 unités par gramme de solide), nous avons pu évaluer l'activité théorique du plot de résine. En effet, en considérant que le volume du plot est de 10^{-10} m^3 (1 cm x 1 cm x 1 µm) soit 0,1 µL et, sachant que la masse volumique du PVA dilué à 50 % avec de l'eau est comparable à la masse volumique de l'eau, la quantité d'enzymes contenue dans le plot est en théorie, en fonction du pourcentage massique :

Pour 1 % d'enzymes en masse	10^{-6} g soit de 15 à 50 mU par plot
Pour 3 % d'enzymes en masse	3.10^{-6} g soit de 45 à 150 mU par plot

Sachant que l'intégralité du flacon (soit 100 000 unités) que nous avons reçu pesait 3,4 g, nous pouvons en conclure que les activités théoriques des plots de résine enzymatique déposés suivant le protocole établi était :

Pour 1 % d'enzymes en masse ≈ 30 mU par plot
Pour 3 % d'enzymes en masse ≈ 90 mU par plot

III.2.6.2 Résultats de l'étude de l'activité enzymatique

Nous avons mesuré l'activité de l'uréase au sein des plots de PVA pendant plus d'un mois. Durant cet intervalle de temps, les plaquettes supportant les dépôts ont été stockées à l'abri de la lumière et à 4°C. Les mesures ont donc été réalisées pour les deux concentrations massiques de 1% et 3% d'enzymes par gramme de résine et pour des solutions enzymatiques différentes : eau, eau physiologique et tampon phosphate à pH 7.

Les dépôts utilisant de l'eau physiologique comme milieu enzymatique ont immédiatement étés mis de coté puisque l'activité relevée au cours du temps a été nulle dès le départ. Ce résultat, comparé à celui obtenu par Mme Jaffrezic (figure III-12) tend à démontrer l'importance de la Sérum Albumine Bovine (BSA) dans la stabilisation des enzymes dans un milieu salin. En effet, les mesures effectuées montrent que les membranes composées de NaCl et de BSA sont sensibles à l'uréase et possèdent donc une activité. Or, ce résultat n'est pas retrouvé pour notre solution saline (NaCl 9 $g.L^{-1}$) sans ajout de BSA. Nous pouvons donc penser que cette protéine est très importante dans le maintien de l'activité enzymatique dans un milieu salin, même au sein du plot de PVA.

Par contre, nous n'avons pas constaté cette nécessité dans les cas où les milieux de dilution étaient composés d'eau ou de tampon phosphate. En effet, nous avons pu observer des comportements très variables suivant les quantités d'enzymes insérées.

Comme le montre clairement la figure III-24, l'activité est mieux conservée dans les plots contenant originellement 3 % d'enzymes en masse. Ceci dit, augmenter de façon trop importante la quantité d'enzyme pourrait peut être, à terme, favoriser un phénomène d'inhibition.

Il apparaît également une différence flagrante en fonction du milieu de dilution des enzymes. En effet, nous retrouvons des valeurs d'activités proches des valeurs théoriques calculées précédemment uniquement pour le milieu tamponné et dans le cas d'une solution à 3%. On peut s'apercevoir que l'activité des solutions préparées avec le milieu tamponnée est toujours plus élevée que celles préparée avec l'eau. On ne peut pas voir ici un effet du tampon sur le système de mesure mis en place puisque pour chaque test nous avons réalisé un « essai à blanc » qui outre l'influence du PVA, nous a également permis de nous affranchir de

l'influence des milieux utilisés. Donc, nous pouvons attribuer la différence de comportement des dépôts à l'affinité des enzymes pour le milieu.

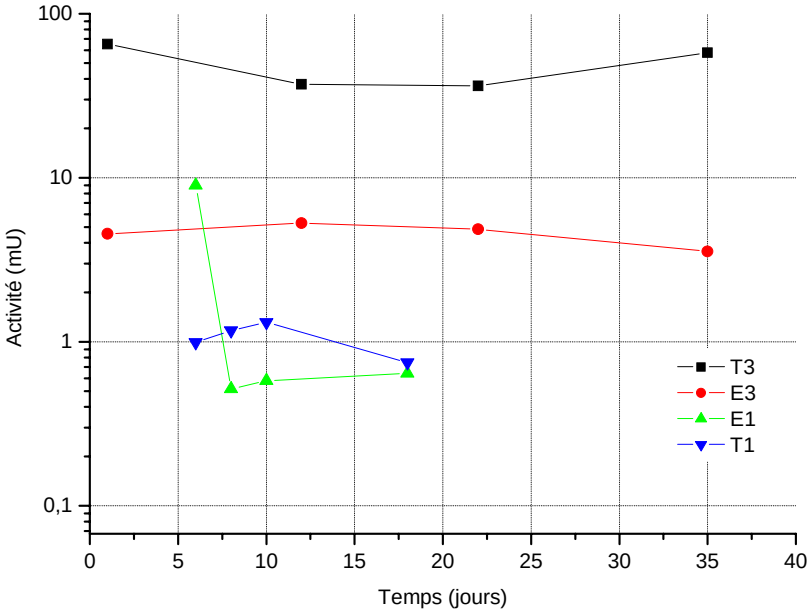


Fig III- 24 : Durée de vie des membranes enzymatiques, T : milieu enzymatique initial : tampon phosphate, E : milieu enzymatique initial : eau dé-ionisée, 1 et 3 : Concentration à 1 et 3 % en masse d'uréase dans la membrane

Enfin, dans les deux cas où la concentration enzymatique est de 3 %, il est très important de noter la conservation de l'activité sur une durée de plus d'un mois. Cette constatation permet finalement de valider ce procédé de dépôt et surtout d'envisager la possibilité de créer des capteurs équipés de ce type de couche enzymatique.

III.2.7 Application du protocole à la réalisation de capteurs enzymatiques

Pour cela, en parallèle de ces études de durée de vie de ces couches enzymatiques, des dépôts de ce type ont été réalisés suivant ce protocole sur les ISFETs conçus et réalisés dans le cadre de la thèse de Mr Sant.

Un dépôt de PVA a été réalisé sur la grille sensible d'un ISFET dans le cadre d'un procédé de fabrication collective. Les composants utilisés présentaient une particularité. Ils alliaient sur la même puce un ISFET, dont la grille a été recouverte de résine sensible à l'élément à détecter, et un ReFET (Reference Field Effect Transistor), dont la grille était elle, insensible à ce même élément. Cette structure, dont le principe a déjà été décrit dans le second chapitre de ce mémoire est présentée sur la figure III-25. On peut y voir le motif de PVA recouvrant la grille de l'ISFET.

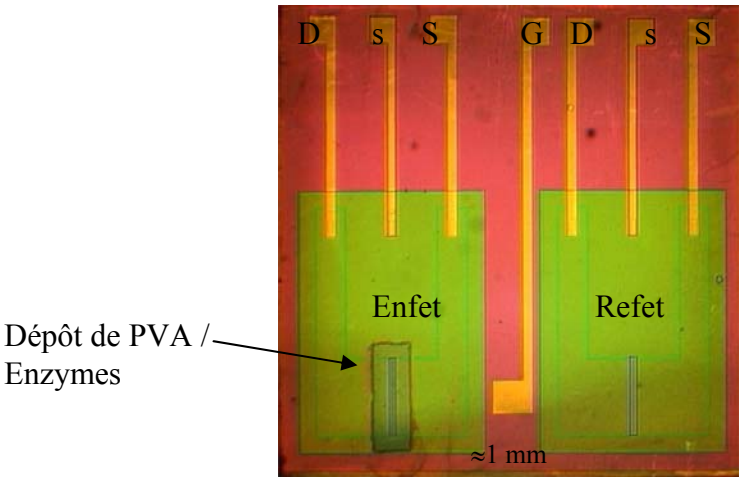


Fig III- 25 : Dépôt de PVA enzymatique sur la grille de l'ISFET réalisé grâce au protocole mis en place

L'application finale de ces capteurs visant un suivi en continu de la quantité d'urée et de créatinine dans le sang au cours d'une séance d'hémodialyse, deux types de dépôts ont été testés. Pour le premier, nous avons utilisé de l'uréase. Il était ainsi semblable à celui étudié précédemment pour la durée de vie. Pour le second type de dépôt, nous avons inséré de la créatinine déiminase (E.C 3.5.4.21) qui fait également partie des aminohydrolases. En effet suivant la réaction donnée par l'équation 37, de l'ammoniaque va être produit ce qui va donner lieu à une variation de pH détectable par le pH-ISFET.

$$\text{Créatinine} + H_20 \rightarrow \text{N-méthylhydantoïne} + NH_3 \qquad \textit{Eq. 37}$$

Une fois ces dépôts effectués, de la même manière que pour les couches déposées avec la micro-pipette, des essais ont eu lieu avec des solutions pré-calibrées d'urée et de créatinine. Les mesures ont été effectuées dans un milieu très légèrement tamponné afin d'éviter une diffusion trop importante et trop rapide des charges vers les capteurs.

En ce qui concerne les mesures d'urée, elles ont tout d'abord été effectuées dans le même tampon phosphate que celui utilisé pour la préparation du milieu enzymatique. Mais la nécessité de mesurer des concentrations en urée très élevées nous a confronté à un problème de saturation de l'enzyme. Pour contourner cette difficulté, nous avons utilisé une enzyme génétiquement modifiée, de très forte activité qui nous a permis de balayer des gammes plus étendues (de 5 à 50 $mmol.L^{-1}$). Le même type d'étude a été effectué avec la créatinine déiminase.

Les mesures présentées sur la figure III-26 mettent en évidence une diminution de la tension et donc, un accroissement du pH, proportionnel au logarithme de la concentration en urée et en créatinine. Ces résultats, en accord avec les mesures effectuées par l'IFOS[12] valident le bon comportement de nos biocapteurs et la viabilité des enzymes au sein du polymère.

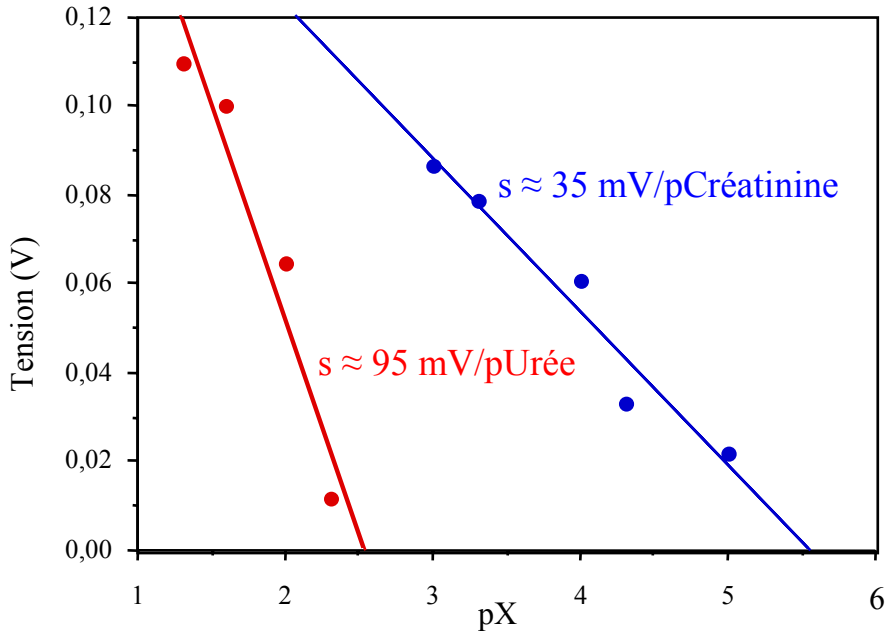


Fig III- 26 : Courbes de détection de l'urée et de lé créatinine grâce aux capteur pH-ISFET associés à un dépôt de PVA

En comparant les deux réactions mises en jeu lors de la dissociation de l'urée et de la créatinine respectivement, on s'aperçoit que dans le premier cas, il y a deux molécules d'ammoniaque libérées pour une molécule d'urée dissociée tandis que dans le second cas, un seule molécule de NH_3 est libérée par molécule de créatinine hydrolysée. Cette constatation peut expliquer la différence de sensibilité observée entre la détection de l'urée et celle de la créatinine.

Ainsi, nous avons démontré dans ce chapitre la possibilité de fabriquer des biocapteurs, efficaces, pour la détection de l'urée et de la créatinine en s'appuyant les techniques classiques de microélectronique.

En effet, en combinant et en adaptant les techniques de photolithographies, nous avons pu fabriquer des couches polymériques enzymatiques qui ont été déposées dur la grille sensible d'un pH-ISFET pour permettre la détection d'analytes au sein d'un fluide biologique. La fabrication de ces couches a été réalisée de façon collective, suivant un procédé technologique qui s'appuie principalement sur le dépôt à la tournette et une étape de photolithographie. Nous avons pu déposer des motifs de taille et d'épaisseur variables de façon très reproductible. Nous avons également montré qu'il était possible de créer des dépôts

multi-couches qui pourraient permettre de créer soit des systèmes de protection soit des systèmes de mullti-détection.

Ce procédé a finalement été appliqué à la création de couches enzymatiques avec l'insertion au sein du réseau polymérique d'uréase. L'étude, qui a également prouvé que la durée de vie de ces couches enzymatiques était supérieure à 30 jours dans des conditions de stockage adéquates, a démontré les potentialités du polyvinyl alcool en tant que matrice de support de matériel biologique. En effet, les mesures réalisées grâce aux capteurs pH-ISFETs ont révélé une bonne sensibilité aux deux éléments détectés, et permettent d'envisager le développement à faible coût de biocapteurs adaptés aux analyses biomédicales et biochimiques.

Bibliographie

[1] W. Sant
Développement des micro-capteurs chimiques CHEMFETs pour des applications à l'hémodialyse, Thèse de doctorat de l'UPS de Toulouse, 2004

[2] Bindu Nair
Final report on the safety assessment of polyvinyl alcohol, Int J Toxicol, Volume 17, Suppl. 5, Pages 67-92

[3] Mu-Rong Yang and Ko-Shao Chen
Humidity sensors using polyvinyl alcohol mixed with electrolytes, Sens. Actuators B, Volume 49, Issue 3, Pages 240-247

[4] Yongcheng Liu, Jianghong Qian, Xiaolin Fu, Haiying Liu, Jiaqi Deng and Tongyin Yu Immobilization of horseradish peroxidase onto a composite membrane of regenerated silk fibroin and polyvinyl alcohol and its application to a new methylene blue-mediating sensor for hydrogen peroxide, Enzyme Microb Tech, Volume 21, Issue 3, Pages 154-159

[5] Merima Cajlakovic, Aleksandra Lobnik and Tobias Werner Stability of new optical pH sensing material based on cross-linked poly(vinyl alcohol) copolymer, Anal Chim Acta, Volume 455, Issue 2, Pages 207-213

[6] P. Dutta, S. Biswas, M. Ghosh, S. K. De and S. Chatterjee
The dc and ac conductivity of polyaniline–polyvinyl alcohol blends, Synthetic Met, Volume 122, Issue 2, Pages 455-461

[7] Silvana Andreescu, Thierry Noguer, Vasile Magearu and Jean-Louis Marty
Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents, Talanta, Volume 57, Issue 1, 22 April 2002, Pages 169-176

[8] N. Jaffrezic-Renault, A. Senillou, C. Martelet, K. Wan and J. M. Chovelon
ISFET microsensors for the detection of pollutants in liquid media, Sens. Actuators B, Volume 59, Issues 2-3, 19 October 1999, Pages 154-164

[9] N. Jaffrezic-Renault , A. Soldatkin, C. Martelet, P. Temple-Boyer, W. Sant, M.L. Pourciel, P. Montoriol, A. Montiel-Costes
Tailoring Enzymatic Membranes for ENFETs for Dialysis Monitoring. Transducers 2003, Boston Juin 2003

[10] M. L. Pourciel, J. Launay, W. Sant, V. Conédéra, A. Martinez and P. Temple-Boyer Development of photo-polymerisable polyvinyl alcohol for biotechnological applications, Sens. Actuators B, Volume 94 (2003), Issue 3, Pages 330-336

[11] D. Meyerhofer
Characteristics of resist films produced by spinning, J. Appl. Phys., Volume 49 (1978), Pages 3993-3997

[12] J. V. de Melo, A. P. Soldatkin, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault and S. Cosnier
Use of competitive inhibition for driving sensitivity and dynamic range of urea ENFETs, Biosens Bioelectron, Volume 18 (2003), Issue 4, Pages 345-351

Conclusion Générale

L'étude présentée dans ce mémoire a consisté en l'étude théorique, la conception, la réalisation et la validation de deux catégories de biocapteurs basés sur la technologie du microcapteur chimique à effet de champ ChemFET. Nous avons démontré la potentialité de deux types mesures, directes ou indirectes, s'appuyant toutes les deux sur le suivi des variations de pH induites par une réaction biochimique ou biologique.

La connaissance de l'état de l'art nous a guidé dans les différents choix que nous avons été amenés à faire tant dans le dépôt des couches sensibles que dans la conception du capteur lui-même. Il existe différentes façons d'immobiliser des éléments sur une surface. Cela peut se faire en impliquant uniquement l'élément sensible et la surface ou bien, il est possible de faire appel à un intermédiaire. Dans ce second cas, il semble que les composés chimiques de type polymérique soient particulièrement adaptés.

Ainsi, les propriétés des microcapteurs chimiques pH-ISFET conjuguées à celles des polymères, utilisés en tant qu'éléments d'encapsulation ou de détection, nous ont dicté les axes principaux de nos recherche:

L'utilisation de poly diméthyl siloxane (PDMS) pour la réalisation de micro-cuves a ainsi montré l'importance et l'intérêt que peut représenter la réduction des volumes dans le processus de détection biologique. En intégrant ces micro-cuves directement sur la grille sensible du capteur pH-ISFET, nous avons montré qu'il est possible d'effectuer un suivi de l'activité bactérienne en réduisant de manière très significative les délais de détection par rapport aux techniques classiques développées en analyses médicales. La démonstration en a été faite au travers du suivi de la métabolisation de sucres par la bactérie *Lactobacillus Acidophilus.*

Nous avons également étudié l'utilisation de l'alcool polyvinylique (Polyvinyl Alcool PVA) en tant que matrice d'immobilisation d'enzymes. Pour cela, nous avons mis au point un protocole complet de dépôt de ce polymère sur la grille sensible, en nitrure des capteurs. Ce protocole, totalement compatible avec les micro-technologies, fait appel aux techniques habituelles de dépôt à la tournette et de photolithographie. De plus, il permet de contrôler tous les paramètres technologiques et ainsi, les caractéristiques (épaisseur, surface) du dépôt de polymère. L'insertion d'enzymes, éléments biologiques, a été également étudiée et optimisée, toujours de façon compatible avec la micro-électronique. L'étude de la durée de vie des enzymes au sein du plot de polyvinyl alcool a démontré la conservation de l'activité enzymatique pendant plus d'un mois autorisant ainsi un stockage des capteurs dans des conditions adéquates mais non contraignantes. L'application de ce protocole a été validée dans le cadre de la détection de l'urée. L'adaptation de pH-ISFETS pour la détection enzymatique a été démontrée théoriquement à partir des équations chimiques liées au fonctionnement de l'uréase ainsi qu'expérimentalement au travers de la réalisation, au LAAS-CNRS de microcapteurs chimiques à effet de champ (ENFETs) pour la détection de l'urée.

Au travers de nos recherches, nous avons démontré les potentialités des capteurs chimiques à effet de champ pour les détections biochimiques et biologiques. Si le développement de couches enzymatiques en PVA et la réalisation d'ENFETs a été démontrée pour l'urée et la créatinine, le principe est également applicable à bon nombres d'enzymes impliquées dans une réaction acido-basique. Dans ce cadre, la production d'ammoniaque résultant de l'action des amino-hydrolases est particulièrement intéressante et peut être exploitée pour diverses détections biochimiques.

Néanmoins, le développement de capteurs ENFETs va nécessiter une compréhension globale de leur principe de détection. Le modèle mis en place au cours de nos travaux devra ainsi être amélioré en tenant compte des différents mécanismes physico-chimiques en action : réactions enzymatique et acido-basiques, diffusion des espèces chimiques en solution, déplacement du fluide en régime dynamique.

Nous devrons ainsi aboutir à la mise en place d'un modèle très complet du principe de détection qui permettra la compréhension et surtout, l'optimisation des microcapteurs chimiques à effet de champ enzymatiques ENFETs. A l'heure actuelle, un transfert industriel est en cours concernant l'utilisation de tels capteurs au cours de séance d'hémodialyse afin d'assurer un suivi en continu et en temps réel des taux d'urée et de créatinine du patient hémodialysé. Il est également possible d'envisager l'application de ces capteurs enzymatiques à d'autres domaines et surtout, en utilisant d'autres propriétés des enzymes comme par exemple leur faculté à être inhibée en présence de certains éléments (comme les métaux lourds).

L'amélioration de la technique de détection basée sur le principe des micro-volumes repose, pour le moment, sur la mise en place d'un système de dépôt des cuves permettant d'obtenir une bonne reproductibilité de positionnement. Cette avancée devra permettre d'une part, d'obtenir une nette augmentation du rendement de fabrication des capteurs et d'autre part, de faciliter la prise de mesure.

La poursuite de l'étude consistera à développer et augmenter le panel de tests effectués sur la bactérie *Lactobacillus Acidophilus* afin de pouvoir déterminer sa signature propre de la même façon que dans les techniques classiquement utilisées. Ce travail pourra également être traité au sein de notre laboratoire. En effet, afin de répondre aux normes d'hygiène et de sécurité réglementant les conditions de travail au LAAS-CNRS, nous ne pouvions uniquement travailler qu'avec des bactéries non pathogènes.

Néanmoins, pour l'étape suivante, l'étude devra être réalisée dans des structures adaptées telles que les hôpitaux ou les laboratoires d'analyses spécialisés. En effet, l'intérêt de ce type de micro-capteur et surtout du gain de temps engendré, apparaît clairement dans le processus d'identification de bactéries pathogènes du type salmonellose ou légionellose pour ne citer que les plus médiatiques.

Enfin, dans le cadre des futurs développements industriels, il faut mettre en place des protocoles de mesure adaptés à une galerie d'ensembles microcapteurs / micro-cuves. Cela sous-entend la réalisation de systèmes de « mini-fluidique » regroupant le contrôle des diverses solutions nécessaires (bactéries, métabolites, référence), l'interface de mesure des capteurs et le traitement des données recueillies. De tels systèmes devraient permettre la mise au point de techniques d'analyses médicales simples, fiables et rapides.

Annexes

Annexe 1 : Protocole d'utilisation d'une galerie API de type 20E

La galerie APl 20E (bioMérieux) est une version miniaturisée des tests biochimiques classiques destinés à l'identification des *Enterobacteriaceae* (bactéries Gram négatif et anaérobies facultatives) dont font partie les *Erwinia.* Ce système regroupe 23 tests biochimiques. Des substrats déshydratés sont contenus dans des microtubes. Ces substrats sont mis en solution grâce à l'addition d'une suspension de la bactérie à identifier. À la suite d'une période d'incubation (24 heures à 30°C), permettant à la bactérie de réagir avec les substrats, les diverses réactions sont notées afin de déterminer le code d'identification composé de 7 chiffres.

Au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, le système APl 20E est utilisé pour l'identification de *Erwinia amylovora,* agent responsable de la brûlure bactérienne chez les plantes de la famille des *Rosaceae.*

Pour *Erwinia amylovora,* les principaux codes d'identification obtenus avec APl 20E sont 0005522 et 0007522.

A- INOCULATION D'UNE GALERIE APl 20E

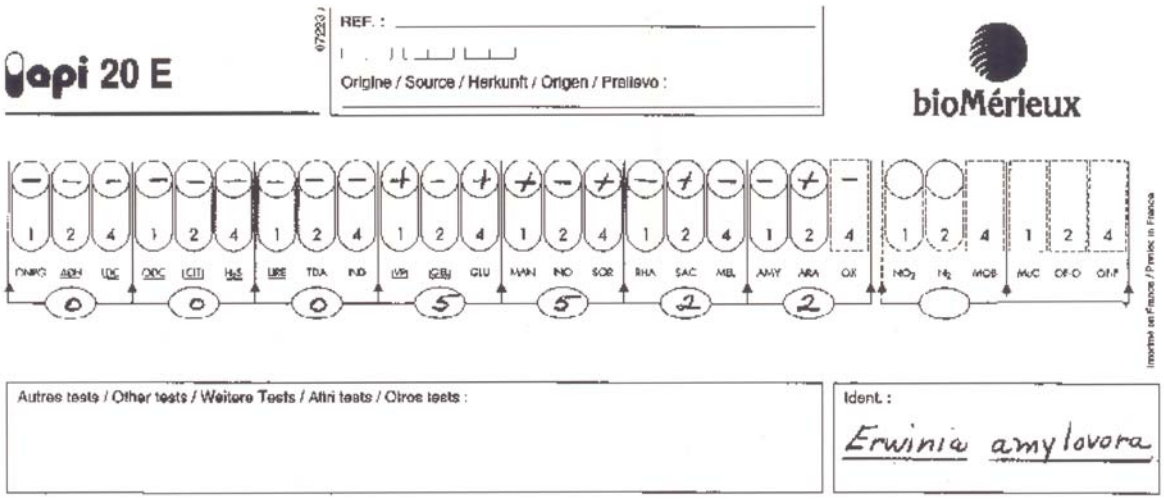
- A partir d'une culture pure de 18 à 24 heures, faire une suspension bactérienne ayant une concentration de 108 bactéries/ml (standard McFarland N° 5) dans 5 ml de saline stérile (NaCl à 0,85%) à un pH entre 5,5 et 7,0.
- Bien mélanger la suspension bactérienne au vortex 5-10 secondes.

Contrôle de qualité: La suspension bactérienne doit être utiliser dans les 15 minutes suivant sa préparation.

- Déposer soigneusement 150 µI de la suspension bactérienne dans chaque cupule de la galerie en utilisant un embout stérile.
- Ajouter de nouveau 150 µL de la suspension bactérienne aux cupules CIT, VP et GEL (total = 300 µL) par puits.
- Après l'inoculation, remplir les cupules ADH, LDC, ODC, H_2S et URE d'huile minérale.
- Ajouter de l'eau dans les supports, y déposer la galerie et mettre le couvercle.
- Placer les galeries dans une chambre humide (boîte de plastique avec couvercle contenant un papier humide) et incuber à 30°C pendant 18 à 24 heures.

B- LECTURE DES GALERIES

- Faire la lecture des galeries sous une hotte chimique.
- Consigner les réactions sur une fiche de résultats comme celle-ci :



Légende:

ONPG	-	Détermination de la présence de l'enzyme β-galactosidase
ADH	-	Transformation de l'arginine (acide aminé) par l'arginine déshydrolase
LDC	-	Transformation de la lysine (acide aminé) par la lysine décarboxylase
ODC	-	Transformation de l'ornithine (acide aminé) par l'ornithine décarboxylase
CIT	-	Utilisation du citrate comme seule source de carbone
H2S	-	Production du sulfure d'hydrogène (H_2S) à partir du thiosulfate (S_2O_3)
URE	-	Libération d'ammoniac à partir de l'urée grâce à l'uréase
TDA	-	Formation de l'acide indolepyruvique à partir du tryptophane (acide aminé) grâce à la tryptophane désaminase
IND	-	Formation d'indole à partir du tryptophane (acide aminé)
VP	-	Formation d'acétoïne à partir du piruvate de sodium
GEL	-	Liquéfaction de la gélatine (protéine)

GLU (glucose), MAN (mammitol), INO (inositol), SOR (sorbitol), RHA (rhamnose), SAC (sucrose), MEL (mélobiose), AMY (amygdaline), ARA (L+arabinose) - formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone.

Contrôle de qualité: Lire et consigner toutes les réactions avant l'addition des réactifs pour la réduction des nitrates et de l'indole car ces réactions dégagent des produits gazeux qui peuvent interférer avec les autres épreuves de la galerie. Ne pas replacer le couvercle en plastique après l'addition des réactifs.

- La lecture des galeries se fait généralement au bas de chaque cupule sauf CIT, IND.
- Lire en suivant l'ordre ci-dessous (consulter le tableau des résultats annexé à cette technique) :
  - VP :
    - ✓ Ajouter 1 goutte d'hydroxyde de potassium (40%)
    - ✓ Ajouter 1 goutte d'alpha-naphtol (6%)
    - ✓ Attendre 10 minutes

  - Pendant ce temps, faire la lecture des autres cupules sauf TDA et IND en inscrivant la couleur et la réaction (+ ou -) sur une fiche de résultats.
  - Lire la réaction du VP
  - GLU - Avant l'addition des réactifs, observer s'il y a présence de bulles (+ ou -) qui indiquent une réduction du nitrate à l'état gazeux (N_2).
    - ✓ Ajouter 2 gouttes d'acide sulfanilique (0,8%)
    - ✓ Ajouter 2 gouttes de NN-dimethyl-alpha-naphthylamine (0,05%)
    - ✓ Attendre 2-3 minutes

  - Pendant ce temps, faire les réactions TDA et IND.
  - TDA - Ajouter 1 goutte de chlorure ferrique (10%), lire la réaction immédiatement.
  - IND - Ajouter 1 goutte du réactif de Kovac, lire la réaction immédiatement.

  - Lire la réaction GLU. Si la réaction est négative, ajouter de la poudre de zinc. Attendre 10 minutes et faire la lecture de cette dernière réaction.

Exemple d'une galerie du système APl 20E avant l'addition des réactifs

TABLEAU DES RESULTATS - METHODE DE 18 A 24 HEURES

TUBE	RÉACTIONS		COMMENTAIRES
	POSITIVE	NÉGATIVE	
ONPG	Jaune	Incolore	Une teinte jaune pâle est souvent obtenue, la considérer comme une réaction négative.
ADH	Rouge ou orange	Jaune	
LDC	Rouge ou orange	Jaune	
ODC	Rouge ou orange	Jaune	
CIT	Turquoise ou bleu foncé	Vert pâle ou jaune	La Lecture se fait dans la partie supérieure de la cupule (en aérobie)
H_2S	Dépôt noir	Aucun dépôt noir	
URE	Rouge ou orange	Jaune	
TDA	Brun-rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte de chlorure de fer à 10%. Lire immédiatement la réaction.
IND	Anneau rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte du réactif de Kovac. Lire la réaction après 2 minutes.
VP	Rose foncé ou rouge	Incolore ou rose pâle	Ajouter 1 goutte de KOH à 40% puis 1 goutte d'alpha-naphthol à 6%. Lire la réaction après 10 minutes.
GEL	Diffusion du pigment	Aucune diffusion, incolore	La répartition des particules, solides à travers la cupule doit être considérée comme une réaction négative.

TUBE	RÉACTIONS		COMMENTAIRES
	POSITIVE	NÉGATIVE	
GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA	Jaune	Bleu ou bleu-vert	La fermentation des sucres commence dans la partie la plus anaérobique de la cupule (partie inférieure). Il faut lire ces réactions à partir de la base de la cupule vers le haut. Une couleur jaune au fond indique une réaction positive.
GLU	N_2 gazeux (Présence de bulles)		Avant d'additionner les réactifs, observer la présence de bulles dans la cupule GLU. Ceci indiquerait la réduction des nitrates en gaz (N_2).
Réduction des nitrates	<u>Présence de NO_2 (rouge)</u>	Jaune	Ajouter 2 gouttes d'acide sulfanilique à *0.8%* et 2 gouttes de NN-dimethyl-alphanaphtylamine à 0,5%. Lire la réaction après 2 ou 3 minutes.
	Présence de bulles et coloration jaune (après l'ajout du réactif de zinc)	Orange (après l'ajout du réactif de zinc)	Confirmer si la réaction est négative en ajoutant de la poudre de zinc.). Lire la réaction après 3 ou 4 minutes.

Annexe 2 : Programme en Matlab® pour le calcul du pH et des différentes concentrations lors de la dissociation de l'urée

```
clear all
close all
format short e

tmax=input('tmax (s) = ')
t=0:1:tmax

A=input('Activité uréase (U) = ')
V=input('volume essai (L) = ')
pH0=input('pH de la solution tampon = ')

Ct=10.^-pH0-10.^-(14-pH0)
K1=5.62*10.^-10;
K2=4.3*10.^-7;
K3=5.61*10.^-11;
Ke=10.^-14;

for i=1:1:((tmax)+1)
   format short e
   Cd(i)=(A*t(i)/(120*V));
end
for i=1:1:((tmax)+1)
   C5=1;
   C4=2*Cd(i)+K1+K2-Ct;
   C3=K2*(Cd(i)+K1+K3)-Ct*(K1+K2)-Ke;
   C2=K1*K2*(K3-Cd(i))-Ct*K2*(K1+K3)-Ke*(K1+K2);
   C1=-K1*K2*K3*(Ct+2*Cd(i))-Ke*K2*(K1+K3);
   C0=-Ke*K1*K2*K3;
   p=[C5 C4 C3 C2 C1 C0];
   r=roots(p);

   for j=1:5
      k(j)=imag(r(j));
   end
   for j=1:5
      if k(j)==0
         b=r(j);
         if b>0
            h(i)=b;
         end
      end
   end
end

pH=-log10(h);
for i=1:((tmax)+1)
```

```
NH3(i)=(2*Cd(i)*K1)/(K1+h(i));
NH4(i)=(2*Cd(i)*h(i))/(K1+h(i));
H2CO3(i)=(Cd(i)*h(i)^2)/(h(i)^2+K2*h(i)+K3*K2);
HCO3(i)=(Cd(i)*K2*h(i))/(h(i)^2+K2*h(i)+K3*K2);
CO3(i)=(Cd(i)*K2*K3)/(h(i)^2+K2*h(i)+K3*K2);
pNH3=-log10(NH3);
pNH4=-log10(NH4);
pH2CO3=-log10(H2CO3);
pHCO3=-log10(HCO3);
pCO3=-log10(CO3);
end

subplot(1,2,1), plot(t,pH)
xlabel('Temps (s)')
ylabel('pH')
grid
subplot(1,2,2), plot(t,pNH3,'m-',t,pNH4,'k-',t,pH2CO3,'r-',t,pHCO3,'--',t,pCO3,':')
xlabel('Temps (s)')
ylabel('pX')
grid
legend('pNH3','pNH4','pH2CO3','pHCO3','pCO3');
```

Annexe 3: Protocole de mesure de l'activité enzymatique dans les plots de PVA

Réaction enzymatique :

Solution 1

10 µL urée
500 µL eau distillée

Solution 2 :

5 µL urée
250 µL uréase

Dépôt de 70 µL de solution 1 sur

Plot de PVA Blanc (B)
Plot de PVA + uréase + eau distillée
Plot de PVA + uréase + eau physiologique
Plot de PVA + uréase + Tampon Phosphate pH 7

Dépôt de 70 µL de solution 2 sur PVA Blanc (S)

Réaction à 37 °C (t variable : 1, 5 et 10 minutes)

Réaction colorimétrique

Ajout à chaque tube

140 µL Phenolnitroprusside solution (suivant protocole SIGMA)
140 µL Alkaline Hypochlorite solution
690 µL EDI

Attente 30 min

Lecture DO à 550 nm

Résumé

Les techniques d'analyse médicale nécessitent le développement, à faible coût, de capteurs chimiques fiables. Dans ce contexte, les transistors chimiques à effet de champ CHEMFETs offrent des solutions innovantes à condition d'optimiser l'interface entre microtechnologies et biotechnologies. Au cours de cette thèse, nous nous sommes attachés à développer des techniques permettant de coupler espèces biologiques et silicium. Deux approches ont été étudiées, toutes les deux basées sur l'utilisation des polymères.

La première approche a été centrée sur le développement des techniques d'encapsulation avec la réalisation de micro-cuves d'analyses en PDMS. Le suivi de l'activité bactérienne à l'aide de pH-ISFETs a finalement été démontré dans le cadre de l'étude de *Lactobacillus Acidophilus*.

La deuxième approche s'est intéressée à l'adaptation des CHEMFETs à la détection enzymatique. L'utilisation des techniques de photolithographie a ainsi permis la fabrication collective de couches enzymatiques en PVA en vue d'une détection biochimique. L'application de ce procédé à l'uréase a permis de caractériser l'évolution de l'activité enzymatique des membranes ainsi réalisées.

Mots clés : ChemFET, PDMS, micro-volumes, bactéries, enzymes, PVA, ENFET.

Summary

Medical analysis techniques field needs low cost development of reliable chemical sensors. In this context, chemical field effect transistors ChemFET provide innovating answers but this will require microtechnology/ biotechnology interface optimization. In this work, we set out to develop techniques which allow us to link biologic species and silicon material. We studied two kinds of approaches both based on polymer use.

First approach aimed improvement of encapsulation techniques with realization of PDMS analysis micro-tanks. Bacterial activity monitoring with pH-ISFET was then possible using Lactobacillus Acidophilus.

Second approach relies on ChemFET adaptation to enzymatic detection. So, classical photolithography techniques allow us to make enzymatic layers using PVA in order to realize biochemical detection. Implementation of this process to uréase led us to characterize enzymatic activity evolution in the so fabricated membranes.

Keywords : ChemFET, PDMS, micro-volumes, bacteria, enzymes, PVA, ENFET