



HAL
open science

**Conception, modélisation et réalisation de
microcapteurs pour l'analyse de la sphère buccale.
Application à la détection du glutamate**

Lyas Djeghlaf

► **To cite this version:**

Lyas Djeghlaf. Conception, modélisation et réalisation de microcapteurs pour l'analyse de la sphère buccale. Application à la détection du glutamate. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2013. Français. NNT: . tel-00822773

HAL Id: tel-00822773

<https://theses.hal.science/tel-00822773>

Submitted on 15 May 2013

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

En vue de l'obtention du

Doctorat de l'université de Toulouse

Délivré par l'Université Paul Sabatier Toulouse III

Ecole Doctorale : Génie Electrique, Electronique, Télécommunications

Discipline : Micro et Nano Systèmes

Présenté et soutenue par :

Lyas DJEGHLAF

Le vendredi 29 mars 2013

Titre :

Conception, modélisation et réalisation de microcapteurs pour l'analyse de
la sphère buccale

Application à la détection du glutamate

Directeur de thèse : M. Pierre TEMPLE-BOYER

Unité de recherche :

Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes UPR 8001

Rapporteurs :

Professeur France LE BIHAN

Professeur Khalifa AGUIR

Autres membres de jury

Professeur Alain CAZARRE Examineur

Docteur Christian SALLES Examineur

Docteur William SANT Examineur

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) du Centre National de la recherche Scientifique (CNRS) à Toulouse au sein du groupe MICrosystèmes d'Analyse (MICA).

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Raja CHATILA et Jean ARLAT, Directeurs successifs du LAAS pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je suis très reconnaissant envers Monsieur Alain CAZARRE, Professeur à l'Université de Toulouse, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie très sincèrement Monsieur Khalifa AGUIR, Professeur à l'université de Marseille et Madame France LE-BIHAN, Professeur à l'Université de Rennes, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce mémoire en acceptant d'être les rapporteurs de mes travaux.

Je remercie également Monsieur Christian SALLES, Directeur de recherche à l'INRA de Dijon et Monsieur William SANT, Chef de projet à la Société HEMODIA, 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 Pierre TEMPLE-BOYER pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bon port, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer. En tant que directeur de thèse, il s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Je souhaite ensuite remercier tous les membres de l'équipe « Capteurs chimiques en phase liquide » qui m'ont permis d'apprendre énormément durant ces quelques années : Jérôme LAUNAY, Marie-Laure POURCIEL-GOUZY, Céline CHRISTOPHE, Emilie VANHOVE, Arnaud CAZALE, Karim DIALLO.

Je tiens à remercier l'ensemble des services TEAM et 2I, en particulier Hugues GRANIER, Laurent MAZENQ, Djaffar BELHARET, Sandrine ASSIE-SOULEILLE, Laurent BOUSCAYROL, Ludovic SALVAGNAC, David COLIN, pour leur soutien et leur aide.

Je n'oublie pas, non plus notre super secrétaire, Madame Brigitte CYRILLE, pour sa générosité et la grande patience dont elle a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles,

Mes remerciements s'adressent également à mes collègues et amis du laboratoire, Ahmed, Hakim (notre Messi), Toufik (Ghoulba), Moustafa et Walid (les deux Crocos), Imad, Amine (Pepe), Hamada (Tata Khawti n7abhom), Lyamine, Mourad, Yacine, Biblal, Meziane, Nassim, Arabe, Moh skype, Atman, Aymen pour les moments agréables passés sur les terrains de foot. Je m'excuse enfin auprès de ceux que je n'ai pas cités.

Je remercie chaleureusement, ma famille, mes parents, mes frères et sœurs pour leur soutien moral depuis mon premier jour à l'école jusqu'à ce jour.

Je remercie énormément ma femme pour sa patience et son soutien durant la période de la fin de thèse.

Table des matières

Introduction générale	10
Références Bibliographiques	14

Chapitre I

I. Définition du goût	16
II. Développement de la langue artificielle ou langue électronique	18
III. Utilisation de capteurs électrochimiques pour la détection des goûts	19
III.1 Capteurs conductimétriques	19
III.1.a Présentation	19
III.1.b Mesure de la conductivité.....	20
III.1.c Applications des capteurs conductimétriques pour la détection des goûts	20
III.2 Capteurs ampérométriques	21
III.2.a Présentation des électrodes rédox	21
III.2.b Applications des capteurs ampérométriques pour la détection des goûts	24
III.2.b.1. Goût sucré	24
III.2.b.2. Goût umami (détection du glutamate)	29
III.3. Capteurs potentiométriques	31
III.3.a Présentation des électrodes rédox	31
III.3.b Électrodes de référence	32
III.3.c. Etude de l'interface Electrolyte/Isolant	34
III.3.d. Application des capteurs potentiométriques dans la détection des goûts	35
IV. Positionnement sur le développement des ChemFET	37
IV.1 Principe du fonctionnement du transistor MOSFET.....	38
IV.2. Du MOSFET à l'ISFET	39
IV.3. Etude de la structure Electrolyte/SiO ₂ /Silicium	41
IV.4. Principe de fonctionnement du pH-ChemFET	43
IV.5. Du pH-ChemFET au pH-EnFET.....	44
IV.6. Développement des EnFET.....	44
IV.6.a. Développement des capteurs potentiométriques pour la détection des goûts	45

IV.6.b. Choix de développement du glutamate-EnFET.....	50
Références Bibliographiques	52

Chapitre II

I. Conception des Masques photolithographiques	64
I.1 Description du procédé standard de photolithographie (Masques 1 à 5)	66
I.2 Description du procédé de photolithographie par Lift-Off (Masques 6 et 7)	67
II. Technologie de fabrication	68
II.1 Nettoyage du substrat.....	68
II.2 Oxydation de champ	68
II.3 Photogravure de l'oxyde de champ (Masque 1).....	69
II.4 Oxyde de pré-implantation (40nm) et Implantation du caisson P (Masque 1)	69
II.5 Recuit de diffusion	70
II.6 Implantation des anneaux de garde P ⁺ (Masque 2).....	71
II.7 Implantation des zones actives source et drain (Masque 3).....	71
II.8 Redistribution sous atmosphère oxydante (600nm).....	72
II.9 Ouverture de la grille (Masque 4)	73
II.10 Nettoyage RCA (avant oxydation de grille)	73
II.11 Oxydation de grille (50nm).....	74
II.12 Dépôt de nitrure du silicium par LPCVD (50nm)	74
II.13 Ouverture des contacts (Masque 5)	75
II.14 Métallisation tantale /platine (Masque 6)	76
II.15 Recuit de Métallisation.....	77
II.16 Métallisation Argent (Masque7)	77
II.17 Encapsulation Su8 (Masque 8).....	77
II.18 Caractérisation des Transistor MOS sous pointes	79
III. Montage des composants	81
III.1 Découpe.....	81
III.2. Report sur PCB et connectique	81
IV. Intégration de l'électrode de référence en Ag/AgCl.....	84
V. Mesure de pH en continu	84

VI. Caractérisation des microcapteurs pH-ChemFET dans le masticateur électronique	88
VI.1 Description du masticateur électronique	88
VI.2 Intégration du microcapteur ChemFET dans le masticateur	89
Références Bibliographiques	92

Chapitre III

I. Détection d'un substrat par un enzyme	94
I.1 Réaction enzymatique et théorie de Michaelis Menten	94
I.2 Etude de la glutamate oxydase	96
II. Modélisation des Mécanismes de détection	98
II.1 Principe de détection enzymatique du glutamate-EnFET	98
II.2 Etude des mécanismes de diffusion en milieux aqueux	99
II.3 Etude des équations acido-basiques en phase aqueuse	101
II.3.1 Etude de la variation du pH en solution lors de la réaction enzymatique	101
II.3.2 Cas d'une solution de monoglutamate de sodium dans l'eau déionisée	102
II.3.3 Cas d'une solution de monoglutamate de sodium dans un tampon phosphate	104
II.4 Détermination de la réponse potentiométrique du glutamate-EnFET	105
III. Analyse du comportement du microcapteur glutamate-EnFET	106
III.1 Distribution de concentration en phase aqueuse	107
III.1.1 Etude des substrats	107
III.1.2 Etude des Produits	108
III.1.3 Variation de pH	109
III.2 Etude des paramètres influents	110
III.2.1 Influence de la concentration enzymatique N_{enz}	110
III.2.2 Influence de la constante de Michaelis K_M	111
III.2.3 Influence de la concentration d'oxygène dissous $[O_2]$	112
Références Bibliographiques	114

Chapitre IV

I. Détection du glutamate par la méthode pH-ChemFET	117
I.1 Fonctionnalisation enzymatique (du ChemFET à l'EnFET)	118
I.1.a Différents méthodes et protocoles de fonctionnalisation.....	118
I.1.a.1 Fonctionnalisation par PVA (Alcool polyvinylique)	118
I.1.a.2 Fonctionnalisation a partir du procédé glutaraldéhyde	119
I.2 Protocole de caractérisation.....	121
I.3 Résultats expérimentaux	121
I.4 Comparaison du modèle aux résultats expérimentaux.....	122
II. Détection du glutamate par méthode pH-ElecFET	123
II.1 Microfabrication, montage et encapsulation.....	124
II.1.1 Conception et fabrication des masques de photolithographie	124
II.1.2 Fabrication microtechnologique.....	125
II.1.3 Montage, encapsulation et conditionnement à la phase liquide	125
II.2 Caractérisation électrique des microdispositifs ElecFET pour l'analyse en phase liquide.....	126
II.2.1 Electrolyse de l'eau H ₂ O.....	127
II.2.2 Détection du peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	129
II.2.3 Intégration de couches enzymatiques pour la détection biochimique	133
II.3 Application à la détection enzymatique.....	134
II.3.1 Détection du glucose.....	134
II.3.2 Détection du glutamate.....	135
Références Bibliographiques	140
Conclusion générale	144

Introduction générale

L'industrie agroalimentaire a de plus en plus besoin de techniques analytiques fiables et peu coûteuses pour contrôler la qualité des aliments et des produits alimentaires. Ce besoin provient d'une part d'une demande des organismes de régulation mais aussi d'un plus grand intérêt porté par le consommateur à la composition des produits qu'il consomme [1]. Les aliments font maintenant l'objet d'un étiquetage détaillé de leurs constituants majeurs et mineurs (arômes artificiels, édulcorants, agents antimicrobiens, allergènes, glucose dans les sucres et sirops, alcool dans les vins, peroxyde d'hydrogène et sulfites en conservateurs, antibiotiques dans le lait, glutamate, vitamines...). La contribution des techniques analytiques devient de plus en plus importante pour le contrôle des matières premières, la vérification du contenu des produits et l'évaluation de leur fraîcheur. De nombreuses méthodes ont été développées et appliquées à l'analyse des aliments permettant d'obtenir des informations sur leur caractéristiques physiques et chimiques y compris sur leur teneur en contaminants. Cependant, les méthodes conventionnelles telles que la chromatographie sont lourdes à mettre en oeuvre, nécessitent un prétraitement de l'échantillon, des équipements coûteux et des produits chimiques de haute pureté pour les phases mobiles.

Les capteurs chimiques, plus précisément les biocapteurs, qui allient un élément biologique sélectif (anticorps, enzyme, cellule...) à un transducteur, permettent de quantifier rapidement certains constituants des matrices alimentaires et devraient ainsi jouer un rôle prépondérant dans le contrôle de la qualité des aliments. Leur caractère compact, leur grande spécificité, leur sensibilité et la possibilité qu'ils ont d'être portables sont autant de raisons qui permettent de penser qu'ils pourraient, à long terme, supplanter les techniques existantes. Depuis le travail pionnier de Clark & Lyons [2], les technologies des biocapteurs ont formidablement évolué. Néanmoins, bien que les efforts de recherche aient été considérables, peu d'importance a été apportée à leurs conditions d'utilisation sur le terrain. Dans de nombreux cas, les biocapteurs n'ont pas été éprouvés sur des échantillons réels et un fossé existe toujours entre les développements académiques de biocapteurs et leurs applications pratiques. Une autre déception vient du fait que peu de biocapteurs génériques sont disponibles commercialement mais qu'aucun n'est dédié à l'industrie agroalimentaire.

Que se passe-t-il dans notre bouche quand nous mâchons un aliment ? Pendant la phase buccale, l'aliment est déstructuré par l'action conjointe de la mastication et de la salivation

pour former un bol alimentaire et être dégluti. Cette étape constitue une étape préparatoire à la digestion. Cette déstructuration est principalement influencée par la composition de l'aliment, sa texture et les paramètres de mastication. C'est au cours du séjour en bouche de l'aliment que se sont majoritairement perçues ses propriétés sensorielles. S'il est possible de suivre la libération de composés volatils en bouche en temps réel grâce au couplage de la bouche in vivo ou in vitro (i.e. outils simulant la sphère buccale) avec l'API-MS (atmospheric pressure ionisation-mass spectrometry), à l'heure actuelle, aucun dispositif ne permet de telles mesures pour les composés non volatils.

L'utilisation des microtechnologies silicium et polymères doit permettre de pallier cette difficulté. Elles permettent en effet la réalisation de microcapteurs électrochimiques pour la détection en phase liquide en privilégiant les aspects de miniaturisation, de rapidité, de simplicité d'utilisation et de production collective à faible coût. C'est dans ce cadre que nous avons ciblé nos travaux sur le développement d'un microcapteur électrochimique à effet de champ ChemFET pour la détection du glutamate.

L'acide glutamique et plus particulièrement son ion associé le glutamate sont des additifs largement utilisés dans l'agro-alimentaire car caractéristiques du goût "umami". Cependant, leur consommation en excès peut être responsable de troubles cérébraux entraînant sueurs, maux de tête, perte d'équilibre, évanouissement et/ou douleurs [3-5]. Il devient ainsi important de développer des techniques d'analyse des ions glutamates. Les travaux visent ainsi le développement de capteurs enzymatiques basés sur les transistors à effet de champ sensibles au pH (pH-ChemFETs) pour la détection du glutamate. Ils visent à la réalisation technologique des microcapteurs Glutamate-EnFET (enzymatic field effect transistor), à leur modélisation et à leur caractérisation en milieux aqueux puis dans la salive, et enfin à leur intégration au sein d'un masticateur électronique développé par le laboratoire FLAVIC-INRA à Dijon.

Dans le premier chapitre nous ferons un état de l'art sur les capteurs chimiques. Tout d'abord, nous présenterons les principes fondamentaux des différents types de capteurs chimiques, à travers les principales réactions se produisant aux interfaces. Nous aborderons également les différentes méthodes de caractérisation à partir de différentes électrodes chimiques. Puis, nous approfondirons la théorie sur le fonctionnement des ChemFETs. Nous exposerons également les principes de mesure liés à ce type de capteurs chimiques. Ensuite,

nous présenterons les polymères ainsi que leurs utilisations pour les capteurs chimiques en phase liquide. Nous verrons comment les polymères ont pu être adaptés pour réaliser des couches chimiquement sensibles.

Le deuxième chapitre sera entièrement consacré à l'étude et au développement des capteurs chimiques ChemFETs. Nous présenterons tout d'abord la phase de conception des microcapteurs, puis nous exposerons toutes les étapes technologiques qui conduisent à la fabrication du capteur chimique. Nous optimisons l'intégration d'une microélectrode de grille sur la puce ChemFET pour aller vers un composant tout intégré. Ce procédé sera réalisé dans la centrale technologique du LAAS-CNRS, et les composants seront montés sur des circuits imprimés et encapsulés en vue d'utilisation en milieu liquide. Pour finir nous présentons les résultats de caractérisation des puces pH-ChemFET obtenue.

Le troisième chapitre sera consacré à la modélisation de la détection biochimique du capteur EnFET. Nous présenterons le principe de fonctionnement de la détection enzymatique, et les mécanismes physico-chimiques liés à la réaction enzymatique. Nous allons modéliser tous les phénomènes interagissant lors de la détection, pour réaliser un modèle des capteurs glutamate-EnFET.

Le quatrième chapitre sera consacré à la détection du glutamate par la méthode pH-ChemFET. Ensuite, des études de fonctionnalisation de surface par des couches enzymatiques seront étudiées en vue de détection d'espèces biochimiques. Cette couche enzymatique sera fabriquée en piégeant l'enzyme dans du glutaraldéhyde. La caractérisation des capteurs glutamate-EnFETs sera effectuée en comparant avec le modèle de simulation. Un nouveau concept de microcapteur sera mis en place, nommé ElecFET (Electrochemical Field Effect Transistors), qui consiste à intégrer, autour de la zone sensible d'un ChemFET, une microélectrode de platine. Les différentes étapes technologiques seront effectuées dans la centrale technologique du LAAS-CNRS sur le même substrat que les ChemFETs. Ce nouveau concept utilise la combinaison des techniques ampérométrique et potentiométrique. Nous allons étudier d'abord l'électrolyse de l'eau, ensuite, les paramètres pouvant influencer la réponse du capteur. Nous allons ensuite appliquer ce nouveau concept à la détection du peroxyde d'hydrogène. Cette étude va nous permettre de définir la limite du potentiel à appliquer sur la microélectrode de platine afin d'éviter une interférence avec la réaction

d'oxydation de l'eau. Enfin, nous allons appliquer l'ElecFET à la détection du glucose et du glutamate en phase liquide.

Références Bibliographiques

- [1] D. Dupont, Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire, Technique de l'ingénieur.
- [2] L.Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann. NY Acad. Sci., 148, 1962, 133-153.
- [3] D. Braeken, D. Rand, A. Andrei, R. Huys, M. Spira, S. Yitzchaik, J. Shappir, G. Borghs, G. Callewaert, C. Bartic, Glutamate sensing with enzyme-modified floating-gate field effect transistors, Biosensors and Bioelectronics, 24, 2009, 2384-2389.
- [4] E. McLamore, S. Mohanty, J. Shi, J. Claussen, S. Jedlicka, J. Rickus, et D. Porterfield, A self-referencing glutamate biosensor for measuring real time neuronal glutamate flux, Journal of Neuroscience Methods, 189, 2010, 14-22.
- [5] Brendan Belsham, Glutamate and its role in psychiatric illness, Hum Psychopharmacol Clin Exp 2001, 16: 139-146.

CHAPITRE I

ETAT DE L'ART

Introduction

L'industrie agroalimentaire a besoin de techniques analytiques pour contrôler ses procédés de transformation et vérifier la composition et la qualité des produits générés. Ces techniques doivent être rapides, justes, spécifiques et peu coûteuses. Les capteurs chimiques et biocapteurs, qui combinent un élément sélectif biologique de reconnaissance (anticorps, enzyme, ADN, cellule...) et un transducteur, présentent ces qualités. Des capteurs permettant la détection et/ou la quantification de sucres, acides, alcools, édulcorants et acides aminés dans les aliments sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire depuis plusieurs années. Plus récemment, de nouvelles applications portant sur la miniaturisation et l'intégration de ces capteurs dans un système automatique d'analyse qu'on appelle les langues électroniques ont été développées. Toutefois, des efforts considérables restent à faire pour que ces techniques soient utilisées en routine sur ce type d'applications.

I. Définition du goût

Le goût, ou saveur, correspond à l'ensemble des sensations gustatives et des sensibilités chimiques communes perçues lorsqu'un aliment, une boisson ou tout autre produit est placé dans la cavité buccale et aux propriétés des produits qui provoquent ces sensations [1]. Les récepteurs ou les papilles gustatives [2] sont susceptibles de reconnaître quatre goûts fondamentaux - sucré, salé, acide et amer - identifiés au XIXe siècle par le physiologiste Adolph Fick :

Le sucré

Molécules concernées : Fructose, glucose, galactose, maltose, lactose et mannose sont des sucres simples. Parmi les diholosides (sucres formés par deux oses), les plus courants sont le saccharose (sucre de canne ou de betteraves, formé d'un glucose et d'un fructose), le lactose (un glucose et un galactose) et le maltose (deux glucoses). La formule de ces diholosides est $C_{12}H_{22}O_{11}$.

Exemples d'aliments sucrés : sucre, confiture, miel, carotte, poire, pomme de terre.

Le salé

Molécules concernés : Présence du chlorure de sodium (NaCl).

Exemples d'aliments salés : sel, chips, anchois, pain, crevette, algues, crabe.

L'acide

Molécules concernés : présence des ions H_3O^+ (acides chlorhydrique, citrique, acétique, ...)

Exemples d'aliments acides : citron, tomate, oseille, vinaigre, kiwi, asperges, rhubarbe, yaourts, fromage blanc.

L'amer

Molécule concerné : présence de quinine, de caféine, de chlorure de magnésium ($MgCl_2$)

Exemples d'aliments amers : asperge, céleri, pissenlit, café, endive, concombre, amande amère, orange amère, fève, pois chiche, épinard, aubergine, chicorée, artichaut violet.

En 1901, dans sa cartographie (figure 1), D. Hanig indiquait des zones spécialisées pour identifier les 4 saveurs principales [3] :

- Le sucré et le salé sont détectés par l'extrémité de la langue.
- L'amer est détecté à l'arrière de langue.
- L'acide est détecté sur les côtés.

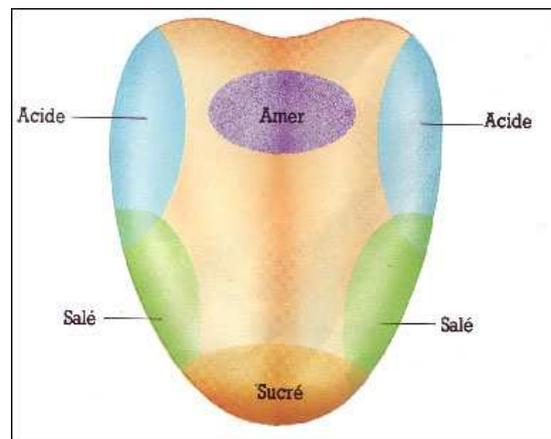


Figure I.1. Les différentes papilles de la langue, responsables en partie du goût.

Cette cartographie n'est plus d'actualité puisque depuis quelques temps, on y ajoute la saveur « umami » dépendante de la présence d'exhausteurs tels le glutamate. En 1908, un chercheur japonais Kikunae Ikeda identifia cette nouvelle saveur (umami), en goûtant un bouillon d'algues fucus. Il ne reconnut aucune des quatre saveurs de base connues jusqu'alors. Il appela cette nouvelle saveur « umami », qu'on peut traduire par savoureux [4-5], mais c'est dans les années 80, que l'umami a finalement été reconnu comme une saveur à part entière

aux côté du sucré, du salé, de l'acide et de l'amer. L'hydrolyse des sels de l'acide glutamique peut aussi libérer des ions glutamates. Ainsi le glutamate monosodique (ou additif alimentaire E621) qui est souvent utilisé comme exhausteur de goût donne une saveur umami.

La saveur umami est due à la présence de l'anion carboxyle de l'acide glutamique, l'un des vingt acides- α -aminés que l'on retrouve naturellement dans de nombreux aliments riches en protéines tels que les viandes, le fromage, le bouillon, les champignons, etc. Le goût sucré est dû aux mono et disaccharides et nous guide vers les aliments riches en sucres et en amidon. L'umami est dû au L-glutamate et nous guide vers les sources de protéines (tableau 1).

Aliments	Acide glutamique (en mg/100 g)
Cheddar	182
Viande de poulet	44
Viande de bœuf	33
Asperges vertes	49
Tomates	246
Pommes de terre	180

Tableau 1. Composition en acide glutamique dans certains aliments

Dans le domaine de l'agroalimentaire, les chercheurs ont toujours été curieux quant à l'analyse des cinq goûts de base dans une denrée alimentaire donnée. Cette analyse est en effet nécessaire au contrôle des concentrations de diverses espèces biochimiques d'intérêt afin de limiter tout effet secondaire lié à un excès de consommation. Pour cela, de nombreux capteurs ont été étudiés dans le cadre du développement de la langue électronique.

II. Développement de la langue artificielle ou langue électronique

Ces dernières années, de nombreuses recherches dans le secteur agroalimentaire portent sur la détection du goût ou la libération de saveurs, notamment pour le développement de nouveaux produits alimentaires. Aujourd'hui, il est fait appel à des jurys d'analyse sensorielle pour effectuer un certain nombre de tests. La langue artificielle ou langue électronique permet de s'affranchir des inconvénients liés aux mesures faites sur des personnes, comme une

variabilité importante entre individus ou une répétition limitée des tests en raison de la lassitude engendrée.

De nombreux travaux ont été développés dans le but de contrôler la qualité des aliments dans le monde industriel de l'agroalimentaire. Il est ainsi possible de citer les travaux de A. Riul [6] qui ont concerné le développement d'une langue électronique capable de détecter les goûts acide, sucré, amer et salé. Il faut ainsi mentionner les travaux de K. Toko [7] qui ont visé à l'utilisation d'une microélectrode à canaux multiples pour détecter les cinq goûts de base. Enfin, les langues électroniques sont fabriquées par de nombreuses sociétés, notamment par Alpha MOS situé à Toulouse (France). Ces capteurs sont utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et pour le contrôle qualité de différents produits, typiquement pour les tests en laboratoire, 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.

III. Utilisation de capteurs électrochimiques pour la détection des goûts

Les capteurs électrochimiques permettent la détection en continu d'espèces chimiques et biochimiques en milieu liquide. Ils sont classés en trois catégories selon le mode de transduction : conductimétrique, potentiométrique et ampérométrique.

III.1 Capteurs conductimétriques

III.1.a Présentation

La conductivité électrique est la capacité d'un corps à faire passer un courant électrique. Dans le cas d'une solution liquide, ce courant est transporté par des ions (cations ou anions) et la conductivité électrique s'écrit :

$$\sigma = \sum_i \lambda_i C_i \quad (1)$$

Où λ_i et C_i sont respectivement la conductivité et la concentration de l'ion i présent en solution. Globalement, la conductivité dépend des concentrations en solution, de la mobilité et de la valence des ions et de la température [8].

III.1.b Mesure de la conductivité

La conductivité est déterminée en appliquant un courant électrique alternatif (I) à deux électrodes plongées dans une solution et en mesurant la tension résultante (V). Durant ce processus, les cations migrent vers l'électrode négative, les anions vers l'électrode positive et la solution agit comme conducteur électrique (figure 2). Le système électrique est alors régi par la loi d'ohm et la conductivité peut être ainsi estimée grâce à la relation :

$$\sigma = \frac{I}{V} \quad (2)$$

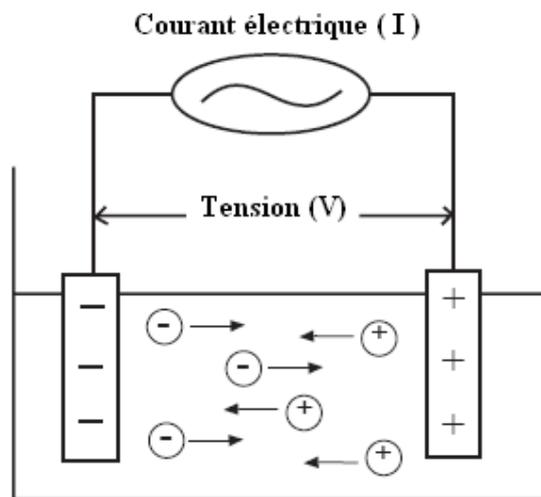


Figure I.2. Migration des ions dans une solution

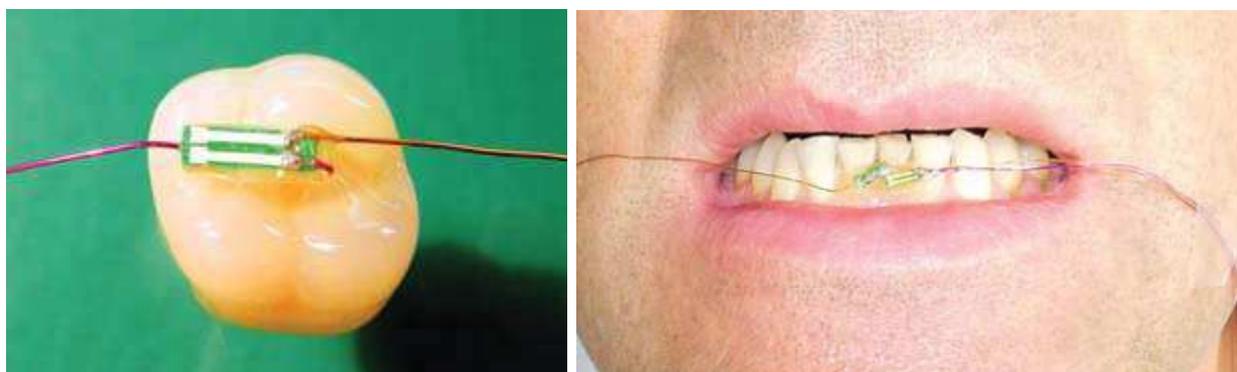
Les avantages de la transduction conductimétrique sont nombreux : faible coût, simplicité d'utilisation, rapidité. En revanche, c'est une technique de mesure non spécifique car incapable de distinguer les différents types d'ions en phase liquide. Ainsi, elle donne une lecture proportionnelle à l'effet combiné de tous les ions présents en solution [8].

III.1.c Applications des capteurs conductimétriques pour la détection des goûts

Comme mentionné précédemment, la non-spécificité de la conductimétrie limite son utilisation à l'analyse du goût salé via la détection des ions Na^+ et Cl^- . Jack et al [9] ont décrit des expériences préliminaires pour mesurer la conductivité dans la bouche lors de la consommation de fromage à l'aide d'une plaque dentaire muni d'électrodes. Deux électrodes en acier inoxydable ont été intégrées dans la partie supérieure de la bouche. Les électrodes

étaient reliées à des fils conducteurs isolés, passant derrière les dents de sagesse et sortant par les côtés de la bouche. Ceci a permis à l'individu de mâcher normalement. Les fils étaient reliés à un conductimètre analogique avec la sortie numérisée au moyen d'un convertisseur analogique numérique et un afficheur 8 canaux.

Une approche similaire a été prise par la suite par Davidson & al [10] en utilisant la plaque dentaire équipée d'une électrode de pH et d'une sonde de conductivité. D'autres travaux similaires ont été développés par Neyraud & al [11]. Finalement Emorine & al [12] ont utilisé une sonde de température et une sonde de conductivité. Leurs résultats ont permis de démontrer la détection de la concentration de l'ion sodium représentatif du goût salé dans des applications agroalimentaires (figure 3).



a. Capteur de conductivité

b. Capteur de conductivité fixé à la base des incisives

Figure I.3. Capteur de conductivité utilisé in vivo

III.2 Capteurs ampérométriques

III.2.a Présentation des électrodes rédox

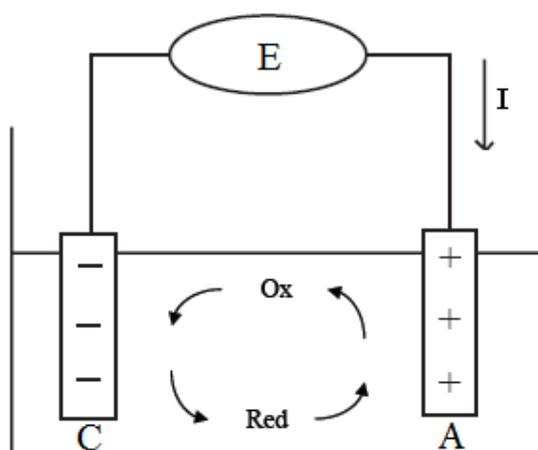


Figure I.4. Schéma d'un montage ampérométrique

Un oxydant, noté Ox, est un corps capable d'accepter des électrons. Un réducteur, noté Red, est un corps capable de céder des électrons. Un couple rédox est un couple composé d'un réducteur et d'un oxydant [13]. A partir de ces définitions, la cathode est l'électrode où se passe la réaction de réduction ou de consommation d'électrons en provenance du circuit.

En parallèle, l'anode est l'électrode où se passe la réaction d'oxydation ou de production d'électrons vers le circuit [14].

A la cathode, il est possible d'écrire :

$$E_{(I=0)} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{Ox}{Red} \quad (3)$$

Si le courant passe, la réaction de réduction a lieu



La concentration [Ox] diminue et ainsi le potentiel $E_{(I=0)}$ va diminuer. Ainsi, par réciprocité, il faut que le potentiel de la cathode E_C soit inférieur à $E_{(I=0)}$ pour que le courant passe. De même, à l'anode, si le courant passe, la réaction d'oxydation a lieu, des électrons sont fournis au circuit, la concentration [Ox] augmente et le potentiel d'anode E_A devient supérieur à $E_{(I=0)}$. Pour que le courant passe dans une chaîne électrochimique, il faut donc que :

$$E_A > E_{(I=0)} \quad \text{et} \quad E_C < E_{(I=0)} \quad (5)$$

Les techniques d'ampérométrie sont donc basées sur la mesure de courants dus aux réactions d'oxydo-réduction aux interfaces solides conducteurs-liquides. Ce courant est théoriquement donné par la loi de Butler-Volmer :

$$I = nFS \left[k_{-1[Red]} \exp\left(\frac{\alpha nF}{RT} E\right) - k_{1[Ox]} \exp\left(-\frac{\beta nF}{RT} E\right) \right] \quad (6)$$

Avec $E = E_A - E_C$

α : Coefficient de transfert anodique

β : Coefficient de transfert cathodique

F ($9,648\ 456 \cdot 10^4 \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$) constante de Faraday.

L'allure d'une courbe intensité-potentiel de réduction d'une espèce réductrice dissoute obtenue en appliquant une surtension entre une électrode indicatrice et une électrode de référence est représentée sur la figure 4. Pour une surtension suffisamment importante ($E_A \gg E_C$ ou $E \gg 0$), le courant I est donné par :

$$I = nFS[k_{-1[\text{Red}]} \exp\left(\frac{\alpha nF}{RT} E\right)] \quad (7)$$

On obtient ainsi un palier limite de diffusion pour lequel l'intensité du courant I est proportionnelle à la concentration en espèces réduites [15].

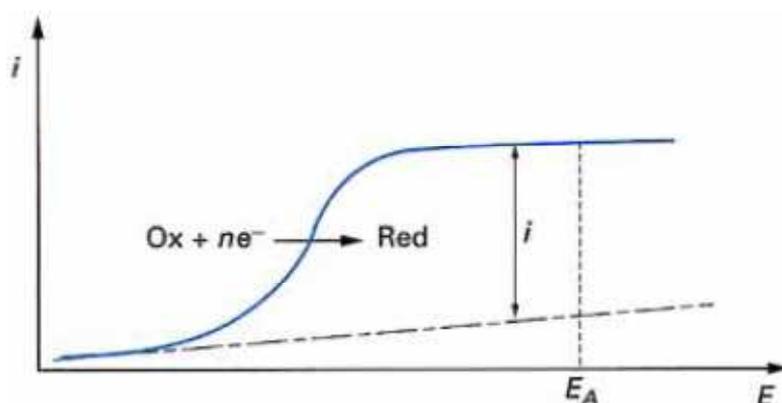


Figure I.5. Exemple de courbe intensité-potentiel de réduction d'une espèce réductrice dissoute (surtension entre une électrode indicatrice et électrode de référence)

Dans un capteur ampérométrique, on procède à une électrolyse d'une espèce électroactive entre une électrode indicatrice et une électrode de référence, en fixant une surtension $E \gg 0$ correspondant au palier limite de diffusion pour cette espèce. On détermine alors la valeur du palier de diffusion, qui est proportionnelle à la concentration de l'espèce réduite ou oxydée à l'électrode indicatrice. Un étalonnage préalable en un point est effectué dans les mêmes conditions. Les valeurs de courant mesurées sont extrêmement variables : elles dépendent notamment de la quantité d'espèces électroactives, de la surface de l'électrode indicatrice... Elles sont généralement comprises entre quelques picoampères et quelques dizaines de milliampères.

Ce principe de transduction permet de détecter des espèces électrochimiquement actives, oxydantes, ou réductrices en solution. La sélectivité de détection n'est liée qu'à la valeur du

potentiel de surtension $E \gg 0$. Les principales électrodes indicatrices (ou électrodes de travail) utilisées sont l'électrode à goutte de mercure, les électrodes métalliques inattaquables (platine, or...), les électrodes en diamant, en carbone vitreux ou en graphite (figure 6).

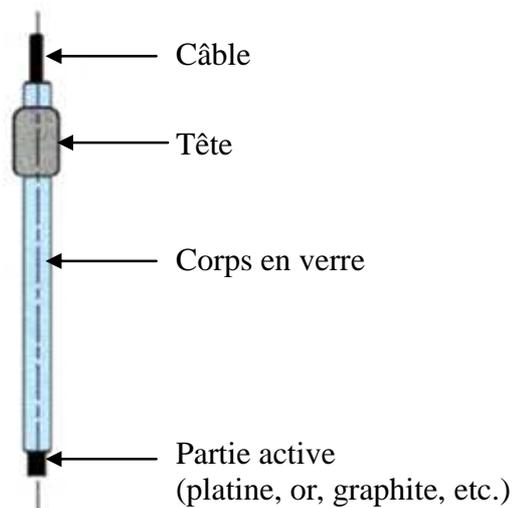


Figure I.6. Schéma d'un capteur redox

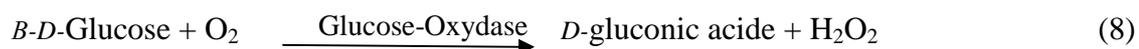
III.2.b Applications des capteurs ampérométriques pour la détection des goûts

Les acides et bases représentatives du goût acide et les ions tels que Na^+ représentatifs du goût salé ne sont pas électrochimiquement actifs. On ne peut donc pas les étudier par détection ampérométrique. Cette technique n'est en effet adaptable qu'à des espèces électrochimiquement actives.

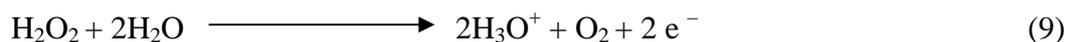
III.2.b.1. Goût sucré

- Cas du Glucose

L'action catalytique de la glucose-oxydase est décrite par l'équation suivante :



La détection du glucose est ainsi basée sur la mesure ampérométrique du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 produite par la réaction enzymatique due à la glucose oxydase :



Mutlu et al [16] ont développé une électrode à une seule couche enzymatique pour la détection du glucose avec une linéarité étendue jusqu'à 340 mM et un temps de réponse de 500 secondes à pH 4, fonctionnant à une polarisation de 650 mV (vs Ag/AgCl). Cette méthode a été appliquée au jus d'orange et à des boissons toniques. Un bon accord avec la détection spectrophotométrique conventionnelle a été obtenu.

Le glucose et le saccharose ont été déterminés simultanément par l'utilisation d'un système de capteur enzymatique consistant en une électrode sensible à base de glucose oxydase et une cellule de mesure qui contient une couche coimmobilisé invertase / mutarotase. Après une période de 2-6 s et 8-20 s à partir de l'injection des substances à analyser, des courants stables ont été enregistrées et des réponses linéaires sur les plages de concentration de 0,2µM à 3mM de glucose et de 10µM à 6 mM de saccharose ont été respectivement obtenues. Le procédé a été appliqué aux confitures et aux jus pour la détermination rapide du glucose et du saccharose. Les résultats ont bien été corrélés avec le procédé spectrophotométrique [17].

Une analyse ampérométrique par injection en flux continu (Flow injection analysis FIA) avec une électrode enzymatique contenant de la glucose oxydase déposée sur une couche de polyanion composée de poly-*L*-lysine et poly (4-styrènesulfonate) a été utilisée efficacement pour la détermination du glucose dans les boissons. La membrane en polyanion est utile pour prévenir toutes interférences électrochimiques. Une gamme dynamique linéaire de 10 µM à 3 mM de concentration du glucose avec une vitesse d'échantillonnage de 180 h⁻¹ et une stabilité au stockage de deux mois ont été rapportées [18].

Un biocapteur ampérométrique intégré avec un échantillonnage de microdialyse pour la détermination des flux de glucose dans les échantillons non traités de jus de tomates a été rapporté par Palmisano et al. [19]. Chaque électrode a été modifiée par une bicouche constitué d'un composite électrosynthétisé extra oxydé recouverte par une enzyme piégée dans un gel d'immobilisation (co-réticulation du glutaraldéhyde, de la glucose-oxydase et du sérum bovin albumine BSA).

Récemment, un système FIA pour la détermination ampérométrique simultanée du glucose et du lactate a été décrit par Marzouk et al. [20]. Les enzymes ont été co-immobilisées dans deux réacteurs enzymatiques parallèles. Le produit H₂O₂ a été ampérométriquement déterminé par une électrode de platine (Pt) revêtu d'une couche électropolymérique à perméabilité sélective *m*-phénylènediamine. La méthode a été bien corrélée avec la méthode de référence photométrique testée sur les produits laitiers.

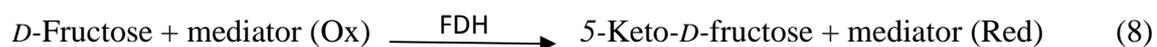
Dans le cadre du développement de capteurs miniaturisés, plusieurs travaux ont été menés par Wang et al [21-24]. Un nanocapteur enzymatique, basé sur une membrane en fibres de carbone et une microélectrode modifiée par un co-dépôt de bleu de Prusse et de glucose oxydase, est très prometteur pour les mesures du glucose dans des volumes très faibles [23]. Le développement d'un procédé sol-gel dérivé d'enzymes et contenant des encres à base de carbone montre la compatibilité avec le procédé de sérigraphie [21].

Vadgama et al ont développé une électrode à glucose oxydase recouverte d'une membrane d'acétate de cellulose modifiée avec du Tween-80. Cela assure une linéarité plus étendue à la gamme de concentrations de glucose dans l'environnement des fruits frais et fournit également une protection contre la détérioration de la glucose oxydase aux faibles pH ($\text{pH} < 3$) caractéristiques d'aliments tels que les agrumes [25].

Appleton et al. [26] ont présenté un nouveau système pour l'immobilisation de la glucose-oxydase sur l'alkylamine-CPG par l'intermédiaire d'une étape d'activation du glutaraldéhyde en utilisant une enzyme complexe polyélectrolyte afin d'augmenter la stabilité thermique du biocatalyseur. L'enzyme immobilisée a montré une stabilité élevée lorsqu'elle est testée à des températures élevées (jusqu'à 100°C).

- Cas du Fructose

Le fructose est largement distribué dans de nombreux fruits et légumes. Il a une plus grande douceur que le glucose ou le saccharose. Il est fréquemment utilisé dans les édulcorants diabétiques [27]. Les électrodes enzymatiques pour la détermination du fructose sont basées sur l'enzyme *D*-Fructose-5- déshydrogénase (FDH), en présence d'un médiateur. L'enzyme ne nécessite aucun cofacteur enzymatique supplémentaire, car elle contient du PQQ (pyrroloquinoléine quinone) et de l'hème c redox comme sites actifs.



Un biocapteur ampérométrique pour la détection du fructose, sur la base de FDH et la coenzyme ubiquinone-6 immobilisée dans une membrane à couche mimétique sur l'or a été proposé par Kinneer et Monbouquette [28]. Le capteur présente un temps de réponse de moins de 20 s, une sensibilité de $15 \mu\text{A}/\text{cm}^2 \cdot \text{mM}$ et une limite de détection inférieure à $10 \mu\text{M}$. La couche de membrane mimétique bloque efficacement l'accès des ascorbates à la surface de l'électrode, une erreur de 4% positif a été enregistrée en sa présence. Le biocapteur mesure du

fructose dans les jus de pommes et d'oranges à quelques pour cent près par rapport aux méthodes de dosage spectrophotométrique.

Une électrode enzymatique en carbone sans intermédiaire contenant du FDH avec du polyéthylène-imine a été proposé par Parellada et al. [29]. Un potentiel de polarisation de 400 mV a été appliqué, une réponse linéaire jusqu'à 10 mM de concentration de fructose a été observée avec une stabilité de 10 h. L'utilisation d'un collecteur d'injection de flux a été appliquée au capteur pour la détermination quantitative de la teneur en fructose dans des échantillons de miel. Les résultats ont été validés par chromatographie en phase liquide à indice de réfraction et un bon accord a été atteint.

Garcia et al. [30] ont utilisé une électrode à pâte de carbone modifié avec du gel de silice revêtue de FDH et le bleu du Meldola pour la détermination de la teneur en fructose dans les bonbons et les fruits gelés. La réponse a été linéaire sur toute la plage de concentration de 0,1 à 0,8 mM, avec un excellent coefficient de corrélation. Une stabilité au stockage de deux mois et une stabilité fonctionnelle sur 300 tests ont été observées.

Bassi et al. [31] ont immobilisé l'enzyme FDH sur une couche mince non conductrice électropolymérisé de 1,3-phenylene-diamine-résorcinol pour la réalisation d'un biocapteur fructose. Le ferricyanure et le tertacyanoquinodiméthane ont été testés comme médiateurs redox pour les mesures ampérométriques de fructose. Le capteur proposé a été appliqué pour la détection du fructose dans des échantillons de miel dilué (1: 1000). La méthode a bien été corrélée avec un dosage chimique.

- Cas du Saccharose

La détermination du saccharose nécessite un système multi-enzymatique. Le saccharose est hydrolysé enzymatiquement par l'enzyme invertase :



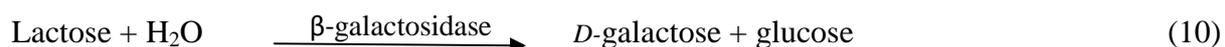
L'enzyme invertase en combinaison avec la glucose-oxydase peut donc être utilisée pour réaliser une électrode enzymatique pour la détection du saccharose. Cependant, une troisième enzyme, la mutarotase, est habituellement utilisée pour convertir le $\alpha\text{-D-glucose}$ en son isomère β spécifique à la glucose oxydase. Une électrode multi-enzyme est obtenue par une immobilisation en deux étapes de la glucose oxydase, de la mutarotase et de l'invertase. Elle a été développée pour la détermination du saccharose. La glucose oxydase a été piégée dans un

film de poly-1,3-diaminobenzène sur une électrode de platine par polymérisation électrochimique et une combinaison de la mutarotase et de l'invertase a été réticulée sur l'électrode par l'intermédiaire de sérum bovin albumine (BSA) et de glutaraldéhyde. Une seconde électrode, sans l'enzyme invertase et donc uniquement sensible au glucose, a été réalisée dans le cadre d'une mesure différentielle. L'application à un certain nombre de boissons gazeuses a donné un bon accord avec les méthodes d'analyse par chromatographie en phase liquide (LC) [32].

A partir d'une cascade enzymatique impliquant la saccharose phosphorylase, la phosphoglucomutase et le glucose-6-phosphate 1-déshydrogénase ont été proposés par Kogure et al. [33] pour la détermination spectrophotométrique du saccharose. Maestre et al [34] ont développé une électrode ampérométrique pour son dosage sans interférence de glucose ou le fructose. L'électrode proposée a été appliquée à l'analyse des flux de saccharose dans les jus de fruits et a montré un bon accord avec la méthode de référence (méthode spectrophotométrique).

- Cas du Lactose

Le lactose est le principal disaccharide présent dans le lait et les produits laitiers, produits à des concentrations de 4-6%. Il est hydrolysé par l'enzyme β -galactosidase pour donner du galactose et de glucose:



La β -galactosidase en combinaison avec de la glucose oxydase ou de la galactose-oxydase peut donc être utilisée pour réaliser une électrode enzymatique pour la détection du lactose. Deux types de biocapteurs ampérométriques pour la détection du lactose basée soit sur la co-immobilisation de deux enzymes (galactose oxydase et peroxydase) ou la coimmobilisation de trois enzymes (β -galactosidase, galactose oxydase et peroxydase) ont été développés par Tka et al [35]. Une tige de graphite pré-adsorbé ferrocène a été utilisée comme électrode de travail. L'utilisation de galactose au lieu de l'enzyme fréquemment utilisée, la glucose oxydase, conduit à la réalisation d'un capteur lactose non interférent avec la détection du glucose. La présence de la β -galactosidase améliore grandement la sensibilité, mais la plage linéaire est plus étroite que celle du capteur sans β -galactosidase. Les analyses des

échantillons réels ont montré une bonne corrélation avec l'analyse HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

III.2.b.2. Goût umami (détection du glutamate)

L'action catalytique de la glutamate oxydase est décrite par l'équation suivante :



Comme toutes les oxydases, elle est responsable de la production de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui va pouvoir être détecté par ampérométrie sur une microélectrode. Ainsi, la technique d'analyse du glutamate est similaire à celle du glucose.

On trouve dans la littérature plusieurs travaux sur les électrodes enzymatiques en fonction de l'enzyme glutamate oxydase et de glutamate déshydrogénase. Une méthode enzymatique pour la détermination du glutamate dans les produits alimentaires a été développée par Mottola et Janarthanan [36], en utilisant des bioréacteurs rotatifs. Deux approches enzymatiques ont été mises en œuvre. L'une des méthodes utilise de la glutamate déshydrogénase dans la réaction enzymatique principale et la diaphorase dans la réaction indicatrice, ce qui implique le NADH et l'hexacyanoferrate(III). La deuxième méthode utilise une seule enzyme, la glutamate oxydase et le suivi ampérométrique de la production de H_2O_2 . Les échantillons utilisés pour illustrer les approches sont les cubes de bouillon de bœuf, la sauce soja, le bouillon de poulet, l'assaisonnement de sel, le jus de fruits et de légumes et le lait écrémé. Des interférences par l'ascorbate présent dans certains échantillons ont été éliminées par une utilisation en ligne d'un réacteur emballé contenant l'ascorbate oxydase.

Kwong et al ont signalé la fabrication de biocapteurs à couche épaisse pour la détection de glutamate dans les denrées alimentaires [37]. Les capteurs ont été préparés par l'immobilisation du glutamate oxydase en utilisant polycarbamylsulfonate-hydrogel sur la couche épaisse. L'enzyme glutamate oxydase a été obtenue à partir de *Streptomyces* avec différents degrés de purification. Les résultats ont été comparés via leur réponse caractéristique à la glutamate, ceci en termes de sensibilité, spécificité, inhibition et durée de vie. Ces capteurs ont été appliqués pour déterminer le glutamate monosodique dans les échantillons de sauces soja et ont montré une bonne corrélation avec la méthode colorimétrique.

Basu et al [38] ont développé un biocapteur pour la détection du glutamate monosodique (MSG) par co-immobilisation de la L-glutamate oxydase (L-GLOD) et de la L-glutamate déshydrogénase (L-GLDH) (figure 19). Une réponse plus élevée a été trouvée en présence d'ion ammonium. Le capteur a été capable de déterminer la concentration du MSG dans une gamme de 0,02 à 3mg / L. La linéarité a été obtenue de 0,02 à 1,2 mg / L en présence de l'ion ammonium (10 mM) et du NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) (2 mM), mais en l'absence de L-GLDH, la détection limite de MSG est limitée à 0,1 mg / L. Le K_m apparent pour le MSG avec la réaction couplée L-GLOD_L-GLDH était 0,44 mM et 1,92 mM quand la L-GLOD a été immobilisée. La réticulation avec du glutaraldéhyde en présence de sérum-albumine bovine (BSA) en tant que molécule d'espacement a été utilisée pour le procédé d'immobilisation. Le temps de réponse du capteur est de deux min. L'enzyme immobilisée sur la membrane a été utilisée pendant plus de 50 mesures. L'activité de la membrane enzymatique a été testée sur une période de 60 jours.

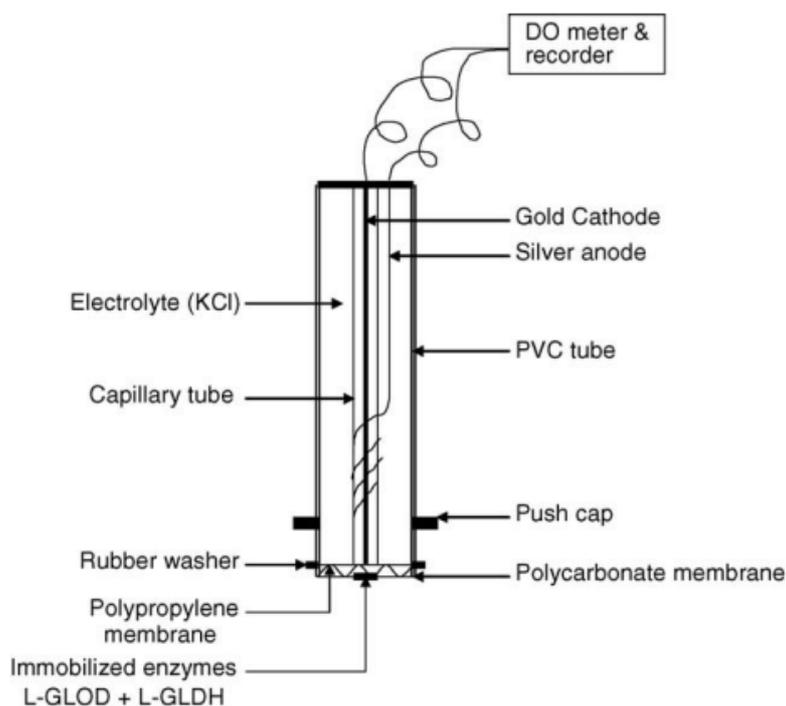


Figure I.7. Schéma du biocapteur glutamate avec la co-immobilisation du L-GLOD_L-GLDH

La sauce de soja, la sauce tomate, la soupe de poulet et la sauce de poulet pimentée ont été centrifugées à 500 g pendant 15 min. Le surnageant a ensuite été dilué (1:100) dans un tampon phosphate (pH 7,0), puis deux gouttes de HCl (1:2,5) ont été ajoutées afin d'empêcher la conversion de l'acide glutamique en pyrrolidone carboxylique. Ces échantillons dilués ont

ensuite été analysés avec le biocapteur. Les résultats expérimentaux ont également été comparés avec la méthode spectrophotométrique avec un bon accord général.

Ku-Shang et al ont développé un capteur ampérométrique pour la détection du glutamate en fonctionnalisant la membrane sensible avec l'enzyme glutamate oxydase et du PVA (Polyvinyl alcohol) [39]. De nombreux travaux similaires ont été réalisés pour la détection du glutamate avec différentes méthodes de fonctionnalisation d'enzymes [40-45].

III.3. Capteurs potentiométriques :

III.3.a Présentation des électrodes rédox

Le potentiel du capteur ou de l'électrode (qui n'est parcourue par aucun courant) est mesuré par rapport à un potentiel de référence. Cette condition de courant nul est d'autant mieux respectée que la résistance aux bornes de laquelle sont branchées les électrodes est plus grande [46].

Une électrode rédox plongée dans une solution contenant un réducteur et un oxydant du même couple électrochimique (4) adopte, dans le cas d'un système réversible et à courant nul, un potentiel d'équilibre qui résulte des courants d'échange d'électrons entre l'oxydant et le réducteur par l'intermédiaire du conducteur électronique. L'expression de ce potentiel d'équilibre E est donnée par la relation de Nernst :

$$E = E^0 + 2,3 \frac{RT}{nF} \lg \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \quad (11)$$

Avec

E^0 (V) potentiel normal du couple Ox /Red,

R (8,314 J.K⁻¹.mol⁻¹) constante molaire des gaz,

T (K) température absolue,

F (965000 C.mol⁻¹) constante de Faraday.

a_{Ox} et a_{Red} sont les activités de l'oxydant et du réducteur. La définition de l'activité et sa relation avec la concentration des espèces sont détaillées en [47].

La valeur du coefficient $2,3 RT/F$ est de 59,16 mV à 25 °C, elle varie de 56,18 mV à 60,15 mV lorsque la température varie de 10 °C à 30 °C.

Cette expression est vérifiée si la concentration de l'oxydant (et/ou du réducteur) est supérieure à 10^{-5} M. Au-dessous de cette concentration, le potentiel d'équilibre est perturbé par l'électrolyse d'impuretés (dont l'oxygène résiduel).

Ce potentiel redox permet de caractériser la composition de la solution contenant oxydant et réducteur conjugués dissout. En particulier, il permet de suivre l'évolution de la composition de la solution au cours d'un titrage.

III.3.b Électrodes de référence

Bien qu'elles ne constituent pas à elles seules des capteurs, elles sont utilisées à chaque fois que l'on mesure ou que l'on impose un potentiel en solution. Ce sont des électrodes redox correspondant à un système redox réversible et rapide, dont le potentiel reste invariable quelle que soit la composition ionique de la solution dans laquelle elles sont plongées. Par convention, dans l'eau, l'échelle des potentiels est rapportée à l'**électrode normale à hydrogène** prise comme origine. Celle-ci est constituée d'une électrode inattaquable (platine, palladium, etc.) en équilibre thermodynamique avec le système électrochimique :



En pratique, on opère en milieu acide fort concentré (1 M) et sous pression constante d'hydrogène réalisée par un barbotage constant de ce gaz autour d'une lame de platine platiné.

Le dispositif le plus simple a été décrit par Hildebrand et représenté sur la figure I.8 [47].

La mise en œuvre d'une telle électrode présentant quelques difficultés, d'autres électrodes dites de référence sont utilisées couramment.

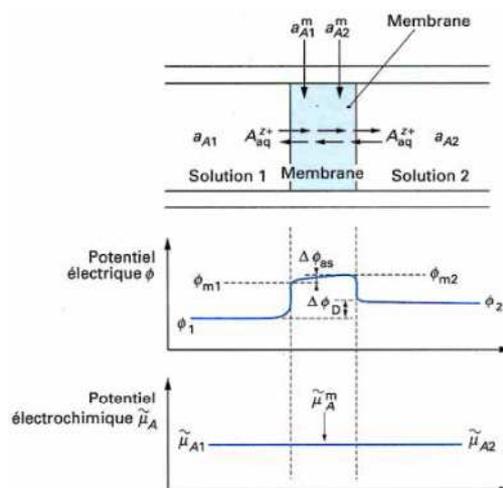


Figure I.8. Équilibre électrochimiques des ions à travers les interfaces membrane / solution

L'électrode au calomel est l'électrode de référence de potentiel la plus couramment utilisée. Elle est constituée du mélange intime mercure-chlorure mercurieux (calomel) baigné par une solution de concentration connue et constante (saturée). Le système électrochimique réversible est :



La relation de Nernst s'écrit alors :

$$E = E^0 + 2,3 \frac{RT}{nF} \lg \frac{1}{a_{\text{Cl}^-}^2} \quad (14)$$

Avec

E^0 potentiel normal du couple $\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}$ et a_{Cl^-} activité de l'ion Cl^- .

Lorsque l'électrode est remplie avec une solution saturée de chlorure de potassium, le potentiel de l'électrode par rapport à une électrode normale à hydrogène est de 244mV à 25°C.

L'électrode de référence à l'argent-chlorure d'argent est constituée par un fil d'argent recouvert de chlorure d'argent plongeant dans une solution d'ions chlorures. Le système électrochimique réversible correspondant est le suivant :



La loi de Nernst s'écrit alors :

$$E = E^0 + 2,3 \frac{RT}{nF} \lg \frac{1}{a_{\text{Cl}^-}} \quad (16)$$

Avec

E^0 potentiel normal du couple AgCl /Ag et a_{Cl^-} activité de l'ion Cl^- .

Cette électrode est facile à miniaturiser, son potentiel par rapport à une électrode normale à hydrogène est de 199mV à 25°C.

III.3.c. Etude de l'interface Electrolyte/Isolant

Du fait de la dimension finie des ions et des molécules de solvant dans une solution électrolytique, il apparaît une différence de potentiel entre les zones de charge d'espace d'un système isolant-électrolyte. Ainsi, dans un système à électrode idéalement bloquante, la zone de charge d'espace est formée de plusieurs couches de structures différentes qui définissent la double couche électrique de HELMOLTZ [48,49]. La capacité de cette double couche est fonction du potentiel. Pour une électrode chargée négativement, la distribution des espèces est présentée de façon simplifiée sur la figure I.9. La distribution du potentiel dans la couche diffuse est décrite par le modèle de GOUY-CHAPMAN-STERN [48,49].

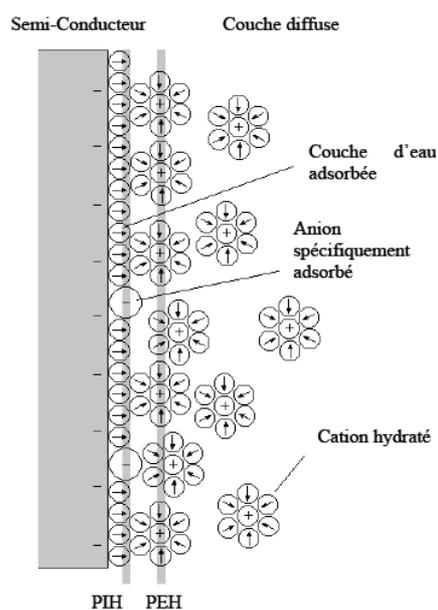


Figure I.9. Redistribution de charges à l'interface isolant/électrolyte

Ce modèle considère trois régions :

La première région, la plus proche du solide est appelée couche interne. Elle contient les molécules du solvant et certaines espèces (ions ou molécules) dont on dit qu'elles sont spécifiquement adsorbées. Cette région s'étend jusqu'au lieu des centres électriques des ions spécifiquement adsorbés appelé plan interne d'HELMOLTZ (PIH). L'orientation des dipôles dépend de la charge de l'électrode [49-50].

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 chute de potentiel entre l'électrode et la solution dans ce cas est linéaire et l'interface est équivalente du point de vue électrique à un condensateur plan parallèle.

La troisième région qui s'étend du plan externe de HELMOLTZ jusqu'au sein de l'électrolyte est appelée couche diffuse. Cette couche, comprend les ions non spécifiquement adsorbés. Cette couche diffuse est comparable à la zone de charge d'espace des MOSFET, l'extension de cette couche dépend du potentiel et de la concentration en ions de l'électrolyte.

A partir de ce modèle, il a été montré que le champ électrique était constant et que le potentiel variait linéairement dans la couche compacte. La capacité de ce système est donc équivalente à la mise en série de la capacité de la couche diffuse et de la capacité de la couche compacte.

III.3.d. Application des capteurs potentiométriques dans la détection des goûts

Les capteurs potentiométriques sont largement utilisés pour la détection des goûts. Leurs avantages sont liés à la possibilité de miniaturisation, à leur rapidité de mesure, à leur fiabilité et reproductibilité de fabrication et, par inférence, à leur faible coût. Parmi les principaux travaux dédiés à la langue électronique, il faut citer ceux de K. Toko qui a développé un système à base de capteurs potentiométriques [51] pour la détection des cinq goûts de base (sucré, salé, acide, amer, umami) en utilisant huit polymères lipidiques tels que l'acide oléique (OA), l'oleylamine (OAm) et l'alcool décylque (DA) comme membranes spécifiques des diverses espèces à détecter. Ils ont préparé des substances lipidiques différentes. Par exemple des membranes mixtes hybrides composées de phosphate de dioctyle (DOP) et de trioctyle méthyle chlorure d'ammonium (TOMA) ont été utilisées pour mesurer les acides aminés.

Chaque membrane lipide/polymère a été montée sur une partie d'un tube en plastique, qui présente un trou, de telle sorte que la partie interne du cylindre est isolée de l'extérieur. La fin du cylindre a été scellée avec un bouchon contenant une électrode Ag/AgCl. Le tube a été rempli par une solution de 3 M de KCl. Huit électrodes de détection sont ainsi préparées, séparées en deux groupes, et reliées à deux porte-électrodes, qui sont commandés mécaniquement par un bras de robot (figure I.10).

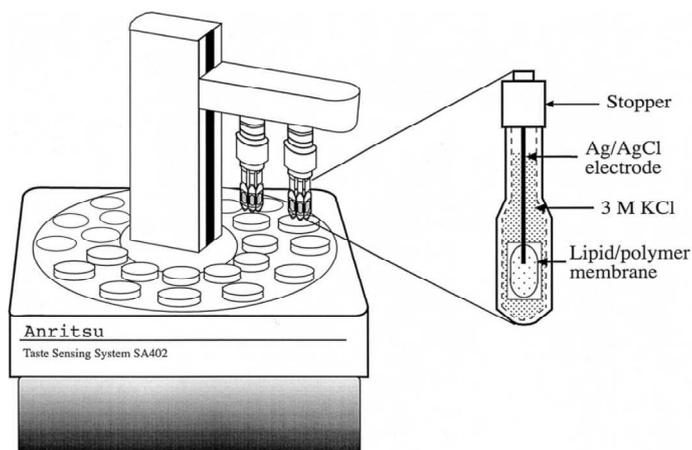


Figure I.10. Système Multicapteur ou capteur globale SA402, Anritsu.

La figure I.11 montre la réponse potentiométrique des sept canaux pour deux sortes de qualités gustatives d'acidité et de salinité, mesurées en prenant l'origine à 1 mM de KCl. La reproductibilité était très élevée, car les écarts types étaient inférieurs à 1%. Le capteur a une réponse similaire à ceux du même groupe de goût, c'est à dire, comme exemples de substances acides, l'acide chlorhydrique, l'acide citrique et l'acide acétique montrent des motifs de réponse similaires. Pour les substances salées, NaCl, KCl et KBr montrent des motifs de réponse similaires. Des résultats ont été aussi obtenus pour les goûts "amer", "sucré" et "umami", démontrant une sélectivité d'analyse globale.

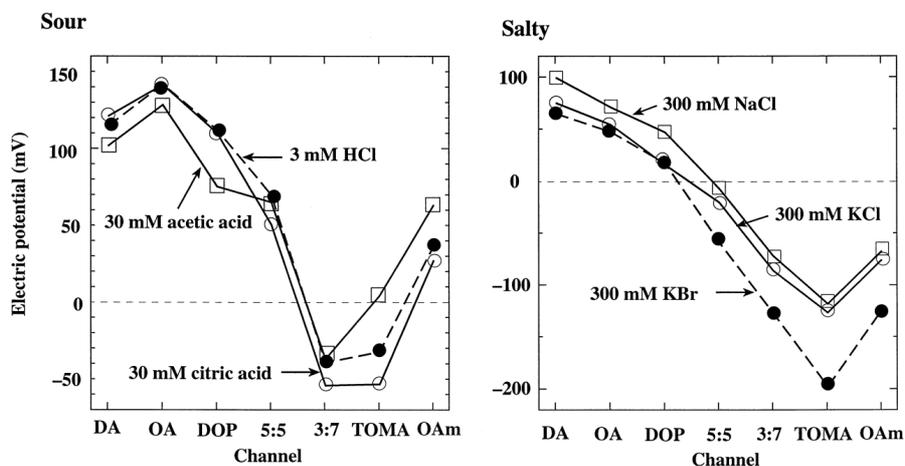


Figure I.11. Réponse potentiométrique pour les goûts acide et salé

Chaque canal a répondu aux acides aminés de différentes manières en fonction de leurs goûts. Le L-tryptophane, qui suscite presque un goût pur amer chez les humains, a influencé l'augmentation du potentiel des canaux 1, 2 et 3 considérablement. Cette tendance a été observée pour d'autres acides aminés, qui présentent essentiellement un goût amer, telles que la L-phénylalanine et la L-isoleucine. D'autre part, la L-alanine, la glycine et la L-thréonine représentent principalement le goût sucré. Pour ces acides aminés, les potentiels des canaux 1 et 2 ont diminué. La L-valine et la L-méthionine, qui représentent le goût amer et légèrement le sucré, ont diminué le potentiel du canal 5, les réponses des canaux 1 et 2 étaient alors faibles.

La figure I.12 montre finalement le diagramme obtenu par la méthode PCA (Principal Concept Analysis). Le premier axe principal PC1 reflète les goûts amer et sucré tandis que le deuxième axe principal PC2 reflète l'acidité et le goût "umami".

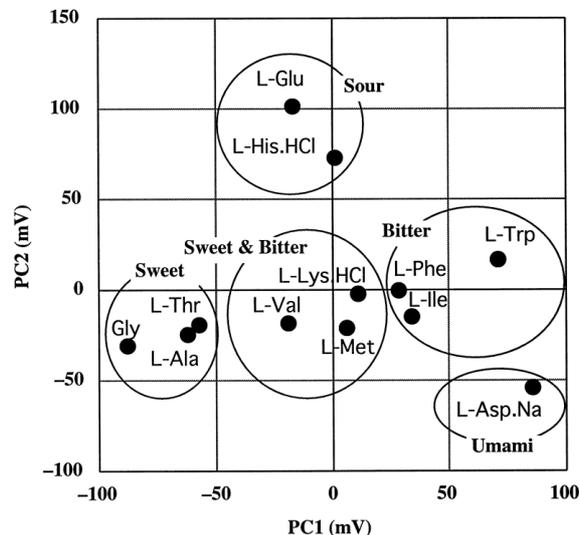


Figure I.12. Détection des goûts par le système de K.Toko

D'autres travaux similaires ont été reportés [52-56]. On peut citer un certain nombre de travaux relatifs à la mesure du pH, à la détection d'ions ou d'espèces (bio) chimiques par potentiométrie. Etant donné que nous avons choisi cette filière de transducteur dans le cadre de nos travaux, ceux-ci seront plus particulièrement décrits un peu plus loin dans ce chapitre (cf. paragraphe IV).

IV. Positionnement sur le développement des ChemFET

Le premier concept des microcapteurs chimiques ChemFET (Chemical field effect transistor) a été proposé par Bergveld en 1970. Il a mis en évidence la sensibilité aux ions

H_3O^+ d'un transistor MOSFET (Métal Oxyde Semiconductor Field Effect Transistor) sans grille métallique appelé ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) [57]. Depuis de nombreuses technologies ont été développées (EnFET, BioFET, DnaFET, ImmunoFET ,...). Les capteurs ChemFET sont des capteurs chimiques basés sur le principe de transistor à effet de champ. A la base, un ChemFET est un transistor MOS où la grille métallique est substituée par un électrolyte polarisé par une électrode de référence.

IV.1 Principe du fonctionnement du transistor MOSFET

Le principe du transistor MOSFET est de pouvoir contrôler le courant I_{DS} circulant entre la source et le drain du semi-conducteur par l'application d'une tension V_{GS} sur la grille (figure I.13). La grille métallique est isolée du drain et de la source au moyen d'un isolant et commande le courant I_{DS} entre le drain et la source [58]. La condition nécessaire à la conduction de courant dans un transistor MOS est que la tension V_{GS} doit être supérieure à la tension de seuil V_T . Le transistor possède trois régimes de fonctionnement, bloqué, linéaire et saturé. Lorsque la tension de grille est inférieure à la tension seuil ($V_{GS} < V_T$) le transistor est dit "bloqué". Lorsque la tension de grille est égale ou supérieure à la tension de seuil ($V_{GS} \geq V_T$), le courant drain-source varie linéairement avec la tension drain-source V_{DS} , le transistor est dans le régime linéaire. A partir d'une certaine valeur de tension entre le drain et la source nommée V_{DSsat} , le courant ne varie plus et atteint une valeur de saturation I_{DSsat} , c'est le régime "saturé" [59]. Ainsi d'un point de vue théorique le courant drain-source est donné par la relation 1 [60-61] :

$$I_{DS} = \frac{W}{L} \mu C_{ox} (V_{GS} - V_T - \frac{1}{2} V_{DS}) V_{DS} \quad (17)$$

Où

W est la largeur du canal,

L est la longueur du canal,

μ est la mobilité des porteurs de charge dans le canal,

C_{ox} est la capacité de l'oxyde de grille,

V_{GS} est la tension du grille,

V_T est la tension du seuil,

V_{DS} est la tension drain-source.

La tension de seuil du transistor MOS est en parallèle donnée par la relation suivante :

$$V_T = \frac{\Phi_M - \Phi_{Si}}{q} - \frac{Q_{SS} + Q_{ox} + Q_B}{C_{ox}} + 2\phi_F \quad (18)$$

Où

Φ_M est le travail de sortie du métal,

Φ_{Si} est le travail de sortie du silicium,

Q est la charge de l'électron,

Q_{SS} est la charge de l'interface oxyde-silicium,

Q_{ox} est la charge de l'oxyde,

Q_B est la charge dans la couche de déplétion du substrat,

ϕ_F est le potentiel différentiel entre le niveau de fermi de silicium dopé et intrinsèque.

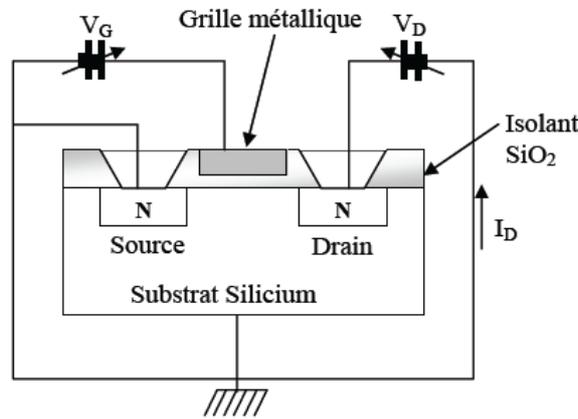


Figure I.13. Schéma d'un MOSFET

IV.2. Du MOSFET à l'ISFET

Un ISFET n'est rien d'autre qu'un MOSFET où la grille métallique est remplacée par un électrolyte polarisé par une électrode de référence (figure I.14). La tension de seuil devient alors fonction des caractéristiques chimiques de la solution [58-59] [62-63]. L'équation (18) peut être alors écrite sous la forme :

$$V_T = E_{ref} - \psi + X_{sol} - \frac{\Phi_{Si}}{q} - \frac{Q_{SS} + Q_{ox} + Q_B}{C_{ox}} + 2\phi_F \quad (19)$$

Où

E_{ref} représente le potentiel d'électrode de référence,

ψ est le potentiel à l'interface solide/liquide,

X_{sol} est le potentiel de surface du solvant (paramètre constant).

Ainsi, l'équation de la tension de seuil peut être écrite :

$$V_T = V_{T0} - \psi \quad (20)$$

Le principe de fonctionnement du capteur chimique ISFET est donc basé sur le piégeage d'ions au niveau de la couche sensible et donc de l'interface isolant/liquide. Les charges piégées induisent une variation du potentiel chimique ψ et donc de la tension de seuil du transistor V_T .

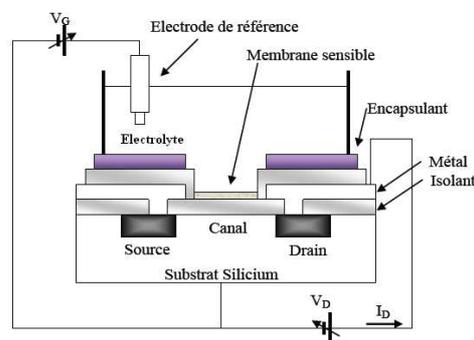


Figure I.14. Méthode de mesure d'un ChemFET

Le principe de mesure est le suivant : la valeur du courant de drain (I_{DS}) est maintenue constante à une valeur I_0 au moyen d'un asservissement électronique. Si la valeur du pH de la solution change, la tension de seuil de l'ISFET (V_T) change ainsi que le courant de drain. La rétroaction électronique rajuste la tension fixée par l'électrode de référence de telle manière que le courant de drain soit maintenu constant à la valeur I_0 . L'écart entre la nouvelle tension de grille (V_{pH2}) et l'ancienne (V_{pH1}) est proportionnelle à la variation de pH (figure I.15).

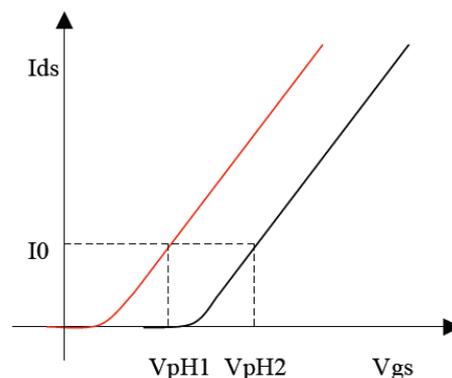


Figure I.15. Réponse au pH d'un capteur ISFET. Variation de la tension de seuil pour des mesures $I_{DS}(V_{GS})$ effectuées dans deux solutions différentes

Ainsi, la sensibilité au pH est déterminée de la manière suivante :

$$S = d\psi/dpH = (V_{pH2} - V_{pH1}) / (pH2 - pH1) \quad (21)$$

IV.3. Etude de la structure Electrolyte/SiO₂/Silicium

Dans la pratique, la sensibilité au pH mesurée par un ISFET est inférieure à la valeur prédite par la loi de Nernst. Un phénomène chimique propre aux membranes sensibles formées à partir de couche de SiO₂ est responsable de cette dérive. Il n'y a plus d'équilibre thermodynamique entre les ions dans l'isolant et les ions dans l'électrolyte, par conséquent la loi de Nernst n'est plus applicable. La théorie du "site-binding", inspirée des travaux de Bousse, explique le procédé qui se produit à l'interface isolant-électrolyte [49-50]. Ce modèle considère les groupes Si-OH sur la couche d'oxyde comme des centres actifs dont la charge varie proportionnellement aux ions présents à la surface de l'ISFET. Ces centres actifs sont responsables de la formation de la double couche électrique décrite par la théorie de GOUY-CHAPMAN-STERN et donne le potentiel à l'interface oxyde-électrolyte.

Les ions H₃O⁺ et OH⁻, présents dans une solution aqueuse sont appelés « ions déterminants le potentiel ». Ces ions sont responsables de l'état de charge à l'interface SiO₂/électrolyte. Au contact de la solution aqueuse, des groupements silanols (SiOH) se forment à la surface de l'isolant. Ces groupements peuvent être, suivant le pH de la solution, chargés positivement, chargés négativement ou neutres. Le pH particulier pour lequel la surface de la membrane a zéro charge est appelé « pH au point de charge nulle » pH_{pcn}. La présence de ces groupements de charges amène une correction de l'équation de Nernst habituellement utilisée en électrochimie. La figure I.16 illustre les trois différents types de groupements silanols à la surface d'une membrane.

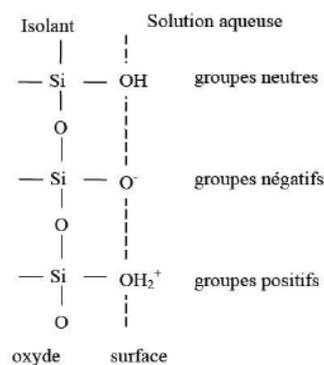
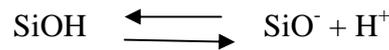


Figure I.16. Représentation schématique de la théorie du "site-binding"

Le pH dépend de la charge en surface. Ce "site binding model" a été adapté par Bousse pour le pH-ChemFET avec la grille en SiO₂ [64]. Bousse et al ont également développé une théorie pour le pH-ChemFET dans laquelle interviennent les deux paramètres pH_{pcn} (pH au point de charge nulle) et B (terme correctif) dérivés des modèles de dissociation des sites et de double-couche [65]. Les mécanismes d'accumulation de la charge en surface du diélectrique se présentent comme un équilibre thermodynamique entre les groupes SiOH en surface et les ions H₃O⁺ en électrolyte. Les réactions en surface s'écrivent comme :



$$K_a = \frac{N_{\text{SiO}^-} a_{\text{H}_3^+}}{N_{\text{SiOH}}} \quad (22)$$

$$K_b = \frac{N_{\text{SiOH}} a_{\text{H}_3^+}}{N_{\text{SiOH}_2^+}} \quad (23)$$

Où N_i est la quantité des groupes par unité de surface et $a_{\text{H}_3^+}$ est l'activité des ions H₃O⁺.

En ce qui concerne $a_{\text{H}_3^+}$, la théorie du "site binding" modèle montre que :

$$a_{\text{H}_3^+} = \sqrt{K_a / K_b} \exp^{(-q\psi/kT)} F(\psi) \quad (24)$$

En prenant le logarithme de l'expression 14 et ensuite la dérivée et en faisant quelques arrangements, on obtient [65] :

$$\psi = \text{Ln}10 \frac{kT}{q} \frac{B}{B+1} (\text{pH}_{pcn} - \text{pH}) \quad \text{avec} \quad B = \frac{2q^2 N_s}{\sqrt{\frac{K_a}{K_b} C_s kT}} \quad (25)$$

Où

N_s : nombre de sites amphotères par unité de surface ;

pH_{pcn} : pH au point de charge nulle ;

C_s : capacité de la double couche électrique.

Le terme correctif B tient compte de la non idéalité du capteur pH-ChemFET. La sensibilité du capteur pH-ChemFET est donc finalement définie par la relation suivante :

$$S = \frac{d\psi}{d(pH_{pcn} - pH)} = \ln 10 \left(\frac{kT}{q} \right) \frac{B}{B+1} \quad (26)$$

IV.4. Principe de fonctionnement du pH-ChemFET

Le capteur pH-ChemFET avec la grille SiO₂ possède une sensibilité faible et sub-nernstienne de 30 mV/pH [66]. L'amélioration des propriétés des micro-capteurs pH-ChemFETs passe par l'investigation et l'optimisation des matériaux de détection et de leur dépôt sur la grille SiO₂. De nombreuses membranes sensibles aux ions hydronium/hydroxydes H₃O⁺/OH⁻ ont été élaborées afin d'améliorer la sensibilité, la sélectivité, la stabilité et la durée de vie.

Le nitrure de silicium (Si₃N₄)

Le capteur pH-ChemFET avec la grille diélectrique SiO₂/Si₃N₄ est caractérisé par un court temps de réponse, un faible courant de fuite et une sensibilité quasi-Nernstienne (autour de 50 - 56 mV/pH). Ce matériau qui est bien connu et maîtrisé dans la technologie des circuits intégrés (IC) a été parmi les premiers impliqués dans les capteurs chimiques [67]. Généralement, cet isolant est obtenu par dépôt chimique en phase vapeur à basse pression (LPCVD) [68-69].

L'oxyde d'aluminium (Al₂O₃)

La sensibilité de cette membrane est autour de 53 -56 mV/pH. Néanmoins les capteurs pH-ChemFETs avec la couche SiO₂/Al₂O₃ possèdent une importante dérive temporelle. La couche sensible est habituellement obtenue par dépôt chimique en phase vapeur (CVD). Cependant, il existe une technique alternative de dépôt par laser pulsé (pulsed laser deposition PLD) qui est chargée d'améliorer la sensibilité du capteur ainsi que sa stabilité temporelle par une meilleure qualité des couches obtenues [70].

L'oxyde de tantale (Ta₂O₅)

Cette couche diélectrique est prometteuse pour la détection des ions $\text{H}_3\text{O}^+/\text{OH}^-$. Elle possède une bonne sensibilité de 58 – 59 mV/pH et une faible dérive temporelle de 0,03 – 0,05 pH/jour. Les membranes de Ta_2O_5 ne sont pas sélectives aux ions potassium K^+ , calcium Ca^{+2} et sodium Na^+ . Ce matériau est déposé soit par pulvérisation radiofréquence RF [71], soit par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD) [72].

IV.5. Du pH-ChemFET au pH-EnFET

Les ISFET ne sont pas limités à la mesure de pH, d'autres ions peuvent être détectés si d'autres membranes sensibles sont déposées sur l'isolant de grille et placées en contact avec le liquide. Lorsque ces ISFETs sont couplés avec une enzyme biocatalyseur, ils deviennent des biocapteurs, et sont appelés EnFET (Enzymatic field effect transistor). Ces enzymes interagissent avec le substrat pour effectuer une catalyse. Le ChemFET mesure alors la concentration en ions $\text{H}_3\text{O}^+/\text{OH}^-$ libérés lors de cette réaction [58, 73, 74].

IV.6. Développement des EnFET

Depuis la première introduction du transistor enzymatique à effet de champ EnFET pour la détection de la pénicilline par Caras et Janata en 1980 [71], des efforts considérables ont été faits pour développer des biocapteurs EnFET. Les EnFET sont basés sur des réactions biocatalytiques affectant la charge à la surface de grille, et pour produire un signal électronique, dépendait de la concentration du substrat enzymatique. Les performances de détection de l'EnFET sont grandement affectées par le procédé d'intégration des enzymes et des dispositifs ISFET. L'immobilisation d'enzymes sur la surface de grille des ISFETs par réticulation avec l'albumine sérique bovine et glutaraldéhyde est l'un des moyens les plus populaires pour construire un EnFET [75-79], et parfois le glycérol a été ajouté afin de protéger l'activité des enzymes [80-82]. Afin d'augmenter la sélectivité, des membranes supplémentaires telles que le Nafion et la polyvinylpyridine [83-87] ont été déposées sur les matrices d'enzymes réticulées.

Une autre méthode de préparation des EnFET est le piégeage des enzymes dans des polymères, tels que des hydrogels de polyacrylamide [88], le polyuréthane [89,90] et autres [91]. Ces systèmes, cependant, peuvent souffrir des limitations associées à des barrières de diffusion des substrats à travers les membranes biologiques ou des fuites d'enzymes selon l'épaisseur de la membrane. La fixation covalente d'enzymes à la matrice silanisée [92,93] peut

surmonter ces problèmes et montrent une réponse rapide, mais cette méthode peut conduire à une perte partielle d'activité enzymatique.

Les nanoparticules peuvent jouer un rôle important dans l'adsorption des biomolécules en raison de leur grande surface spécifique et énergie de surface libre élevée. La combinaison des matériaux nanométriques et des biomolécules est d'un intérêt considérable dans les domaines de la biotechnologie et de la chimie bioanalytique. Récemment, de nombreux types de matériaux nanométriques tels que l'or [94,95], l'argent et les nanoparticules à base de SiO₂ [96-98] ont ainsi été largement utilisés dans la réalisation de biocapteurs électrochimiques.

Dans le travail de Jiang et al. [96], les nanoparticules de silice hydrophobiques ont pu améliorer l'activité de la glucose oxydase (GOD) immobilisée sur l'électrode de platine, et son mécanisme a été discuté sur la base de l'adsorption du GOD sur les particules ultrafines.

Dans d'autres travaux de Tan et al. [97], des nanoparticules de silice ont été modifiées avec des molécules d'enzyme (glutamate déshydrogénase et la lactate déshydrogénase), et se sont trouvées être un bon support solide biocompatible pour l'immobilisation d'enzymes.

IV.6.a. Développement des capteurs potentiométriques pour la détection des goûts

- Détection du pH (goût acide)

La détection de l'acidité est associée à la mesure du pH et donc au développement de microcapteur pH-ISFET précédemment décrit. Parmi les capteurs potentiométriques commercialisés sur le marché sont actuellement les systèmes suivants:

- Le système de détection de goût de Anritsu / Atsugi Corp (Japon), avec un réseau de capteurs composé de sept capteurs avec différents lipide / polymère membranes [99].
- Le système MACS-multi-réseau de capteurs chimiques avec sept semi-conducteurs ISE produit par McScience (Corée du Sud) [100].
- Le système ASTREE développé par la société française Alpha MOS qui utilise un ensemble de sept capteurs sélectifs basés sur des capteurs ISFET pour mesurer les composés organiques et inorganiques [101].

- Détection du sodium (goût salé)

F. Sauvage et al [102] ont pu détecter le sodium en utilisant le $\text{Na}_{0,44}\text{MnO}_2$ en poudre synthétisée par une réaction classique à l'état solide. Grâce à une technologie plastique, ils ont étudié la réponse potentiométrique par rapport à des ions sodium Na^+ en milieu aqueux. Une réponse Nernstienne (55 mV / dec) a été obtenue pour des concentrations allant de $2 \cdot 10^{-4}$ M à 1M. Oesh et al. [103] ont proposé des nouveaux ISFET sélectifs aux ions Na^+ et NH_4^+ basés sur des membranes sélectives en polymères synthétiques contenant de l'ETH 227 et de la nonactine. La sélectivité et la sensibilité correspondent aux mêmes réponses potentiométriques des électrodes ISE avec des dérives inférieurs à 1 mV / h. Le temps de réponse du capteur est d'environ 15 ms. Brunink et al [104] ont développé un capteur similaire à base des molécules récepteurs (calix[4]arene) incorporées dans une membrane en polychlorure de vinyl en utilisant un poly (2-hydroxyéthyl méthacrylate) comme couche intermédiaire entre la grille en dioxyde de silicium et la membrane de détection pour obtenir un ISFET sensible aux ions Na^+ avec une détection Nernstienne. Brunink et al. [105] ont aussi développé des capteurs ChemFET sensibles aux ions sodium Na^+ à base d'une liaison covalente d'ionophores sélectifs au sein d'une membrane en polysiloxane. Les ChemFETs avec toutes les combinaisons possibles des ionophores libres ont été préparés et l'effet de la liaison covalente sur le comportement de détection a été étudié. L'attachement des deux composants électroactifs à la membrane polysiloxane donne une meilleure sélectivité aux ions Na^+ en solution aqueuse et une réponse Nernstienne (56,7 mV / décade). La durabilité est améliorée par l'attachement covalent des composants électroactifs (plus de 90 jours).

D'autres capteurs Na-ISFET ont été développés par Baccar et al. [106] par une implantation ionique afin de concevoir des microcapteurs sélectifs aux ions sodium Na^+ dans un mode différentiel. En implantant $2 \cdot 10^{16}$ ions/cm² d'aluminium Al^+ à 10 keV et 10^{14} ions/cm² de sodium Na^+ à 7 keV, l'interférence du potassium a été minimisée et un signal de 58 mV/pNa dans la gamme de 10^{-4} à 10^{-1} M a été obtenu en mode différentiel avec une limite de détection d'environ 10^{-7} M.

- Détection du glucose (goût sucré)

Weing et al [107] ont développé un biocapteur-glucose (gout sucré) potentiométrique basé sur un procédé d'immobilisation d'enzymes. L'enzyme et le médiateur d'électrons sont immobilisés sur la surface de l'oxyde d'étain (SnO_2) / oxyde d'indium-étain (ITO) en utilisant

un procédé de liaison covalente pour développer un biocapteur glucose potentiométrique jetable (figure 16). Le verre SnO₂/ITO est un capteur de pH fabriqué par le dépôt de couches minces de SnO₂ sur un verre ITO. La glucose oxydase (GOD) et le médiateur d'électrons (l'acide ferrocène-carboxylique FcA) sont co-immobilisés sur le verre SnO₂/ITO à l'aide du 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTS). La co-immobilisation de GOD et FcA est une approche utile pour élargir la plage dynamique de concentration en glucose de 360 mg/dl, et pour l'amélioration de la linéarité et de la sensibilité de détection.

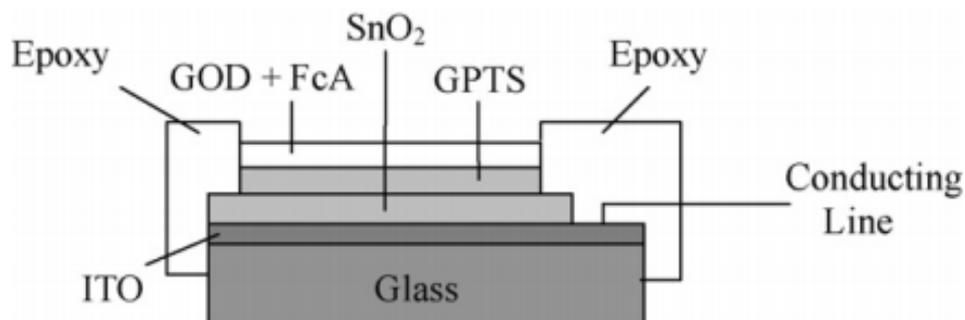


Figure I.17. Schéma de la structure de détection d'un capteur pH en verre SnO₂/ITO avec la biomembrane enzymatique

D'autres travaux sur la détection du glucose ont été développés par Lee et al. [108] qui ont utilisé une électrode en platine (Pt) comme actionneur sur un ISFET à grille sensible pour électrolyser le peroxyde d'hydrogène (figure I.18). Leurs capteurs, couplés avec l'électrode de Pt, ont présenté une gamme de détection allant de 18 à 180 mg / dl.

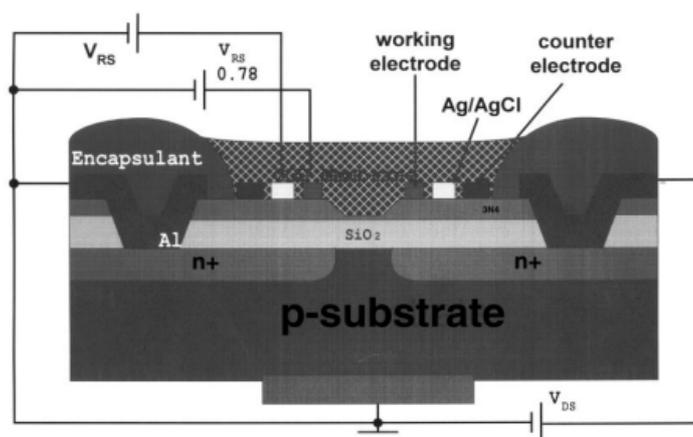


Figure I.18. Schéma du glucose-ISFET

Yin et al. [109] ont développé une structure de grille à base d'oxyde d'étain amorphe (SnO_2) et de verre d'oxyde d'étain (Indium Tin Oxide ITO) sur laquelle ont été co-immobilisés de la glucose-oxydase et du dioxyde de manganèse (MnO_2) par un procédé de réticulation. Le dioxyde de manganèse a en fait été utilisé pour catalyser l'oxydation de H_2O_2 en O_2 . Ils ont ainsi réalisé un capteur glucose-EnFET jetable dont la gamme de détection et atteint la valeur de 360 mg / dl.

On peut aussi citer les travaux de Luo et al. sur la détection du glucose en utilisant les EnFET à base de nanoparticules SiO_2 [110]. Un EnFET sensible au glucose a été fabriqué sur la base de la modification de la surface de grille d'un ISFET avec des nanoparticules en SiO_2 et de la glucose oxydase (GOD). Par rapport à un EnFET sans nanoparticules de SiO_2 , le capteur proposé montre une sensibilité plus élevée et une durée de vie prolongée. On en déduit que les nanoparticules en SiO_2 peuvent offrir un environnement biocompatible et améliorer l'activité enzymatique. La gamme linéaire de détection est de 0,05 à 1,8 mM, et la limite de détection est d'environ 0,025 mM. Les effets de la concentration du tampon du pH et de la force ionique ont également été examinés. Le biocapteur présente une bonne stabilité et reproductibilité et il peut être utilisé pour la détermination du glucose. Ils ont aussi proposé des capteurs EnFET à base de nanoparticules MnO_2 [111]. Ils ont développé un EnFET glucose en co-immobilisant la glucose oxydase (GOD) et les nanoparticules MnO_2 sur la grille d'un ISFET. Le biocapteur montre une augmentation significative du pH local due à la membrane sensible à la concentration en glucose. La modification du pH est essentiellement différente de toutes les autres EnFETs-glucose. La capacité de réaction particulière des nanoparticules MnO_2 avec le peroxyde d'hydrogène est la cause principale de la variation du pH. En outre, l'influence de la concentration du tampon du pH et de la force ionique sur l'EnFET-glucose a été étudiée en détail. Il se trouve que la force ionique a peu d'effet sur le rendement de l'EnFET. L'EnFET proposé présente une réponse linéaire dans la gamme de 0,025 à 1,90 mM, une bonne reproductibilité et stabilité.

Seo et al. ont pu développer des capteurs ISFET basés sur le principe de l'électrolyse du peroxyde d'hydrogène [112]. Ils ont utilisé une électrode de Pt comme actionneur (figure 18). En comparaison avec le capteur de glucose conventionnel, le capteur proposé a montré une amélioration de quatre fois la sensibilité initiale, une extension de la plage dynamique pour une concentration de 5 mM de glucose, et une réponse plus rapide dans une solution tampon de 10mM phosphate (pH 7,4 100 mM NaCl). Le capteur présente une forte dépendance de la concentration du tampon lorsque celle-ci est modifiée de 5 à 20 mM, la sensibilité diminue

par un facteur de quatre. Toutefois, une meilleure sensibilité de l'ordre de 9 mV/mM a été obtenue dans un tampon 20 mM de concentration.

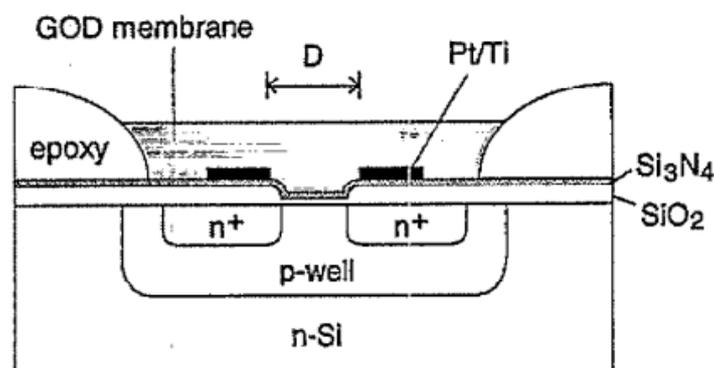


Figure I.19. Schéma d'un capteur glucose-ISFET

D'autres travaux similaires à base de nanoparticules en platine encapsulées par des dendrimères ont été développés par Yao et al [113]. Leea et al ont aussi développé des capteurs glucose avec une technique de transfert de charge (CTTGS) [114]. La technique consiste à amplifier les signaux de sortie par la méthode d'accumulation d'ions (D-gluconate + H⁺), la qualité du signal de sortie est ainsi élevée. Avec la CTTGS proposée, il est possible d'amplifier les signaux de détection sans amplificateur externe à l'aide d'un cycle d'accumulation. La CTTGS présente de nombreux avantages, comme une grande sensibilité, une grande précision, un grand signal-sur-bruit (SNR). La technique de transfert des charges a montré d'excellentes performances pour le glucose avec une grande portée (1445mV) et une bonne reproductibilité. En outre, la CTTGS possède une bonne sensibilité de 7,22 mV/mM, une limite inférieure de détection de l'ordre de 0,01 mM/L et une limite supérieure de détection de l'ordre de 200 mM/L.

- Détection du glutamate (goût umami)

D. Braeken et al [115] ont présenté un dispositif à grille flottante revêtu d'une couche de glutamate oxydase (GLOD). Un FET à grille flottante (canal P) avec une configuration de grille étendue a été fabriqué en utilisant une technologie CMOS 0,25 μm . La zone active contient un transistor à grille flottante PMOS (figure 20.). Pour augmenter la capacité de grille et pour une bonne couche d'ancrage pour la chimie de surface, 100 nm de Ta₂O₅ ont été déposés par pulvérisation réactive. La grille flottante a été protégée par une couche de

passivation également en Ta_2O_5 . La largeur de grille du transistor et la longueur sont de 100 μm et 1 μm respectivement. Après la découpe, les puces ont été reportées sur des circuits imprimés et les connexions électriques ont été protégées contre l'exposition liquide par une résine époxy (Epotek H54) durcie.

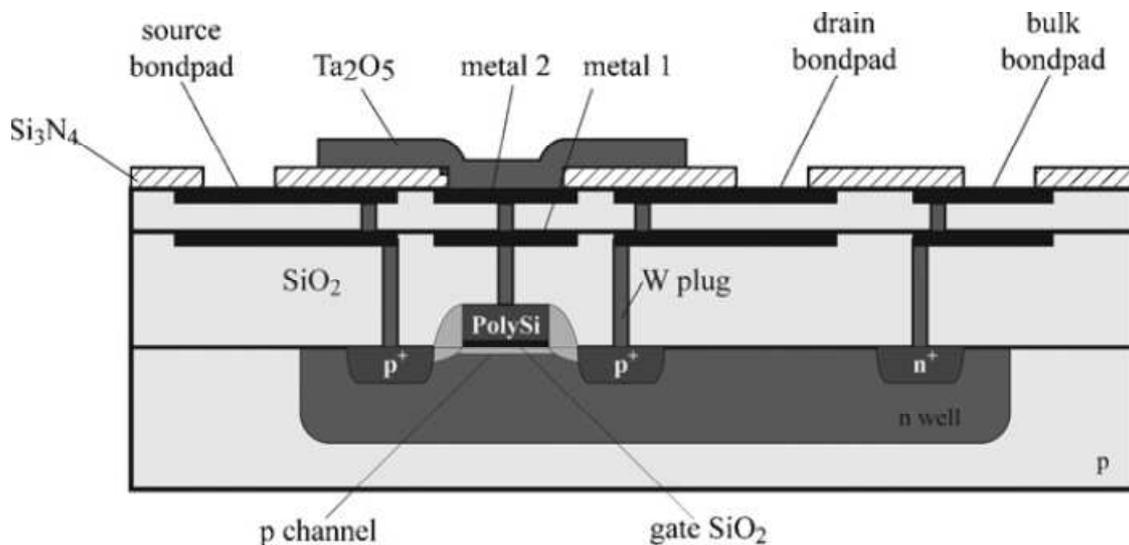


Figure I.20. Schéma du dispositif d'un ChemFET à grille flottante.

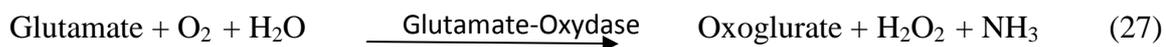
La fonctionnalisation d'enzymes est basée sur de la poly-L-lysine combinée avec du glutaraldéhyde. La chimie de surface a présenté une excellente stabilité pendant au moins un mois dans le tampon Tris conservé à 4°C. La détection du glutamate est basée sur sa conversion catalytique par la glutamate oxydase (GLOD). Cette réaction enzymatique produit du H_2O_2 et du NH_3 (cf. équation 10). La conversion du glutamate en NH_3 à la surface de la puce conduit à une augmentation locale de pH qui peut être détectée avec le capteur ChemFET. Une limite de détection de glutamate de $10^{-7} M$ a été obtenue avec le ChemFET-GLOD et le capteur s'est avéré être sélectif au glutamate seulement.

IV.6.b. Choix de développement du glutamate-EnFET

L'ion glutamate peut être mesuré par des méthodes chromatographiques (LC) [116-118], l'électrophorèse capillaire [119] ou la titration potentiométrique [120], qui sont très compliquées, consomment beaucoup de temps et exigent un grand volume d'échantillon. La méthode de détection enzymatique est choisie pour remédier aux problèmes mentionnés ci-dessus (réponse rapide, taille miniaturisée, volume échantillonné à la microéchelle, faible coût de fabrication). Les enzymes glutamate déshydrogénase (GDH) et la glutamate décarboxylase (GDC) ont été utilisées pour la détermination du glutamate [121-126]. Cependant, la GDC et

la GDH ont quelques inconvénients dus à la faible activité enzymatique et la nécessité d'un coenzyme NADH/NAD⁺.

En parallèle, la glutamate oxydase (GLOD) est une enzyme qui spécifiquement catalyse la désamination oxydative du glutamate en présence d'eau et d'oxygène avec formation de l'oxoglurate, de l'ammoniac et du peroxyde d'hydrogène [127,128].



Le peroxyde d'hydrogène formé dans cette réaction peut facilement être détecté par la réaction de la peroxydase chromogène ou une méthode ampérométrique [129-134]. Par conséquent, la glutamate oxydase possède un excellent potentiel pour une utilisation en tant que composant principal à la détermination du glutamate [135-140], bien que la GLOD actuellement disponible a encore plusieurs inconvénients tels qu'une faible activité enzymatique [141] et un coût élevé [142].

Aujourd'hui, vue l'importance du contrôle de la concentration en glutamate dont la concentration en excès est dangereuse pour l'homme, de nombreux travaux ont été orientés vers l'analyse de cette espèce biochimique en solution. Cependant, ces travaux n'ont pas permis la mise au point d'un capteur de glutamate miniaturisé, stable, fiable et répondant finalement à la demande du marché, que ce soit pour l'agro-alimentaire ou la santé. Ainsi, parmi les différentes méthodes de détection qui existent, nous avons choisi de développer un microcapteur « glutamate » à base d'un pH-ChemFET. En effet, malgré le développement de la recherche, il reste toujours des lacunes en ce qui concerne la sensibilité et la sélectivité de détection, la durée de vie ainsi que le coût de fabrication. Le but de nos travaux de thèse a donc été de concevoir, de modéliser, de réaliser et de caractériser un microcapteur pour la détection du glutamate en temps réel, ceci sur la base d'une détection potentiométrique de type ChemFET. Notre choix est justifié par l'expertise du LAAS dans la réalisation des ChemFETs pour les analyses environnementales [63] et médicales [58,59,62]. Nous citerons plus particulièrement les travaux de M. William Sant et M. Ahmed Benyahia consacrés à l'étude des EnFETs pour la détection de l'urée et de la créatinine dans le cadre du diagnostic de l'insuffisance rénale. Notre cahier de charge a été de développer un capteur rapide, sensible, sélective qui peut détecter des concentrations de glutamate dans des volumes à l'échelle du microlitre pour répondre au besoin du marché, puis d'intégrer ce capteur dans un simulateur de mastication développé par les chercheurs du FLAVIC-INRA à Dijon.

Bibliographie

- [1] J. Crouzet, Arômes alimentaires, Techniques de l'Ingénieur.
- [2] C. Salles, E. Guichard, C. Génot, A. Voilley, Texture et flaveur des aliments: vers une conception maîtrisée, Educagri éditions, 2012, Dijon.
- [3] D. Hanig, Zur psychophysik des geschmacksinnes, Philosophische Studien, 17, 1901, 576-623.
- [4] S. Yamaguchi, K. Ninomiya, The Use and Utility of Glutamates as Flavoring Agents in Food, J. Nutr, 130, 2000, 921–926.
- [5] K. Ikeda, Translation New Seasonings, Chem. Senses 27: 847-849, 2002, Translated and shortened to 75% by Yoko Ogiwara and Yuzo Ninomiya from Journal of Chemical Society of Tokyo, 30, 1909, 820-836.
- [6] A. Riul, Jr. dos Santos, Jr. Wohnrath, R. Tommazo, A. Carvalho, F. Fonseca, O. Oliveira, Jr. Taylor, L. Mattoso, Artificial Taste Sensor: Efficient Combination of Sensors Made from Langmuir-Blodgett Films of Conducting Polymers and a Ruthenium Complex and Self-Assembled Films of an Azobenzene-Containing Polymer, Langmuir, 18, 2002, 239-245.
- [7] K. Toko, M. Habara, Taste Sensor, Chem. Senses, 30 (suppl 1), 2005, 256–257.
- [8] http://www.analytical-chemistry.uoc.gr/files/items/6/618/agwgimometria_2.pdf.
- [9] F. Jack, J. Piggott, A. Paterson, Cheddar cheese texture related to salt release during chewing, measured by conductivity-preliminary study, J. Food Sci, 60, 1995, 213–217.
- [10] J. Davidson, R. Linforth, A. Taylor, In-mouth measurement of pH and conductivity during eating, J. Agricult. Food Chem, 46, 1998, 5210–5214.
- [11] E. Neyraud, J. Prinz, E. Dransfield, NaCl and sugar release, salivation and taste during mastication of salted chewing gum, Physiol. Behav, 79, 2003, 731–737.
- [12] M. Emorine, P. Mielle, J. Maratray, C. Septier, Thierry Thomas-Danguin, and Christian Salles, Use of Sensors to Measure In-Mouth Salt Release During Food Chewing, Ieee Sensors Journal, 12, 2012, 3124 – 3130.
- [13] C. Christophe. Intégration de microcapteurs électrochimiques en technologies Silicium et Polymères pour l'étude du stress oxydant. Application a la biochimie cutanée. Thèse doctorat, Université de Toulouse, 2010.
- [14] V.S. Bagotsky, Fundamentals of Electrochemistry, Second Edition, 2005.
- [15] H. Wiemhofer, K. Camman, Specific Features of Electrochemical Sensors, 2, 160-189.
- [16] B. Alp, S. Mutlu, M. Multu, Glow-discharge-treated cellulose acetate (CA) membrane for a high linearity single-layer glucose electrode in the food industry, Food Research International, 33, 2000, 107-112.

- [17] F. Mizutani, S. Yabuki, Rapid determination of glucose and sucrose by an amperometric glucose-sensing electrode combined with an invertase/mutarotase-attached measuring cell, *Biosen. Bioelectron*, 12, 1997, 1013-1020.
- [18] F. Mizutani, Y. Sato, Y. Hirata, S. Yabuki, High-throughput flow-injection analysis of glucose and glutamate in food and biological samples by using enzyme/polyion complex-bilayer membrane-based electrodes as the detectors, *Biosen. Bioelectron*, 13, 1998, 809-815.
- [19] E. Palmisano, R. Centonze, P. Zambonin, Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerized thin films, *Biosen. Bioelectron*, 15, 2000, 531-539.
- [20] S. Marzouk, H. Sayour, A. Ragab, W. Cascio, S. Hassan, A simple FIA-system for simultaneous measurements of glucose and lactate with amperometric detection, *Electroanalysis*, 12, 2000, 1304-1311.
- [21] J. Wang, P. Pamidi, D. Park, Screen-printable sol-gel enzyme-containing carbon inks, *Anal. Chem*, 68, 1996, 2705-2708.
- [22] J. Wang, P. Pamidi, Sol-gel-derived gold composite electrodes, *Anal. Chem*, 69, 1997, 4490-4494.
- [23] X. Zhang, J. Wang, B. Ogorevc, U. Spichiger, Glucose Nanosensor Based on Prussian-Blue Modified Carbon-Fiber Cone Nanoelectrode and an Integrated Reference Electrode, *Electroanalysis*, 11, 1999, 945-949.
- [24] J. Wang, M. Chatrathi, B. Tian, Microseparation chips for performing multienzymatic dehydrogenase/oxidase assays: simultaneous electrochemical measurement of ethanol and glucose, *Anal. Chem*, 73, 2001, 1296-1300
- [25] A. Maines, A. Cambiaso, L. Delfino, G. Verreschi, I. Christie, P. Vadgama, Use of surfactant-modified cellulose acetate for a high-linearity and pH-resistant glucose electrode, *Anal. Commun*, 33, 1996, 27-30.
- [26] B. Appleton, T. Gibson, J. Woodward, High temperature stabilisation of immobilised glucose oxidase: potential applications in biosensors, *Sens. Actuators*, 43, 1997, 65-69.
- [27] Y. Pomeranz, C. Meloan, *Food Analysis, Theory and Practice*, 3rd ed., Chapman and Hall, New York 1994.
- [28] K. Kinnear, H. Monbouquette, An Amperometric Fructose Biosensor Based on Fructose Dehydrogenase Immobilized in a Membrane Mimetic Layer on Gold, *Anal. Chem*, 69, 1997, 1771-1775.
- [29] J. Parellada, E. Dominquez, V. Fernandez, Amperometric flow injection determination of fructose in honey with a carbon paste sensor based on fructose dehydrogenase, *Anal. Chim. Acta*, 330, 1996, 71-77.

- [30] C. Garcia, N. Graciliano de Oliveira, L. Kubota, L. Grandin, A new amperometric biosensor for fructose using a carbon paste electrode modified with silica gel coated with Meldola's Blue and fructose 5-dehydrogenase, *J. Electroanal. Chem.*, 418, 1996, 147-151.
- [31] A. Bassi, E. Lee, J. Zhu, Carbon paste mediated amperometric thin film biosensors for fructose monitoring in honey, *Food Research International*, 31, 1998, 119-127.
- [32] W. Surareungchai, S. Worasing, P. Sritongkum, M. Tanticharoen, K. Kirtikara, Dual electrode signal-subtracted biosensor for simultaneous flow injection determination of sucrose and glucose, *Anal. Chim. Acta*, 380, 1999, 7-15.
- [33] M. Kogure, H. Mori, H. Arika, C. Kojima, H. Yamamoto, Determination of sucrose using sucrose phosphorylase in a flow-injection system, *Anal. Chim. Acta*, 337, 1997, 107-111.
- [34] E. Maestre, I. Katakis, E. Dominguez, Amperometric flow-injection determination of sucrose with a mediated tri-enzyme electrode based on sucrose phosphorylase and electrocatalytic oxidation of NADH, *Biosens. Bioelectron.*, 16, 2001, 61-68.
- [35] J. Tkac, E. Sturdik, P. Gemeiner, Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase-peroxidase with and without co-immobilised beta-galactosidase, *Analyst*, 125, 2000, 1285-1289.
- [36] C. Janarthanan, H. Mottola, Enzymatic determinations with rotating bioreactors: determination of glutamate in food products, *Anal. Chim. Acta*, 369, 1998, 147-155.
- [37] A. Kwong, B. Grundig, J. Hu, R. Renneberg, Comparative study of hydrogel immobilized l-glutamate oxidases for a novel thick-film biosensor and its application in food samples, *Biotechnol. Lett.*, 22, 2000, 267-172.
- [38] A. Basu, P. Chattopadhyay, U. Roychudhuri, R. Chakraborty, A biosensor based on co-immobilized l-glutamate oxidase and l-glutamate dehydrogenase for analysis of monosodium glutamate in food, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2006, 1968-1972.
- [39] K. Changa, C. Changa, S. Choua, H. Hana, C. Chena, Characterization of a planar l-glutamate amperometric biosensor immobilized with a photo-crosslinkable polymer membrane, *Sensors and Actuators, B* 122, 2007, 195-203.
- [40] M. Oliveira, M. Pimentel, M. Montenegro, A. Araújo, M. Pimentel, V. da Silva, l-Glutamate determination in food samples by flow-injection analysis, *Anal. Chim. Acta*, 448, 2001, 207-213.
- [41] W. Khampha, J. Yakovleva, D. Isarangkul, S. Wiyakrutta, V. Meevootisom, J. Emn'eus, Specific detection of l-glutamate in food using flow-injection analysis and enzymatic recycling of substrate, *Anal. Chim. Acta*, 518, 2004, 127-135.

- [42] T. Tsukatani, K. Matsumoto, Sequential fluorometric quantification of L- aminobutyrate and L-glutamate using a single line flow-injection system with immobilized-enzyme reactors, *Anal. Chim. Acta*, 546, 2005, 154–160.
- [43] W. Khampha, V. Meevootisom, S. Wiyakrutta, Spectrophotometric enzymatic cycling method using L-glutamate dehydrogenase and D-phenylglycine aminotransferase for determination of L-glutamate in foods, *Anal. Chim. Acta*, 520, 2004, 133–139.
- [44] B. Ye, Q. Li, Y. Li, X. Li, J. Yu, L-Glutamate biosensor using a novel L-glutamate oxidase and its amplification to flow injection analysis system, *J. Biotechnol*, 42, 1995, 45–52.
- [45] K. Matsumoto, K. Sakoda, Y. Osajima, Determination of L-glutamate by amperometric flow-injection analysis using immobilized glutamate oxidase: manifold for simultaneous detection of component signal and blank signal, *Anal. Chim. Acta*, 261, 1992, 155–159.
- [46] N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, P. Clechet. *Capteurs Chimiques et Biochimiques. Technique d'ingénieur.*
- [47] G. Durand, *Potentiométrie, traité Analyse et Caractérisation, Techniques de l'Ingénieur*, avril 1983, P 2115.
- [48] P. Bergveld. Thirty years of ISFETOLOGY What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors & Actuators : B. Chemical*, 88, 2003, 1–20.
- [49] A. Amari : Etude de la réponse au pH de structures microelectroniques a membranes de nitrure de silicium fabriqué par LPCVD, Thèse de doctorat de l'UPS de Toulouse, 1984.
- [50] A.J. Bard, L.R. Faulkner : *Electrochimie, principes, méthodes et application*, Masson (1983)
- [51] K. Toko, Taste Sensor, *Sensors and Actuators*, B 64, 2000, 205–215.
- [52] K. Hayashi, M. Yamanaka, K. Toko, K. Yamafuji, Multichannel taste sensor using lipid membranes. *Sens. Actuators*, B 2, 1990, 205-213.
- [53] S. Liyama, M. Yahiro, K. Toko, Quantitative sensing of mineral water with multichannel taste sensor, *Sens. Mater*, 7, 1995, 191–201.
- [54] S. Iiyama, Y. Suzuki, S. Ezaki, Y. Arikawa, K. Toko, Objective scaling of taste of sake using taste sensor and glucose sensor, *Mater. Sci.Eng. C4*, 1996, 45–49.
- [55] Y. Kikkawa, K. Toko, T. Matsuno, K. Yamafuji, Discrimination of Taste of Amino Acids with a Multichannel Taste Sensor, *Jpn. J. Appl. Phys*, 32, 1993, 5731–5736.
- [56] K. Toko, Taste sensor with global selectivity, *Mater. Sci. Eng. C 4*, 1996, 69–82
- [57] P. Bergveld, Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurement, *Ieee Trans Biomed.*, BME 17, 1970, 70-71.

- [58] W. Sant. Développement des microcapteurs chimiques CHEMFETs pour des applications à l'hémodialyse. Thèse de doctorat, UPS de Toulouse, 2004.
- [59] A. Benyahia, Conception, réalisation et modélisation de microcapteurs pour l'analyse biochimique Application à la détection de l'urée, thèse de doctorat à l'Université Paul Sabatier Juin. 2010.
- [60] M. Henry. Physique des semiconducteurs et des composants électroniques (édition Dunod). 2001.
- [61] Y. Tsvividis. Operation and Modeling of the MOS Transistor. McGraw-Hill, Inc. New York, NY, USA, 1987.
- [62] M.L. Pourciel-Gouzy. Développement d'interfaces adaptées aux analyses biochimiques et biologiques - Application aux capteurs chimiques CHEMFETs. Thèse de doctorat, INSA de Toulouse, 2004.
- [63] I. Humenyuk. Développement des microcapteurs chimiques CHEMFETs pour l'analyse de l'eau. Thèse de doctorat, INSA de Toulouse, 2005.
- [64] L.Bousse, N. de Rooij, P.Bergveld : Operation of Chemically Sensitive Field-Effect Sensor as a function of the Insulator-Electrolyte Interface, Ieee Trans.Electron Devices, ED-30, 1983, 1263-1270
- [65] L. Bousse, The chemical sensitivity of electrolyte/insulator/silicon structures: fundamentals of ISFET operation. Thèse de doctorat, Technische Hogeschool Twente, 1982.
- [66] B. Torbiero, Développement de microcapteurs électrochimiques pour l'analyse en phase liquide. Thèse de doctorat, INSA de Toulouse, 2006.
- [67] L. Bousse, S. Mostarshed, B. van der Schoot, N. de Rooij, Comparison of the hysteresis of Ta₂O₅ and Si₃N₄ pH-sensing insulators, Sensors & Actuators, B 17, 1994, 157–160.
- [68] D. Harame, L. Bousse, J. Shott, J. Meindl, Ion-sensing devices with silicon nitride and borosilicate glass insulators”, Ieee Trans. Electron Devices, ED-34, 1987, 1700-1706.
- [69] B. Liu, Y. Su, S. Chen, Ion-sensitive field effect transistor with silicon nitride gate for pH sensing, Int. J. Electron, 1, 1989, 59-63.
- [70] A. Ismail, T. Harada, T. Yoshinobu, H. Iwasaki, M. Schöning, H. Lüth, Investigation of pulsed laser-deposited Al₂O₃ as a high pH-sensitive layer for LAPS-based biosensing applications, Sensors & Actuators, B 71, 2000, 169-172.
- [71] S. Caras, J. Janata, Field effect transistors sensitive to penicillin, Anal. Chem. 52, 1980, 1935–1937.
- [72] Y. Ito, Long-term drift mechanism of Ta₂O₅ gate pH-ISFETs, Sensors and Actuators, B 64, 2000, 152-155.

- [73] J. Janata, S. Moss, Chemically sensitive field effect transistor, *Biomed. Eng.*, 11, 1976, 241.
- [74] A. Soldatkin, A. El'Skaya, A. Ashulga, L. Netchiporouk, A. Nyamsi Hendji, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, Glucose sensitive field effect transistor with additional Nafion membrane : reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range, *Anal.Chem.Acta*, 283, 1993, 695-701
- [75] H. Seo, C. Kim, B. Sohn, T. Yeow, M. Son, M. Haskard, ISFET glucose sensor based on a new principle using the electrolysis of hydrogen peroxide, *Sens. Actuators, B* 40, 1997, 1–5.
- [76] J. Liu, L. Liang, G. Li, K. Han, K. Chen, H⁺-ISFET-based biosensor for determination of penicillin, *Biosens. Bioelectron.*, 13, 1998, 1023–1028.
- [77] A. Poghosian, Method of fabrication of ISFET-based biosensors on an Si–SiO₂–Si structure, *Sens. Actuators, B* 44, 1997, 361–364.
- [78] L. Yin, J. Chou, W. Chung, T. Sun, K. Hsiung, S. Hsiung. Glucose EnFET doped with MnO₂ powder, *Sens. Actuators, B* 76, 2001, 187–192.
- [79] K. Park, S. Choi, M. Lee, B. Sohn, S. Choi, ISFET glucose sensor system with fast recovery characteristics by employing electrolysis, *Sens. Actuators, B* 83, 2002, 90–97.
- [80] V. Volotovskiy, N. Kim, Ascorbic acid determination with an ion-sensitive field effect transistor-based peroxidase biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 359, 1998, 143–148.
- [81] A. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, Creatinine sensitive biosensor based on ISFETs and creatinine deiminase immobilised in BSA membrane, *Talanta*, 58, 2002, 351–357.
- [82] T. Mai Anh, S. Dzyadevych, A. Soldatkin, N. Ducchien, N. Jaffrezic-Renault, J. Chovelon, Development of tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for phenols determination in water solutions, *Talanta*, 56, 2002, 627–634.
- [83] A. Soldatkin, A. El'skaya, A. Shul'ga, L. Netchiporouk, A. Nyamsi Hendji, N. affrezic-Renault, C. Martelet, Glucose-sensitive field-effect transistor with additional Nafion membrane, *Anal. Chim. Acta*, 283, 1993, 695–701.
- [84] V. Volotovskiy, A. Soldatkin, A. Shul'ga, V. Rossokhaty, V. Strikha, A. El'skaya, Glucose-sensitive ion-sensitive field-effect transistor-based biosensor with additional positively charged membrane. Dynamic range extension and reduction of buffer concentration influence on the sensor response, *Anal. Chim. Acta*, 322, 1996, 77–81.
- [85] V. Volotovskiy, N. Kim. Cyanide determination by an ISFET-based peroxidase biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 13, 1998, 1029–1033.
- [86] S. Dzyadevich, Y. Korpan, V. Arkhipova, M. Alesina, C. Martelet, A. El'skaya, A. Soldatkin, Application of enzyme field-effect transistor for determination of glucose concentrations in blood serum, *Biosens. Bioelectron.*, 14, 1999, 283–287.

- [87] A. Soldatkin, D. Gorchkov, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Application of charged polymeric materials as additional permselective membranes for modulation of the working characteristics of penicillin sensitive ENFETs, *Mater. Sci. Eng, C* 5, 1997, 35–40.
- [88] C. Jiménez, J. Bartrol'ý, N. de Rooij, M. Koudelka-Hep, Use of photopolymerizable membranes based on polyacrylamide hydrogels for enzymatic microsensor construction, *Anal. Chim. Acta*, 351, 1997, 169–176.
- [89] C. Puig-Lleixà, C. Jiménez, J. Alonso, J. Bartrol'ý. Polyurethane-acrylate photocurable polymeric membrane for ion-sensitive field-effect transistor-based urea biosensors, *Anal. Chim. Acta*, 389, 1999, 179–188.
- [90] J. Muñoz, C. Jimenez, A. Bratov, J. Bartrol'ý, S. Alegret, C. Dominguez. Photosensitive polyurethanes applied to the development of ChemFET and EnFET devices for biomedical sensing, *Biosens. Bioelectron*, 12, 1997, 577–585.
- [91] A. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C. Martelet, N. Jaffrezic- Renault. Development of potentiometric creatinine-sensitive biosensor based on ISFET and creatinine deiminase immobilised in PVA/SbQ photopolymeric membrane, *Mater. Sci. Eng, C* 21, 2002, 75–79.
- [92] A. Kharitonov, M. Zayats, A. Lichtenstein, E. Katz, I. Willner, Enzyme monolayer-functionalized field-effect transistor for biosensor applications, *Sens. Actuators, B* 70, 2000, 222–231.
- [93] A. Flounders, A. Singh, J. Volponi, S. Carichner, K. Wally, A. Simonian, J. Wild, J. Schoeniger, Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part II. Sol–gel modified field effect transistor with immobilized organophosphate hydrolase, *Biosens. Bioelectron*, 14, 1999, 715–722.
- [94] Y. Xiao, H. Ju, H. Chen, Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer, *Anal. Chim. Acta*, 391, 1999, 73–82.
- [95] J. Jia, B. Wang, A. Wu, G. Cheng, Z. Li, S. Dong, A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol–gel network, *Anal. Chem*, 74, 2002, 2217–2223.
- [96] Z. Chen, X. Ou, F. Tang, L. Jiang, Effect of nanometer particles on the adsorbability and enzymatic activity of glucose oxidase, *Colloids Surf. B: Biointerf*, 7, 1996, 173–179.
- [97] M. Qhobosheane, S. Santra, P. Zhang, W. Tan, Biochemically functionalized silica nanoparticles, *Analyst*, 126, 2001, 1274–1278.
- [98] L. Hilliard, X. Zhao, W. Tan, Immobilization of oligonucleotides onto silica nanoparticles for DNA hybridization studies, *Anal. Chim. Acta*, 470, 2002, 51–56.
- [99] S. Takagi, K. Toko, K. Wada, T. Ohki, Quantification of suppression of bitterness using an electronic tongue, *J. Pharm. Sci*, 90, 2001, 2042–2048.

- [100] J. Kim, H. Byun, D. Kim, Y. Ham, W. Jung, C. Yoon, A simple taste analyzing system design for visual and quantitative analysis of different tastes using multi-array chemical sensors and pattern recognition techniques, *Talanta*, 70, 2006, 546–555.
- [101] Alpha MOS web page <http://www.alpha-mos.com>.
- [102] F. Sauvage, E. Baudrin, J. Tarascon, Study of the potentiometric response towards sodium ions of $\text{Na}_{0.44-x}\text{MnO}_2$ for the development of selective sodium ion sensors, *Sensors and Actuators, B* 120, 2007, 638–644.
- [103] U. Oesch, S. Caras, J. Janata, Field effect transistors sensitive to sodium and ammonium ions, *Analytical Chemistry*, 53, 1981, 1983–1986.
- [104] J. Brunink, J. Haak, J. Bomer, D. Reinhoudt, Chemically modified field effect transistors; a sodium ion selective sensor based on calix[4] arene receptor molecules, *Analytica Chimica Acta*, 254, 1991, 75–80.
- [105] J. Brunink, R. Lugtenberg, Z. Brzozka, J. Engbersen, D. Reinhoudt, The design of durable Na^+ selective ChemFETs based on polysiloxane membranes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 378, 1994, 185–200.
- [106] Z. Baccar, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, H. Jaffrezic, G. Marest, A. Plantier, Sodium microsensors based on ISFET/REFET prepared through an ion-implantation process fully compatible with a standard silicon technology, *Sensors and Actuators, B* 32, 1996, 101–105
- [107] C. Liao, J. Chou, T. Sunc, S. Hsiung, J. Hsieh. Preliminary investigations on a glucose biosensor based on the potentiometric principle, *Sensors and Actuators, B* 123, 2007, 720–726.
- [108] C. Lee, H. Seo, Y. Lee, B. Cho, H. Jeong, B. Sohn, All solid type ISFET glucose sensor with fast response and high sensitivity characteristics, *Sens. Actuators, B* 64, 2000, 37–41.
- [109] L. Yin, J. Chou, W. Chung, T. Sun, K. Hsiung, S. Hsiung, Glucose biosensor doped with MnO_2 powder, *Sens. Actuators, B* 76, 2001, 187–192.
- [110] X. Luo, J. Xu, W. Zhao, H. Chen. Glucose biosensor based on EnFET doped with SiO_2 nanoparticles, *Sensors and Actuators, B* 97, 2004, 249–255.
- [111] X. Luo, J. Xu, W. Zhao, H. Chen. A novel glucose EnFET based on the special reactivity of MnO_2 nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 2004, 1295–1300.
- [112] H. Seo ay, C. Kim, B. Sohn, T. Yeow, M. Son, Malcolm Haskard, ISFET glucose sensor based on a new principle using the electrolysis of hydrogen peroxide, *Sensors and Actuators, B* 40, 1997, 1–5.
- [113] K. Yao, Y. Zhu, X. Yang, C. Li, EnFET glucose biosensor produced with dendrimer encapsulated Pt nanoparticles, *Materials Science and Engineering, C* 28, 2008, 1236–1241

- [114] S. Leea, K. Sawadaa, H. Takaoa, M. Ishidaa, An enhanced glucose biosensor using charge transfer techniques, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2008, 650–656.
- [115] D. Braekena, D. Randa, A. Andrei, R. Huys, M. Spirac, S. Yitzchaikd, J. Shappire, G. Borghsa, G. Callewaertb, C. Bartic, Glutamate sensing with enzyme-modified floating-gate field effect transistors, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2009, 2384–2389.
- [116] W. Kondrat, K. Kanamori, D. Ross, In vivo microdialysis and gaschromatography/mass-spectrometry for ¹³C-enrichment measurement of extracellular glutamate in rat brain, *Journal of Neuroscience Methods*, 120, 2002, 179-192.
- [117] P. Hanko, V. Rohrer, S. Jeffrey, Determination of amino acids in cell culture and fermentation broth media using anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry*, 324, 2004, 29-38.
- [118] E. Coppola, S. Christie, J. Hanna, Fast, short-column separation and fluorometric determination of monosodium glutamate in foods, *J.A.O.A.C.*, 58, 1975, 58–61.
- [119] O. Orwar, K. Jardemark, I. Jacobson, A. Moscho, H. Fishman, R. Scheller, R. Zare, Patch-clamp detection of neurotransmitters in capillary electrophoresis, *Science*, 272, 1996, 1779–1782.
- [120] T. Gündüz, N. Gündüz, E. Kiliç, F. Köseoğlu, S. Öztas, Titrations in non-aqueous media, Part X. Potentiometric and conductimetric titrations of amino acids with tetrabutylammonium hydroxide in pyridine and acetonitrile solvents. *Analyst*, 113, 1988, 715–719.
- [121] R. Shi, K. Stein, Flow injection methods for determination of L-glutamate using glutamate decarboxylase and glutamate dehydrogenase reactors with spectrophotometric detection, *The Analyst*, 121, 1996, 1305-1309.
- [122] Z. Liu, O. Niwa, T. Horiuchi, R. Kurita, K. Torimitsu, NADH and glutamate on-line sensors using Os-HRP/GC electrodes modified with NADH oxidase and glutamate dehydrogenase. *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 1999, 631-638.
- [123] D. Ling, G. Wu, C. Wang, F. Wang, G. Song, The preparation and characterization of an immobilized L-glutamic decarboxylase and its application for determination of L-glutamic acid, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 2000, 516-521.
- [124] M. Oliveira, C. Pimentel, C. Montenegro, A. Araujo, F. Pimentel, V. Silva. L-Glutamate determination in food samples by flow-injection analysis, *Analytica Chimica Acta*, 448, 2001, 207-213.
- [125] M. Qhobosheane, D. Wu, Y. Gu, W. Tan. A two-dimensional imaging biosensor to monitor enhanced brain glutamate release stimulated by nicotine, *Journal of Neuroscience Methods*, 135, 2004, 71-78.
- [126] B. Rodriguez, J. Bolbot, I. Tothill, Development of urease and glutamic dehydrogenase amperometric assay for heavy metals screening in polluted samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 2004, 1157-1167.

- [127] H. Kusakabe, Y. Midorikawa, T. Fujishima, A. Kuninaka, H. Yoshino, Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X- 119-6 grown on wheat bran, *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 1983, 1323-1328.
- [128] S. Fukunaga, S. Yuno, M. Takahashi, S. Taguchi, Y. Kera, S. Odani, R. Yamada, Purification and properties of D-glutamate oxidase from *Candida boidinii* 2201, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85, 1998, 579-583.
- [129] A. Bohmer, A. Muller, M. Passarge, P. Liebs, H. Honeck, H. Muller. A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus* purification and properties, *European Journal of Biochemistry*, 182, 1989, 327- 332.
- [130] R. Villarta, D. Cunningham, G. Guilbault. Amperometric enzyme electrodes for the determination of L-glutamate. *Talanta*, 38, 1991, 49-55.
- [131] N. Almeida, A. Mulchandani. A mediated amperometric enzyme electrode using tetrathiafulvalene and glutamate oxidase for the determination of L-glutamic acid, *Analytica Chimica Acta*, 282, 1993, 353-361.
- [132] E. Zilkha, T. Obrenovitch, A. Koshy, H. Kusakabe, H. Bennetto. Extracellular glutamate-on-line monitoring using microdialysis coupled to enzyme- amperometric analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, 60, 1995, 1-9.
- [133] O. Niwa, T. Horiuchi, K. Torimitsu. Continuous monitoring of L-glutamate released from cultured nerve cells by an online sensor coupled with micro-capillary sampling, *Biosensors and Bioelectronics*, 12, 1997, 311-319.
- [134] K. Chang, W. Hsu, H. Chen, C. Chang, C. Chen, Determination of glutamate pyruvate transaminase activity in clinical specimens using a biosensor composed of immobilized-glutamate oxidase in a photo-crosslinkable polymer membrane on a palladium-deposited screenprinted carbon electrode, *Analytica Chimica Acta*, 481, 2003, 199-208.
- [135] C. Chen, Y. Su, Amperometric L-glutamate sensor using a novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces platensis* NTU 3304, *Analytica Chimica Acta*, 243, 1991, 9-15.
- [136] Y. Bang-Ce, L. Qing-Shan, L. You-Rong, L. Xiao-Bo, Y. Jun-Tang, L-glutamate oxidase and its application to flow injection analysis system. *Journal of Biotechnology*, 42, 1995, 45-52.
- [137] K. Matsumoto, W. Asada, R. Murai, Simultaneous biosensing of inosine monophosphate and glutamate by use of immobilized enzyme reactors, *Analytica Chimica Acta*, 358, 1998, 127-136.
- [138] S. Udomsopagit, M. Suphantharika, W. Kunnecke, U. Bilitewski, A. Bhumiratana. Determination of L-glutamate in various commercial soy sauce products using flow injection analysis with a modified electrode, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 1998, 543-549.

[139] E. Valero, F. Garcia-Carmona. A continuous spectrophotometric method based on enzymatic cycling for determining L-glutamate. *Analytical Biochemistry*, 259, 1998, 265-271.

[140] T. Yao, S. Suzuki, T. Nakahara, H. Nishino. Highly sensitive detection of Lglutamate by on-line amperometric micro-flow analysis based on enzymatic substrate recycling, *Talanta*, 45, 1998, 917-923.

[141] T. Kamel, K. Asano, H. Suziki, M. Matsuzaki, S. Nakamura, Lglutamate oxidase from *Streptomyces violascens*, Production, isolation and some properties, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 31, 1983, 1307–1314.

[142] A.S. Fouda, Electrochemical production of copper oxides and their uses as indicator electrodes, *J. Electroanal. Chem*, 110, 1980, 357–360.

CHAPITRE II

REALISATION ET CARACTERISATION TECHNOLOGIQUE

Introduction

Nous présenterons dans ce chapitre la conception, la réalisation et la caractérisation des microcapteurs chimiques pH-ChemFETs. Nous commençons par le dessin de masques qui permet de définir les motifs et le design du microcapteur. Une fois le jeu de masques mis en place, nous passons à l'étape de réalisation des pH-ChemFETs dans la plateforme technologique du LAAS. Ensuite nous détaillons la technique d'encapsulation pour les puces ChemFETs utilisées.

I. Conception des Masques photolithographiques

Les masques ont été conçus et réalisés en utilisant le logiciel dédié Clewin. Le principe adopté pour mener à bien ce projet est de concevoir les transistors EnFET/ElecFET selon un même procédé technologique (figures II.1 et II.2). En parallèle, un transistor MOS de test a été réalisé en ajoutant une couche métallique de grille sur la zone sensible Si_3N_4 (figure II.3).

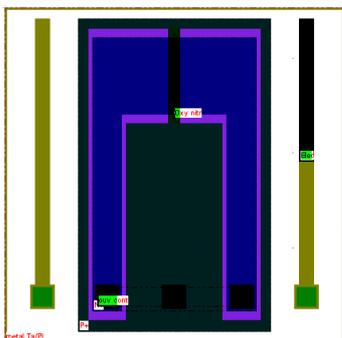


Figure II.1. Dessin du masque d'un ChemFET

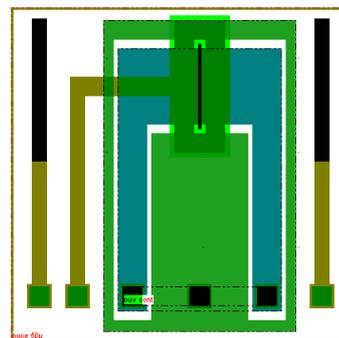


Figure II.2. Dessin du masque d'un ElecFET

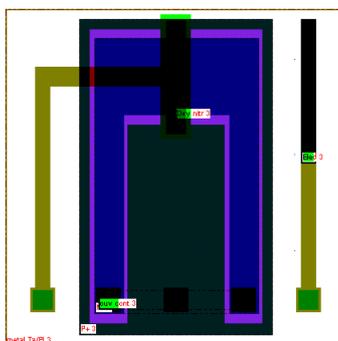


Figure II.3. Dessin du masque d'un transistor MOSFET

Les différents composants (MOSFET, ChemFET, ElecFET) ont finalement été agencés de manière optimisée par rapport à un substrat 4 pouces (figure II.4).

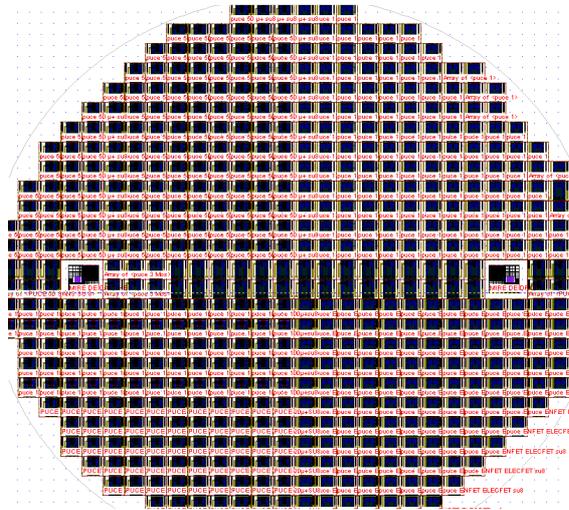


Figure II.4. Dessin du masque d'un substrat contenant une centaine de puces

La réalisation de ces composants a été faite en plusieurs étapes technologiques qui ont nécessité huit niveaux de masques (Figure II.5).

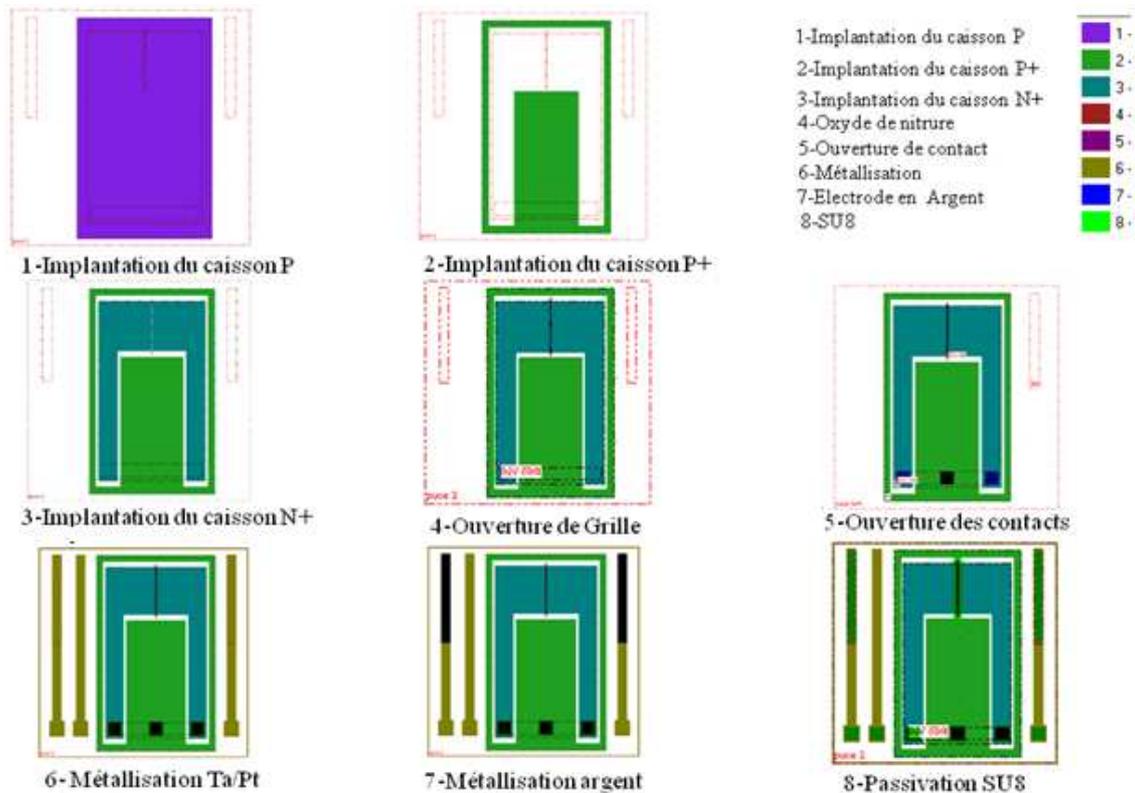


Figure II.5. Les huit niveaux de masque pour la réalisation d'un ChemFET

En utilisant les techniques de photolithographie, on transfère les formes géométriques du masque sur les substrats. L'idée consiste à déposer une couche mince de résine photosensible pour revêtir la plaquette, suivie d'une insolation UV à travers un masque qui limitera l'exposition sur les zones désirées et par une attaque chimique (AZ développeur) la résine sera retirée des zones définies par le masque d'exposition [1].

I.1 Description du procédé standard de photolithographie (Masques 1 à 5)

La photolithographie standard se déroule selon les séquences suivantes:

- Préparation du substrat: déshydratation à l'étuve (200 °C) pendant 20 minutes, puis passage au HMDS (Héxaméthylsilazane) 30 minutes, afin de promouvoir l'adhérence de la résine photolithographique sur l'oxyde de silicium SiO_2 .
- Dépôt de résine PFI 1 μm d'épaisseur.
- Alignement et exposition (figure II.6).
- Développement (AZ développeur) et recuit.

Une fois la résine photosensible exposée enlevée, la plaquette est recuite à une température basse de 115 ° C pendant 1 minute afin de durcir la résine photosensible restante.

Notons que l'image du masque a seulement été transférée sur la résine photosensible. Cette dernière va être utilisée comme un masque temporaire pour graver l'oxyde dans un bain d'acide fluorhydrique.

- Gravure chimique de l'oxyde (buffer HF : 15min) (cette étape est nécessaire que pour la gravure de l'oxyde)
- Elimination de la résine photosensible: rinçage à l'acétone et à l'eau déionisée (EDI).



Figure II.6. Machine d'alignement et d'insolation Karl Suss MA150

I.2 Description du procédé de photolithographie par "Lift-Off" (Masques 6 et 7)

Le "lift-off" consiste à déposer sur le substrat une couche mince métallique [2,3], soit par évaporation sous vide, soit par pulvérisation cathodique (sputtering). La couche de matériau (Tantale/Platine/Argent) se dépose tant sur la résine restant après le développement que sur la surface du substrat (Figure II.7b).

Lorsque le substrat est immergé dans un solvant fort (Acétone), la résine sera dissoute (Figure II.7c). Par conséquent, uniquement les parties du matériau étant directement en contact avec le substrat vont subsister et reproduire le motif (Figure II.7d).

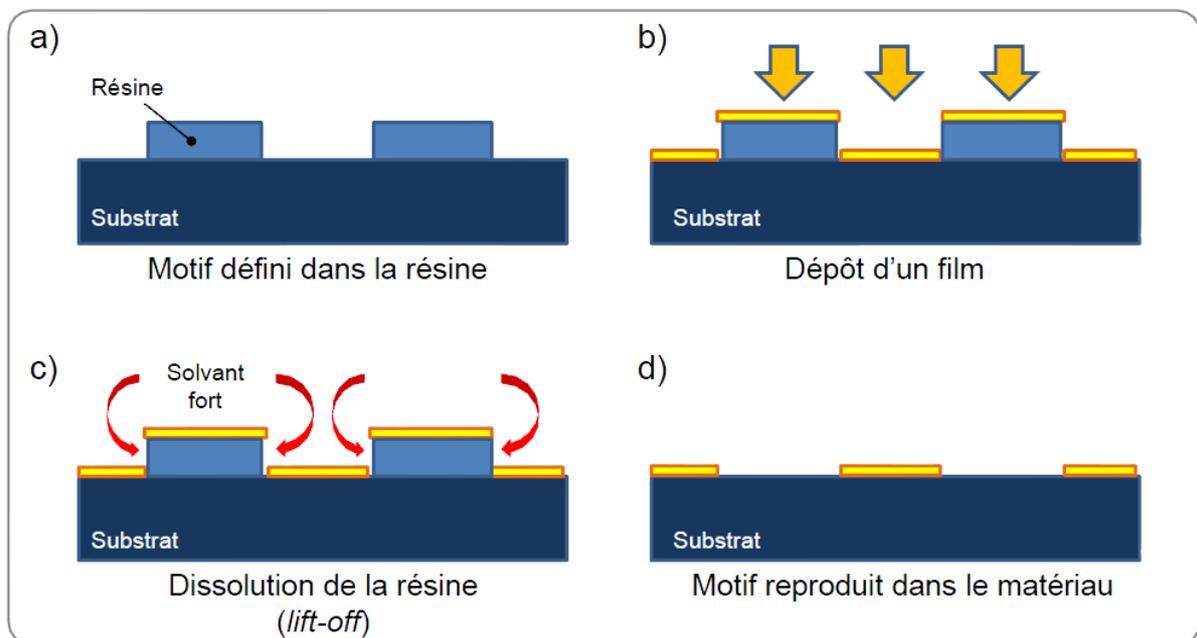


Figure II.7. Schéma représentant le principe du procédé du lift-off

Le dépôt de la résine par lift-off se fait en suivant les séquences suivantes :

- Préparation du substrat (nettoyage, déshydratation, promoteur d'adhérence)
- Enduction à la tournette de la résine NLOF 2,5 μ m (pré-recuit, détourage),
- Insolation U.V. à travers le masque
- Recuit
- Alignement et Insolation
- Développement (AZ remover)
- Post-recuit.

II. Technologie de fabrication

Nous avons choisi un substrat silicium d'orientation « 100 » de type N (525 μ m), avec une concentration en dopants de 10^{13} atm/cm³. La taille du substrat est de 4 pouces [4,5]. Notons que les figures ne représentent pas les dimensions réelles mais permettent d'illustrer simplement les étapes de fabrication.

II.1 Nettoyage du substrat

Cette étape est répétée durant tout le processus afin d'éliminer toutes les impuretés sur la surface de la plaquette [6]:

- Nettoyage des plaquettes dans le bain H₂SO₄ (90%) : H₂O₂ (10%) [1:1] pendant 30 secondes.
- Rinçage des plaquettes dans un b cher contenant de l'EDI pendant 5 minutes avec mesure de résistivité (11 M Ω ·cm) et séchage sous azote.
- Immersion 30 secondes dans une solution tampon 10% d'HF suffisante pour éliminer la couche d'oxyde contenant les impuretés et résidus.
- Rinçage des plaquettes dans l'EDI et séchage sous azote

Une mince couche d'oxyde de silicium est formée, cette couche d'oxyde piège les impuretés organiques et les ions Na⁺ sur la surface. Elle est finalement retirée afin d'assurer la propreté de la plaquette.

II.2 Oxydation de champ

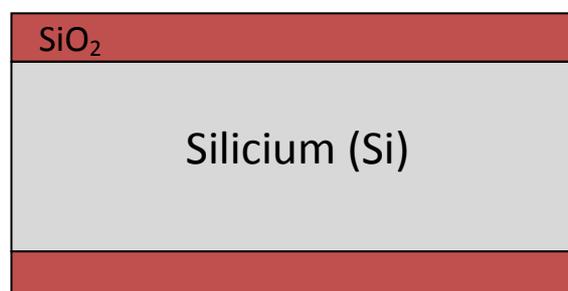


Figure II.8. Oxydation de champ

Une couche d'oxyde de silicium SiO₂ est utilisée pour masquer et protéger les zones non soumises à différentes opérations futures (implantations, recuits,...). Le substrat est placé

dans un four d'oxydation à haute température (1150°C) pendant 3 heures. Au cours de cette étape, une couche de SiO₂ thermique (800 nm) est formée par oxydation humide.

II.3 Photogravure de l'oxyde de champ (Masque 1)

Après oxydation, la plaquette de silicium est entièrement recouverte d'oxyde de silicium. Cet oxyde protège les zones non traitées et empêchera les dopants d'atteindre toute la plaquette de silicium.

Cette étape est destinée à graver l'oxyde de masquage pour former le caisson P et les zones actives, comme le montre la figure II.9. Elle se déroule selon les étapes de photolithographie standard (paragraphe I.1)

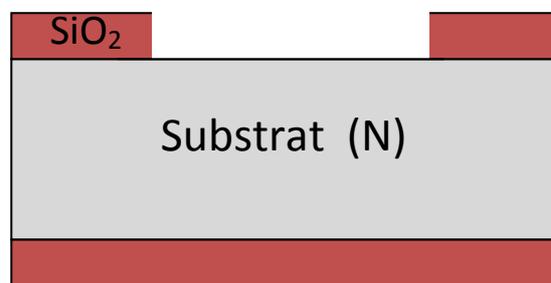


Photo II.9. Gravure d'oxyde

II.4 Oxyde de pré-implantation (40nm) et Implantation du caisson P (Masque 1)

Au cours de cette étape, une couche mince de 40 nm d'oxyde de silicium est formée par oxydation sèche à une température de 1000°C pendant 45 minutes (Figure II.10). A travers cette couche, on implante les dopants successivement du bore et de l'arsenic pour créer des caissons profonds P⁺ puis les zones actives N⁺ (drain, source).

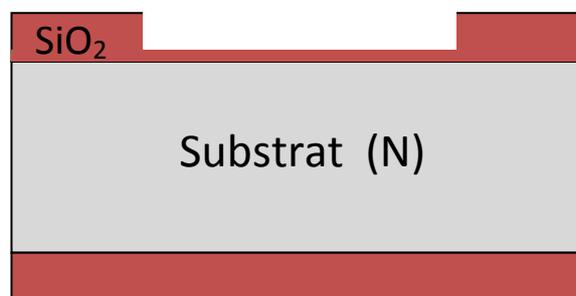


Figure II.10. Oxydation de pré-implantation

L'implantation d'ions est une technique à basse température pour introduire des impuretés (dopants) dans la plaquette de silicium et offre une plus grande flexibilité que la diffusion.

Elle est utilisée pour régler avec précision la tension de seuil. L'énergie des ions détermine à quelle profondeur ils vont pénétrer dans la plaquette, tandis que le courant de faisceau et le temps d'exposition déterminent la dose d'implantation.

Le dopage du caisson est effectuée par une implantation de bore ($E=50$ keV, Dose = 10^{12} at/cm², Temps d'implantation = 78 secondes, Courant = $0,4\mu\text{A}$). Le système d'implantation d'ions dirige et balaie un faisceau d'ions sur la surface de la plaquette de silicium.

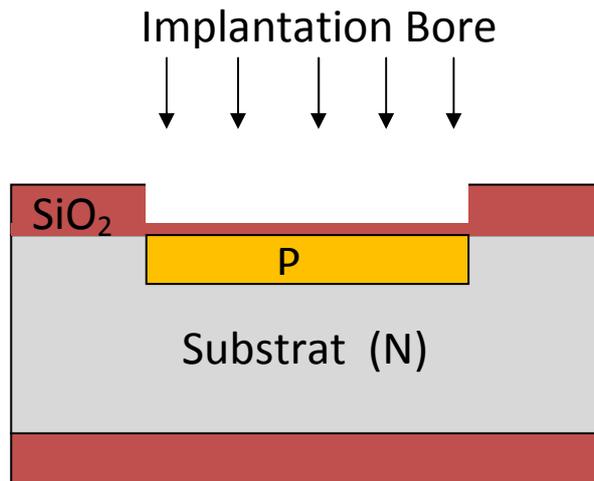


Figure II.11. Implantation du caisson P (Bore)

II.5 Recuit de diffusion

L'implantation est suivie par une étape de recuit thermique à 1150°C pendant 90 minutes qui permet de redistribuer profondément et activer électriquement les atomes de bore implantés dans le silicium mais aussi de réduire les défauts cristallins créés par l'implantation ionique. L'oxyde de pré-implantation est conservé et permet d'éviter une exodiffusion du bore (figure12).

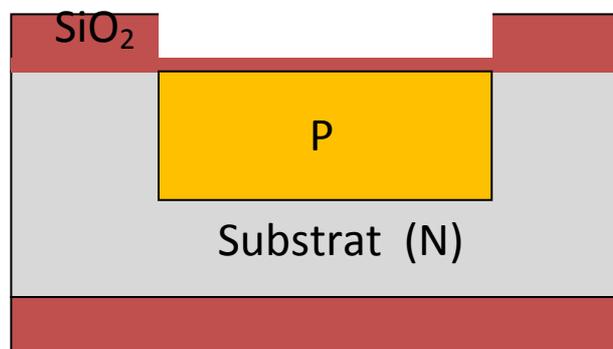


Figure II.12. Recuit de diffusion

II.6 Implantation des anneaux de garde P⁺ (Masque 2)

L'implantation d'un caisson P⁺ en bore (E=50 keV, dose=10¹⁶ at/cm², Courant = 80 μA, Temps d'implantation = 40 minutes) sert d'anneau de garde qui a pour but de collecter les courants parasites avant qu'ils n'atteignent les zones sensibles du composant (figure II.13).

Ce caisson permet de limiter la conduction d'un courant de fuite surfacique grâce à la jonction PN ainsi créée.

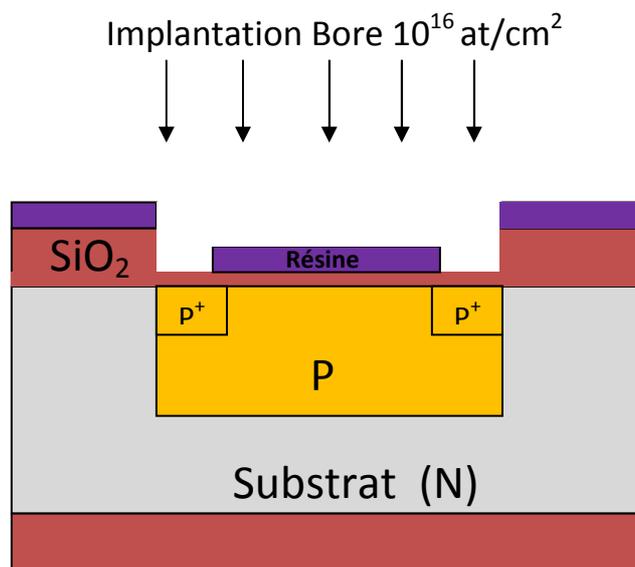


Figure II.13. Implantation des anneaux de garde (P⁺)

Notons qu'une fois l'implantation faite, la résine ayant été fortement échauffée durant cette étape, elle ne se retire pas simplement par un rinçage à l'acétone mais nécessite un plasma O₂ de 45 minutes ou plus pour dissocier tous les composés volatils (CO, CO₂, H₂O...).

II.7 Implantation des zones actives source et drain (Masque 3)

Les zones actives source et drain sont réalisées par implantation d'ions arsenic à travers l'oxyde de pré-implantation (figure II.14). Elle permet un contrôle précis de l'énergie du faisceau, et par conséquent de la distribution en profondeur des impuretés implantées en connaissant parfaitement la dose introduite de 10¹⁶ at/cm² avec une énergie de 100 keV, un courant de 75μA et temps d'implantation de 34 minutes.

La procédure se termine par le nettoyage de la résine au plasma oxygène (O₂ pendant 45 minutes).

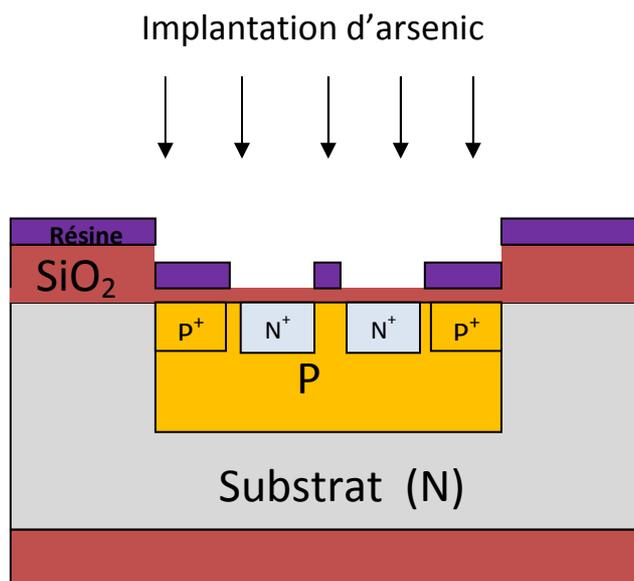


Figure II.14. Implantation d'arsenic

II.8 Redistribution sous atmosphère oxydante (600nm)

Cette étape a pour but de redistribuer plus profondément et d'activer électriquement les atomes de bore et d'arsenic (les zones P⁺ et N⁺). En parallèle, elle permet de réduire les défauts cristallins créés par l'implantation ionique. Cette redistribution a lieu sous ambiance oxydante, faisant ainsi croître un oxyde protecteur de 600 nm. Le cycle thermique de la redistribution a été optimisé en tenant compte de la diffusion du caisson d'isolation durant le bilan thermique. Il est caractérisé par une oxydation humide à température 1150 °C pendant deux heures (figure II.15).

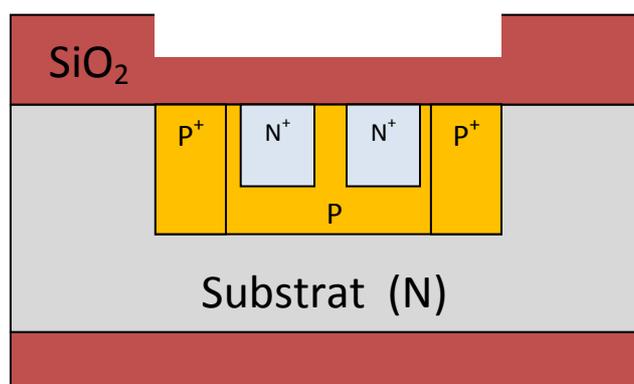


Figure II.15. Redistribution sous ambiance oxydante

II.9 Ouverture de la grille (Masque 4)

Cette étape est destinée à graver l'oxyde déjà formé afin de réaliser l'oxyde de grille avec une épaisseur désirée.

Une attaque chimique dans un bain HF (10%) permet de graver l'oxyde de silicium (figure II.16).

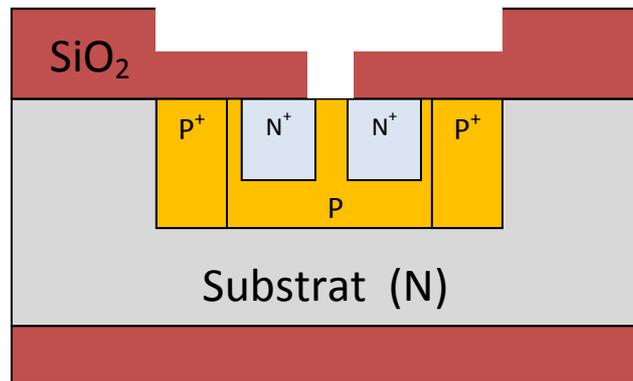


Figure II.16. Ouverture de grille

II.10 Nettoyage RCA (avant oxydation de grille)

Cette étape est très critique, il faut que la surface en silicium soit extrêmement propre avant l'oxydation de grille. Nous avons donc fait le choix du nettoyage RCA qui, par ses différentes étapes, permet de retirer tout type de contaminants organiques, ioniques et liés aux métaux lourds. Ce nettoyage des plaquettes utilise six bains successifs [7].

- Un bain d'acide nitrique HNO_3 à 80°C pendant 10 minutes pour oxyder la surface du silicium (quelques nanomètres) tout en détruisant la plupart des composés organiques présents sur le substrat suivi d'un rinçage EDI et d'un séchage sous azote.
- Un bain de HF 10% pendant 30 secondes pour enlever l'oxyde superficiel suivi d'un rinçage EDI et un séchage sous azote.
- Un bain d'ammoniaque NH_4OH (28%) et d'eau oxygénée H_2O_2 (30%) + E.D.I. [1 :1 :5] à 80°C pendant 10 minutes, pour retirer les contaminations organiques et métalliques, suivi d'un rinçage EDI et d'un séchage sous azote.
- Un bain d'acide chlorhydrique HCl (37%) + eau oxygénée H_2O_2 (30%) + E.D.I. [1 :1 :6] à 80°C pendant 5 minutes pour enlever les contaminants métalliques, suivi d'un rinçage EDI et d'un séchage sous azote.

- Un bain de HF 10% pendant 30 secondes pour enlever l'oxyde superficiel formé précédemment suivi d'un dernier rinçage EDI et d'un séchage sous azote.

II.11 Oxydation de grille (50nm)

Après le nettoyage RCA, les plaques doivent être enfournées immédiatement pour éviter toute contamination de la surface. L'oxydation de grille des composants ChemFETs est une étape qui va influencer sur les propriétés électriques du transistor, il est important de bien contrôler l'épaisseur et la qualité de cet oxyde de silicium SiO_2 . Cette étape est réalisée par oxydation thermique sèche du silicium à une température de 1000 °C pendant 45 minutes. Elle permet d'assurer la croissance d'une mince couche de SiO_2 de 50 nm d'épaisseur de bonne qualité diélectrique (Figure II.17).

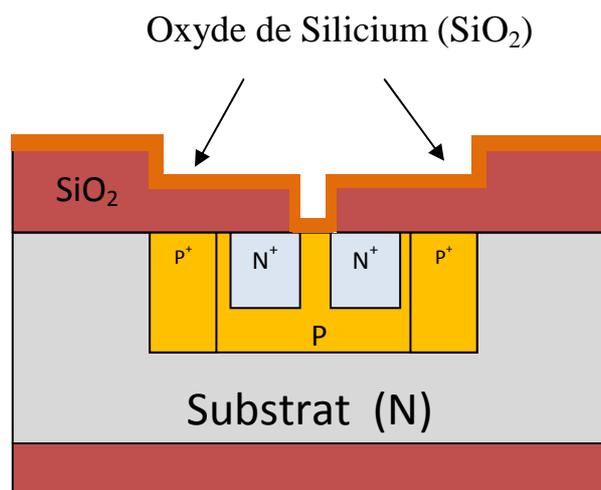


Figure II.17. Oxyde de grille

II.12 Dépôt de nitrure de silicium par LPCVD (50nm)

Nous déposons une couche de nitrure de silicium Si_3N_4 de 50 nm d'épaisseur par dépôt chimique en phase vapeur sous basse pression (LPCVD), 20 μm de largeur et 900 μm de longueur. Cette couche de bonne qualité diélectrique est utilisée comme une membrane sensible au potentiel hydrogène (pH).

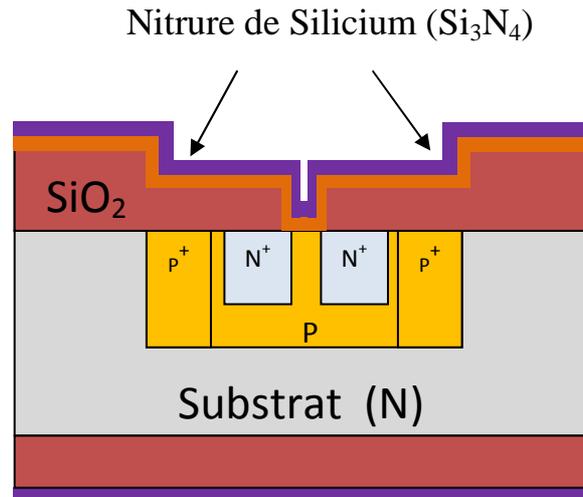


Figure II.18. Dépôt de nitrure de Silicium

II.13 Ouverture des contacts (Masque 5)

En suivant les techniques de photolithographie, nous définissons les zones d'ouvertures qui assureront de bons contacts électriques entre le métal et les zones actives du composant (drain, source, substrat). L'ouverture des contacts consiste à attaquer le nitrure de silicium Si_3N_4 par une gravure plasma RIE (bâti ICP₃, puissance : 40 W, gaz : CF_4/O_2 , temps de gravure : 1 minute) et l'oxyde de silicium par gravure humide (buffer HF) pendant 10 minutes pour réaliser les ouvertures de contact avant le dépôt de métal (Figure II.19).

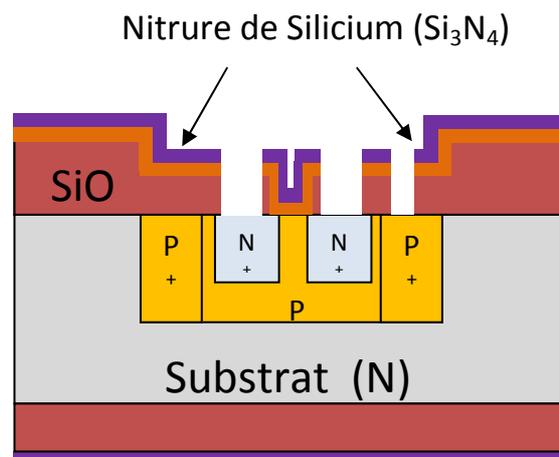


Figure II.19. Ouverture de contact

II.14 Métallisation tantale /platine (Masque 6)

Cette étape sert à former des contacts fiables sur les zones actives du composant et réaliser les microélectrodes de références et de polarisation (puce ElecFET). Les couches tantale/platine (Ta/Pt) ont été déposées sur la surface de la plaquette par évaporation thermique 50nm/200nm (bâti : bicluster, vitesse de dépôt du tantale /platine : 0,3 nm/s et 0,9 nm/s). Le platine est connu pour ses difficultés d'accroche sur un substrat de silicium d'où l'utilisation d'une couche de tantale comme couche d'accroche. (Figure II.20).

Le dépôt de la résine se fait par "Lift off" en suivant les séquences décrites dans le paragraphe I.2

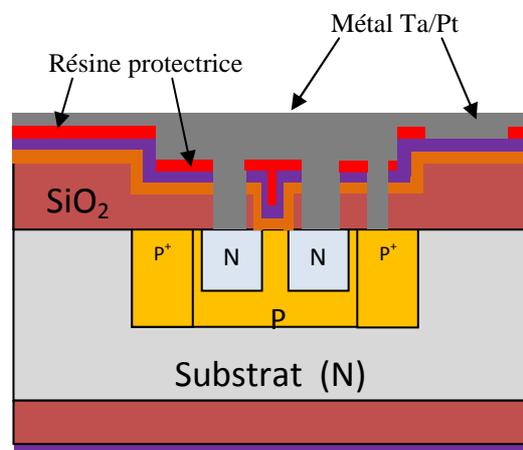


Figure II.20. Photolithographie "Lift off" et métallisation Ta/Pt

La dernière étape est le retrait de la résine, pour cela nous passerons le substrat dans un bain d'acétone, ainsi le métal déposé sur la résine va s'enlever (Figure II.21).

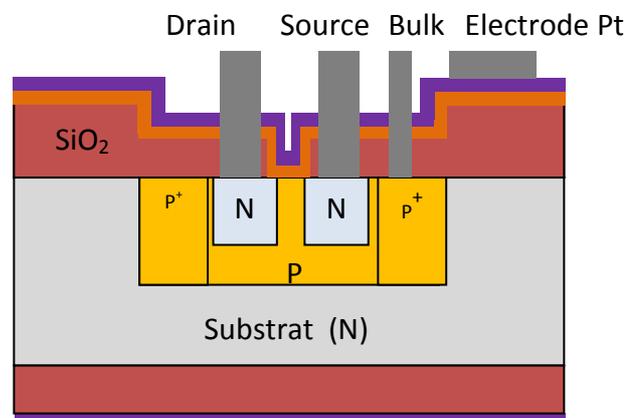


Figure II.21. Contact métallique Tantale/platine

II.15 Recuit de Métallisation

Dés que la résine est totalement retirée, nous avons recuit des plaquettes pendant 20 minutes sous azote hydrogéné à 250°C. Cette étape diminue les contraintes dans les zones métallisées et améliore les propriétés d'accrochage de la couche métallique.

II.16 Métallisation Argent (Masque 7)

Dans cette étape, nous déposons de l'argent sur le bout de la future électrode de référence. Donc, après une étape de photolithographie " lift-off ", nous déposons l'argent par évaporation (Bâti : VEECO, épaisseur 400 nm, vitesse de dépôt 20 Å/min) et le résultat obtenu est schématisé sur la figure 22.

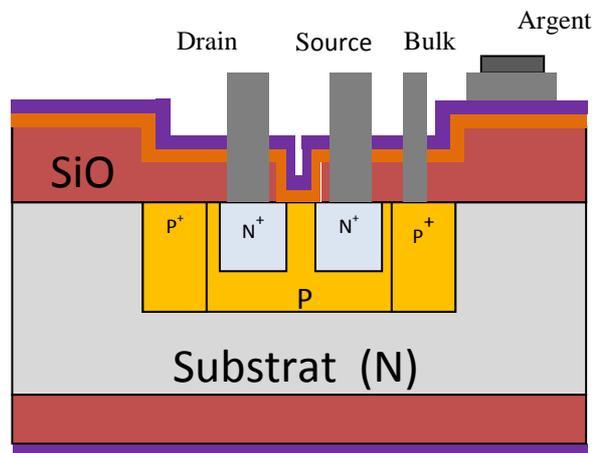


Figure II.22. Dépôts d'argent sur l'électrode

II.17 Encapsulation Su8 (Masque 8)

Cette dernière étape avant la découpe du substrat a pour but d'éviter tout contact entre l'électrode en platine et le milieu liquide conducteur (prévention des courants de fuite). Pour ce faire nous allons recouvrir tout le composant d'une résine épaisse de passivation, la SU8. Cette résine est une formulation photosensible récente composée principalement de résine époxyde. Elle résulte de recherches dans le domaine d'application des polymères époxy à la microélectronique. Les résines époxydes présentent des propriétés chimiques, physico-chimiques, mécaniques et physiques intéressantes : une bonne résistance chimique et mécanique, une excellente adhésion sur la plupart des substrats, une bonne isolation électrique

et thermique, et finalement de bonnes propriétés d'imperméabilisation. C'est pour toutes ces raisons que nous l'avons choisie.

Pour le fonctionnement, nous laisserons des ouvertures, une au niveau de la zone sensible, une seconde dans la partie argentée de l'électrode, et des fenêtres au niveau des prises de contact.

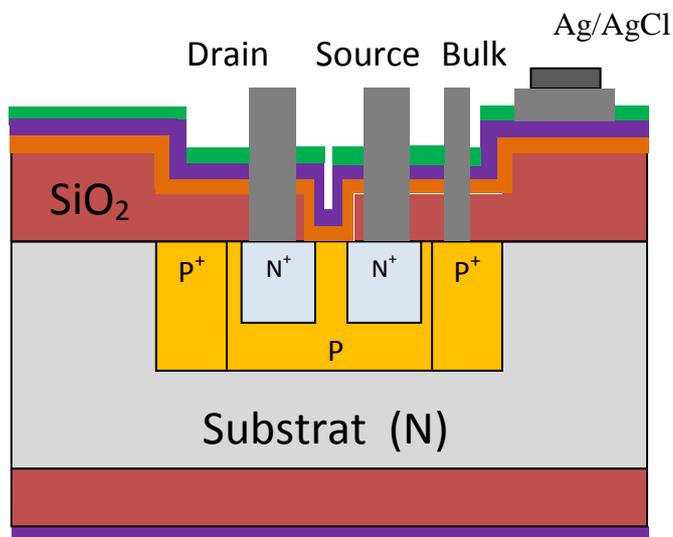


Figure II.23. Passivation Su8

La figure II.23 montre la couche de passivation déposée sur toute la surface avec des ouvertures pour les prises de contact, le canal et la partie argentée de l'électrode. Après cette étape le procédé technologique est terminé et nous pouvons passer aux premiers tests avant découpe et montage sur PCB (Figure II.24).

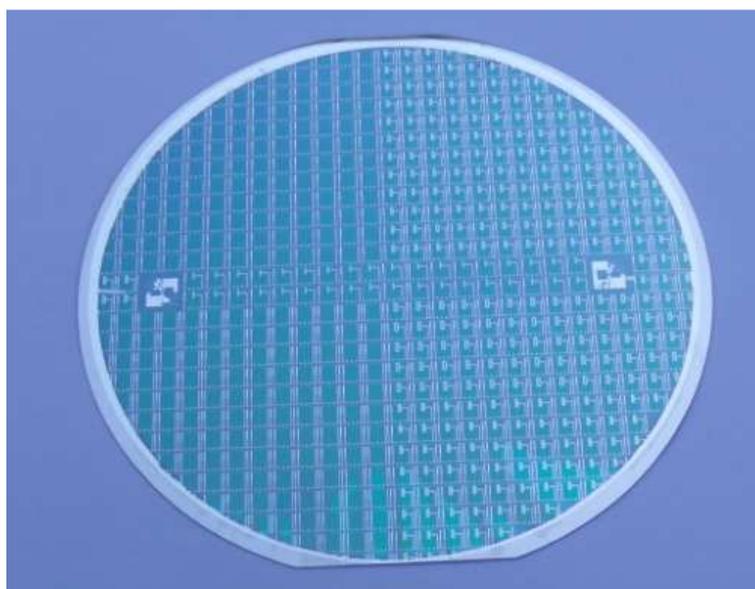


Figure II.24. Fabrication collective des puces ChemFETs sur un substrat silicium

II.18 Caractérisation des transistor MOS sous pointes

Les transistors MOS ont été caractérisés sur plaque à l'aide d'un testeur sous pointe (Karl süss PA 200) afin de valider le procédé (figure II.25).



Figure II.25. Testeur sous pointe Karl süss PA 200

La figure II.26 nous montre la réponse classique des mesures de courant $I_{ds} = f(V_{ds})$. Nous remarquons que le transistor commence à conduire à partir d'une tension de grille de 1 volt, Nous souhaiterons, par la suite, travailler en régime de fonctionnement saturé pour évaluer les variations de la tension de seuil uniquement. Ainsi, pour être dans cette configuration, il faudra appliquer une tension drain-source supérieure à 1,5 V pour être certain de travailler en régime saturé. En fixant une tension drain-source et en appliquant une rampe de tension à la grille métallique du transistor MOS. Nous avons tracé la courbe $I_{ds} = f(V_{gs})$ pour différents valeur de V_{ds} (figure II.27) où la tension de seuil est égale à 0,7 volt et le courant de fuite inférieur à 10 μA . Ces mesures montrent le bon fonctionnement des transistors MOSFETs.

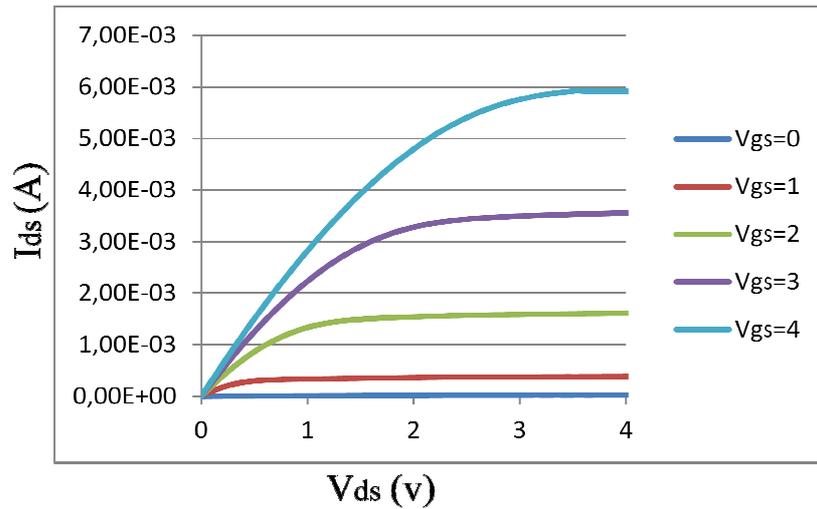


Figure II.26 : Tracé de la caractéristique d'un transistor MOS $I_{ds}=f(V_{ds})$

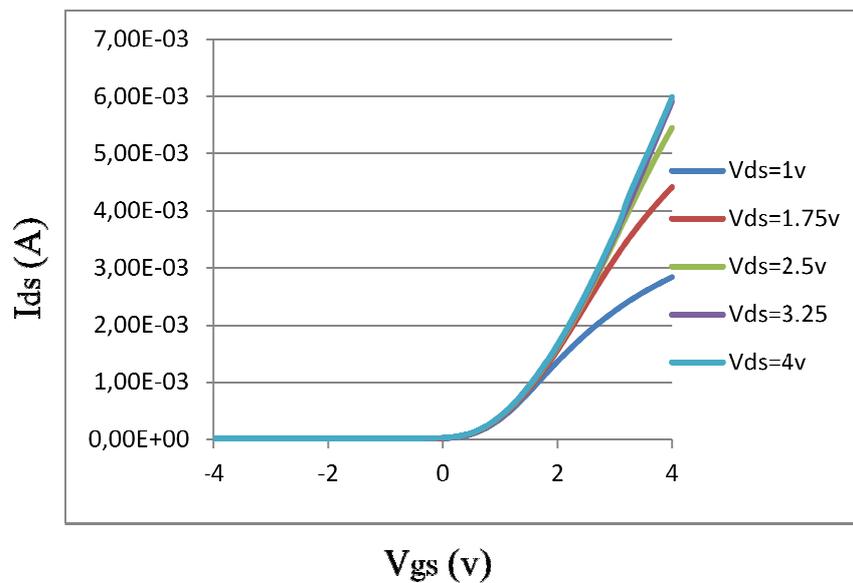


Figure II.27. Caractéristique d'un transistor MOS $I_{ds} =f(V_{gs})$

Après la vérification du bon fonctionnement des transistors MOS et toujours sur le banc de test sous pointes, nous injectons une goutte d'une solution tampon à pH 4 et 10, et nous regardons la réponse du capteur. Nous voyons que la réponse en courant change d'un pH à un autre ce qui montre que notre capteur est sensible au pH avec une sensibilité de 50 mV/pH (Figure II.28).

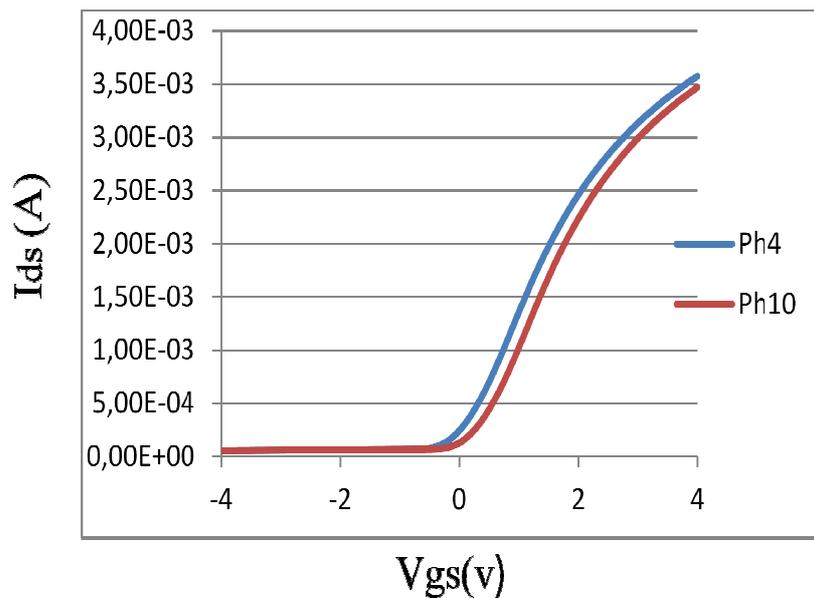


Figure II.28. Test pH sous pointe

Une fois qu'on a terminé la fabrication des capteurs et la caractérisation sous pointes des transistors MOS, nous passons au montage des composants.

III. Montage des composants

III.1 Découpe

Une fois ces mesures effectuées, nous sommes passés ensuite au montage des composants que nous présentons par la suite. Le montage des composants se fait en plusieurs étapes, la première est la découpe, puis le report sur un circuit imprimé, la connexion électrique entre le composant et son support, et l'encapsulation des contacts pour les isoler et assurer l'étanchéité en milieu aqueux. Après un dépôt de résine pour protéger le substrat des éclats de silicium, la plaquette va être découpée à l'aide d'une scie diamantée après un recuit à 105°C pendant 60 secondes.

III.2. Report sur PCB et connectique

Une fois le substrat découpé, nous passons au report des puces sur un circuit imprimé ou « printed circuit board » (PCB).

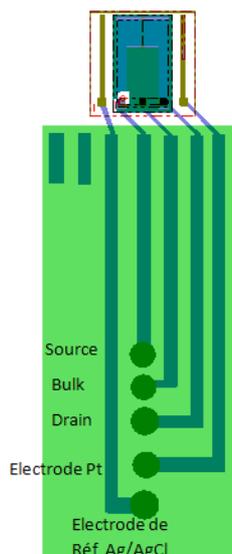


Figure II.29. Report des puces sur PCB

Nous avons choisi deux types de PCB. Le 1^{er} type permet le montage des puces sur des PCB en bâtonnet (figures II.29 et II.30) afin de tester nos capteurs au LAAS. Après la découpe des composants, les puces vont être collées avec un époxy (H70E) par face arrière sur les circuits imprimés. La polymérisation de la colle (H70E) est réalisée dans une étuve à 90°C pendant 15 minutes. Cette colle a été choisie pour ses propriétés de tenue dans un milieu aqueux et ses faibles propriétés de dégazage. La connexion électrique des puces sur le circuit se fait par microsoudure (Bâti : Kulicke 4526, puissance des ultrasons: 480 milliwatts, temps: 40 millisecondes), la technique utilisée est le "wedge-bonding" (le fil assurant la connexion est un fil en aluminium de 25 μm de diamètre).

L'encapsulation se fait par un enrobage de type "glob-top de silicone" (Loctite 5248).



Figure II.30. ChemFET en Bâtonnet

Nous avons réalisé un deuxième type de PCB afin d'intégrer nos composants ChemFETs dans le masticateur électronique développé par le FLAVIC-INRA (Institut National de la Recherche Agroalimentaire). Les contraintes d'intégration ont nécessité la réalisation d'un

PCB carré ($5 \times 5 \text{ mm}^2$) avec contacts reportés en face arrière (figures II.31 à II.34). Néanmoins, le procédé technologique de montage a été identique au précédent.

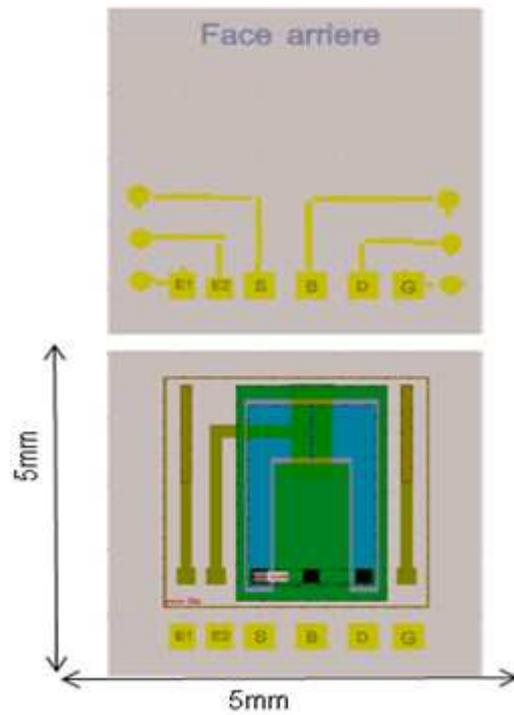


Figure II.31. Design du packaging

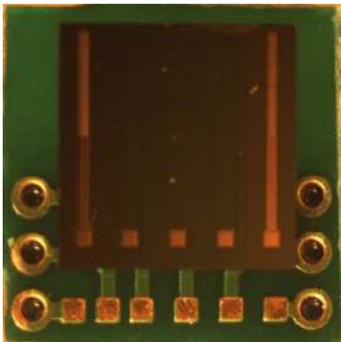


Figure II.32. Report des puces sur PCB

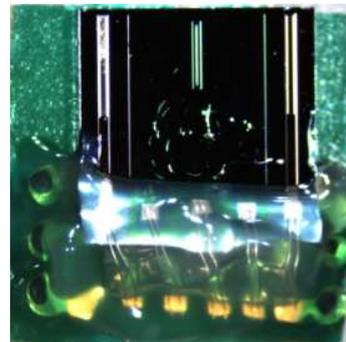


Figure II.33. Glop-top silicone

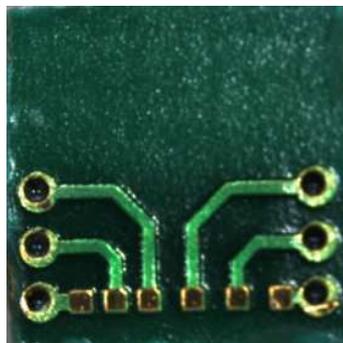


Figure II.34. Récupération du signal en face arrière

IV. Intégration de l'électrode de référence en Ag/AgCl

Si les composants ChemFETs sont terminés, il convient d'oxyder la microélectrode Argent afin de réaliser une microélectrode de référence Ag/AgCl intégrée [5]. Le procédé d'oxydation se fait en deux étapes. Tout d'abord il faut que la surface de l'argent soit nettoyée de toutes impuretés. De plus, l'argent s'oxydant rapidement au contact de l'air, il est nécessaire de passer par une étape de désoxydation. Pour le nettoyage et la désoxydation, nous ferons un cycle de voltammétrie de l'argent dans une solution d'acide sulfurique (0,1 M). Nous faisons cinq cycles, avec une variation de tension appliquée entre l'électrode de référence (au calomel saturé) et l'électrode de travail (argent) allant de 0,3 à 1,2V (figure II.35).

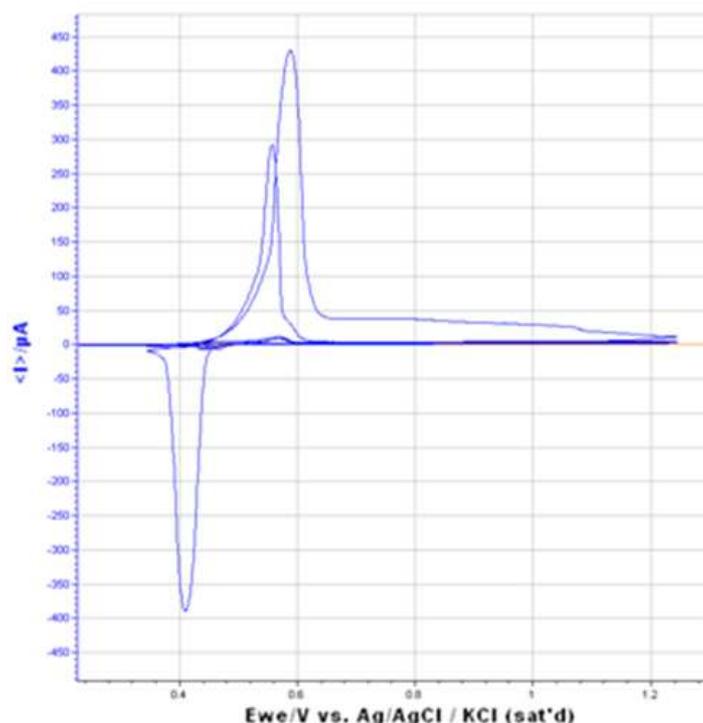


Figure II.35. Voltammogramme du cycle de nettoyage de l'argent

Puis, la deuxième étape consiste à oxyder en surface l'argent en trempant les capteurs dans du $FeCl_3$ (0,1 M) durant 5 minutes. Ainsi une couche d'AgCl se forme à la surface et nous obtenons une électrode Ag/AgCl.

Nous allons dans ce qui suit, caractériser nos capteurs ayant une électrode Ag/AgCl intégrée et des capteurs ayant une électrode externe Ag/AgCl commerciale.

V. Mesure de pH en continu

Le test de validation de notre technologie pH-ChemFET consiste à réaliser un titrage acido-basique utilisant des burettes automatiques (DOSIMAT) contenant un acide fort HCl [10^{-1} M] ou une base forte TMAH (Tetramethylammonium hydroxide) [10^{-1} M] à l'aide d'un système automatisé [8]. Ainsi, il est possible de caractériser la réponse de nos capteurs dans la gamme de pH [2-10].



Figure II.36. Banc de test en continu

Nous pilotons le système par un ordinateur qui commande les interfaces de mesures et les burettes de dosage à travers un logiciel développé par le service 2I [9] qui sert à visualiser en temps réel les mesures (figure II.36).

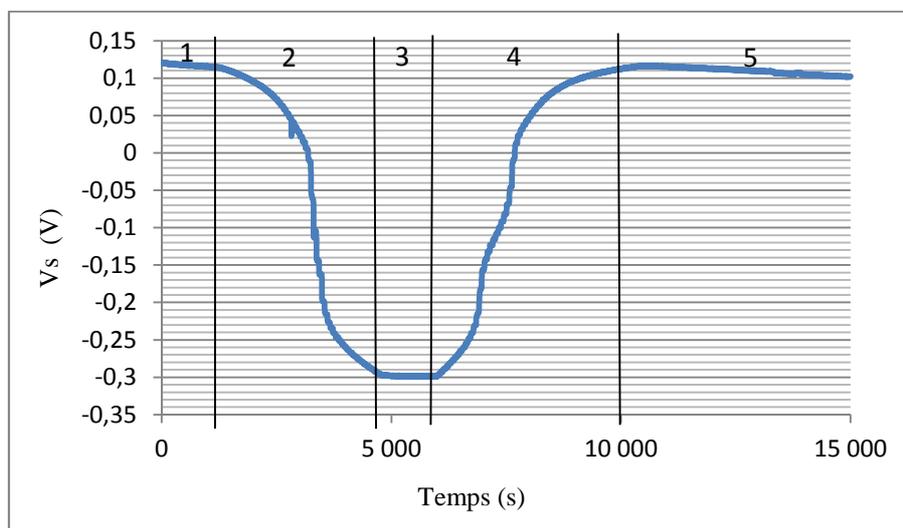


Figure II.37. Courbe de titrage acido-basique en temps réel

Le microcapteur pH-ChemFET est plongé dans une solution contrôlée par une électrode pH commerciale, l'homogénéité du pH de la solution étant assurée par un agitateur magnétique.

Nous partons de 50ml d'une solution de HCl centimolaire, nous injectons ensuite 10ml d'une solution de TMAH décimolaire pour passer d'un pH 2 à un pH 10, puis nous injectons 10 ml d'une solution de HCl décimolaire pour revenir à un pH 2. Le courant drain-source commandé par le ChemFET-mètre étant de $100\mu\text{A}$ et la tension drain-source de 1.5 V, la mesure va se faire en cinq phases :

- Phase 1 : pas d'injection, pH constant (pH=2) durant 20 minutes
- Phase 2 : injection de 0,13 ml de TMAH à 10^{-1} mol/l pendant 1h, soit 8 ml de TMAH injecté, le pH va passer de 2 à 10 environ
- Phase 3 : pas d'injection, le pH reste constant (10) pendant 20 min
- Phase 4 : injection de 0,13 ml/min de HCl à 10^{-1} mol/l pendant 75 minutes, soit 10ml de HCl injecté, le pH va passer de 10 à 2
- Phase 5 : pas d'injection, pH constant (environ 2)

La figure II.37 montre la réponse du capteur pendant l'expérience de titrage acido-basique avec un fil Ag/AgCl commercial utilisé comme électrode de référence [10]. La mesure permet de caractériser correctement les variations de pH en accord avec la théorie. Par comparaison avec les données de l'électrode pH commerciale, nous pouvons donc évaluer la sensibilité du microcapteur pH-ChemFET à 52 mV/pH environ en bon accord avec la loi de Nernst (figure II.38). Ces résultats valident d'ores et déjà le procédé de fabrication de nos capteurs.

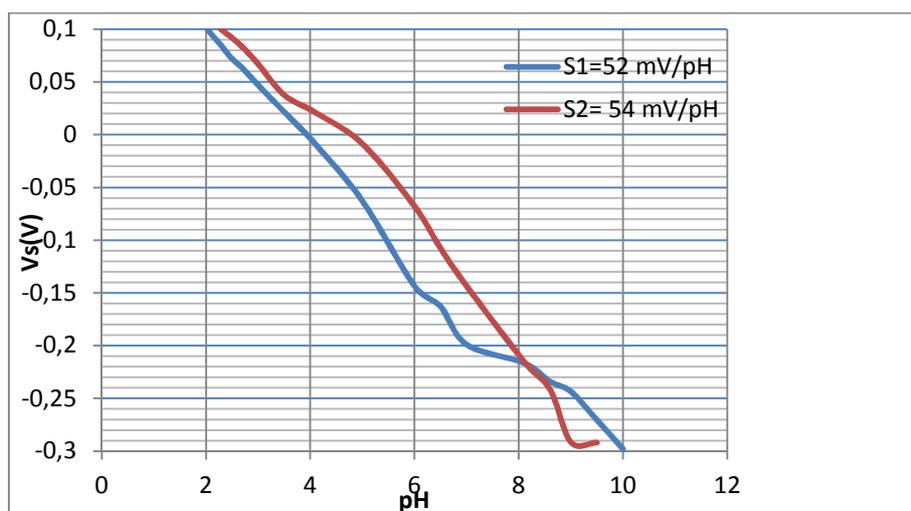


Figure II.38. Sensibilité du capteur avec un fil Ag/AgCl utilisé comme électrode de polarisation

La figure II.39 montre des résultats obtenus avec l'électrode intégrée Ag/AgCl. L'allure de la courbe suit bien l'évolution du pH, la sensibilité est linéaire (figure II.40) et il n'y a pas d'instabilité au cours de la mesure. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec l'électrode commerciale, la sensibilité étant de l'ordre de 48mV/pH. Ces résultats sont encourageants et valident le procédé de fabrication de nos capteurs et des microélectrodes de référence Ag/AgCl intégrées.

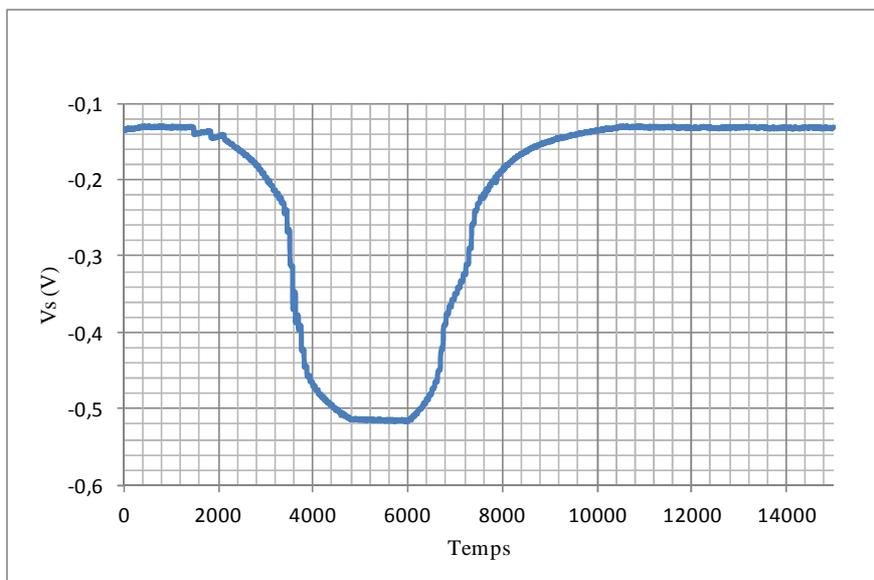


Figure II.39. Comportement du ChemFET avec l'électrode intégrée Ag/AgCl

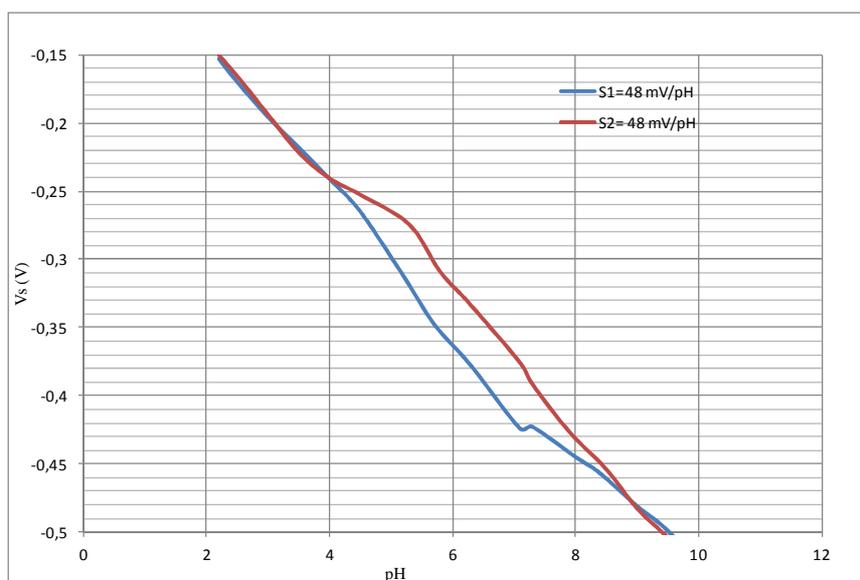


Figure II.40. Sensibilité du capteur avec l'électrode intégrée Ag/AgCl utilisée comme électrode de polarisation

VI. Caractérisation des microcapteurs pH-ChemFET dans le masticateur électronique

VI.1 Description du masticateur électronique

Il est constitué d'une cellule motorisée dans laquelle s'effectue la mastication, d'un boîtier électronique et d'un micro-ordinateur. Des couronnes de dents interchangeables, une arrivée de salive artificielle dont le débit est assuré par une pompe seringue, une arrivée de gaz, et des dispositifs de prélèvement et d'analyses, constituent cet appareil. Le volume maximum de la cellule est d'environ 100 ml, soit le volume moyen d'une bouche d'un homme adulte. Chaque fonction peut être paramétrée indépendamment : les forces et les fréquences de la mastication, le flux de salivation, les compositions salivaires, les paramètres respiratoires, etc.

Grâce à ce simulateur de mastication et à des techniques d'analyses comme la chromatographie ou la spectrométrie, il est possible de suivre, l'aliment en bouche, la libération des composés de la saveur par des prélèvements de salive, et la libération des composés volatils responsables d'arômes par des prélèvements gazeux. Il est possible également d'étudier, grâce au paramétrage des fonctions, l'évolution de la texture de l'aliment au cours de la mastication. Le paramétrage des profils dentaires et des conditions masticatoires et salivaires peuvent également servir pour des études sur différentes classes d'âge. Cet outil permettra par exemple de savoir exactement quels paramètres physiologiques interviennent réellement dans les phénomènes de libération d'arômes et des saveurs en bouche lors de la mastication d'un aliment. Il permettra aussi de relier par exemple la façon de mastiquer, qui varie largement d'un individu à l'autre, à la perception sensorielle du produit mastiqué, et aux conséquences de ces paramètres sur le temps nécessaire à l'apparition du rassasiement (figure II.41).



Figure II.41. Le masticateur électronique

VI.2 Intégration du microcapteur ChemFET dans le masticateur

Avant de commencer les manip, nous nous sommes assurés de la bonne détection des microcapteurs pH-ChemFET dans des solutions tamponnées à pH 4 et pH 7. La Figure II.42 montre une stabilisation du capteur avec une sensibilité autour de 50 mV/pH, ceci en accord avec de précédents résultats effectués au LAAS.

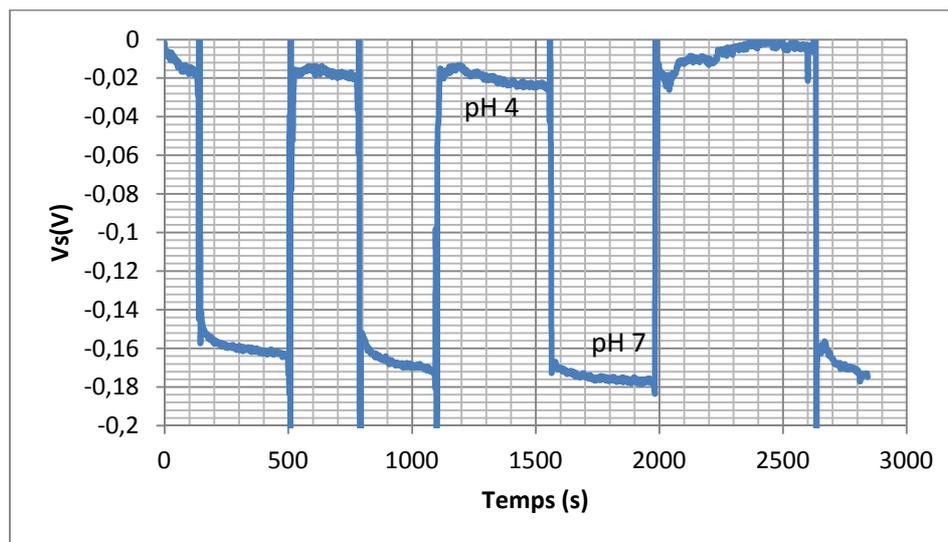


Figure II.42. Mesure de pH dans des solutions tamponnées à pH 4 et pH 7

Nous avons eu quelques problèmes de mise en place du dispositif au niveau du masticateur électronique. Tout d'abord, nous avons passé un peu de temps à paramétrer le masticateur étant donné qu'il ne sauvegardait pas la position initiale (avec quelques "bugs" relatifs au logiciel...). Ensuite, nous avons eu des soucis pour coller et connecter le capteur pH-ChemFET sur la tige de mesure (figure II.43). Nous avons réussi le collage avec une colle Latex et il nous a fallu rallonger la longueur des fils de connexion en passant de vingt centimètres (initialement prévus mais insuffisants pour l'utilisation finale...) à près de cinquante centimètres.

Il a aussi fallu tenir compte de problèmes de masse entre l'interface de mesure et le masticateur électronique en travaillant avec une masse commune pour éviter l'apparition de courants parasites et par inférence d'erreurs de mesure.



Figure II.43. Collage et connexion du capteur pH-ChemFET sur la tige de mesure

Au total, nous avons réussi à mettre en place et connecter les capteurs pH-ChemFET du LAAS sur le masticateur électronique du FLAVIC (figure II.44).



Figure II.44. Test du capteur pH-ChemFET dans le masticateur électronique

Les expériences ont été faites en utilisant du jus de citron (de pH et composition non connus) ainsi qu'une solution d'eau "déionisée" pour les étapes de trempage/nettoyage/calibration initiales et finales. Le microcapteur pH-ChemFET a été trempé dans la solution en phase de mastication avec une période de 10 secondes (dont 5 secondes de trempage) pour 10 cycles consécutifs. Il a ainsi été possible d'identifier clairement les pics de mesure du pH relatifs à l'acidité de la solution analysée, une augmentation de tension correspondant bien à une diminution de pH (figure II.45).

Pour conclure et être plus précis quant au bon fonctionnement du capteur pH-ChemFET, il nous faudrait connaître le pH, la composition du jus de citron et la solution d'eau "déionisée" (en particulier la concentration en ion chlore en raison de l'utilisation d'une électrode Ag/AgCl) afin de pouvoir vérifier la valeur de la sensibilité au pH.

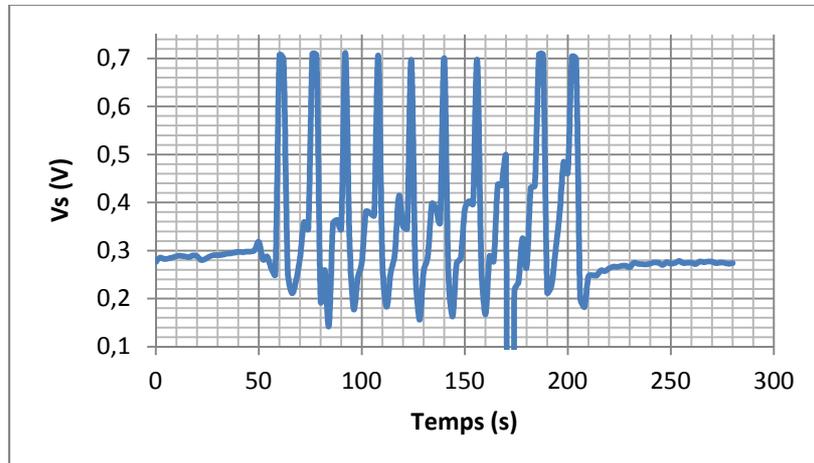


Figure II.45. Réponse temporelle du capteur pH ChemFET pour l'analyse de jus de citron dans le masticateur électronique

Références Bibliographiques

- [1] T. Sikanen, S. Franssila, T. Kauppila, R. Kostianen, T. Kotiaho, R. Ketola, *Microchip Technology in Mass Spectrometry*, University of Helsinki, Finland, Wiley InterScience, 2009.
- [2] S. Franssila, *Introduction to microfabrication*. Wiley, 2004.
- [3] B.Hernandez, *Anisotropie magnétique induite par modulation de surface et étude de la propagation de parois de domaines dans des nanostructures magnétiques* Thèse de doctorat, Université de Nancy I, 2008.
- [4] A. Benyahia, *Conception, Réalisation et modélisation de microcapteurs pour l'analyse biochimique Application à la détection de l'urée*, Thèse de doctorat, UPS de Toulouse, 2010.
- [5] W. Sant, *Développement des microcapteurs chimiques CHEMFETs pour des applications à l'hémodialyse*, Thèse de doctorat, UPS de Toulouse 2004.
- [6] M.J. Madou. *Fundamentals of microfabrication, The science of miniaturization*, CRC, 2002.
- [7] W. Kern, *The evolution of silicon wafer cleaning technology*, *J. Electrochem. Soc*, 137, 1990, 1887–1892.
- [8] I. Humenyuk, *Développement des microcapteurs chimiques ChemFETs pour l'analyse de l'eau*. Thèse de doctorat, INSA de Toulouse, 2005.
- [9] S. Assie-Souleille, B. Franc, X. Dollat, I. Humenyuk, B. Torbiero, P. Temple-Boyer. *Notice d'utilisation du système fluidique*, 2004.
- [10] G. Janz, H. Taniguchi, *The Silver-Silver Halide Electrodes. Preparation, Stability, and Standard Potentials in Aqueous and non-Aqueous Media*. *Chemical Reviews*, 53, 1953, 397–437.

CHAPITRE III

MODELISATION

DES MECANISMES DE DETECTION DU

GLUTAMATE-ENFET

Introduction

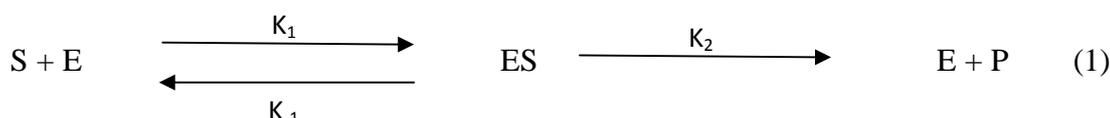
Dans ce chapitre, nous allons d'abord établir les équations générales régissant le fonctionnement des capteurs enzymatiques à effet de champs (EnFETs), puis nous nous intéressons à la réaction enzymatique pour le glutamate-EnFET dans le but de créer un modèle de simulation. Une fois le modèle établi, nous étudierons le système de détection et nous verrons l'influence de chacune des grandeurs d'intérêt.

I. Détection d'un substrat par un enzyme

La technologie EnFET basée sur la mesure de pH est plus particulièrement adaptée à la famille enzymatique des hydrolases. Ce type d'enzyme est en effet responsable de l'hydrolyse de la fonction amine et ainsi de la production d'ammoniaque en phase aqueuse [1]. La première étape est la consommation du substrat par la réaction enzymatique pour produire des molécules NH_3 . En présence d'eau, ces molécules vont se transformer en ions ammonium NH_4^+ afin d'équilibrer les réactions acido-basiques du couple $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. Le phénomène est connu pour être responsable d'une augmentation de pH. Ainsi nous avons un aperçu des phénomènes physico-chimiques agissant au sein d'une structure enzymatique qui vont être explicités pour le glutamate-EnFET.

I.1 Réaction enzymatique et théorie de Michaelis Menten

Les enzymes sont des protéines capables de catalyser des réactions chimiques (biocatalyseurs) de manière spécifique [2]. La particularité d'une enzyme est de posséder un site actif. Ce site actif est une petite zone privilégiée de la protéine enzymatique dont la géométrie a une importance considérable sur la spécificité. Il a deux fonctions principales liées à la fixation du substrat et à sa transformation. Pour exprimer l'activité des enzymes, E.L. Michaelis, M. Menten et V. Henri [3], ont proposé un schéma réactionnel selon lequel un substrat S est transformé en un produit P en passant par l'intermédiaire d'une phase transitoire de création d'un complexe Enzyme-Substrat spécifique (figure III.1).



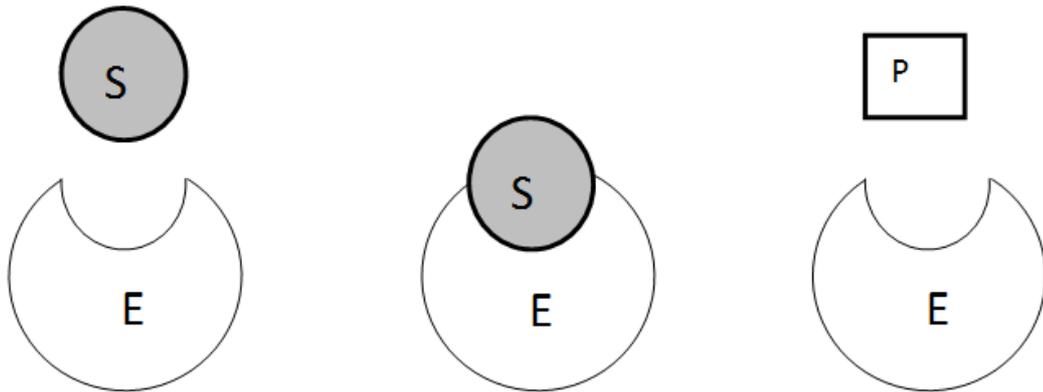


Figure III.1. Catalyse d'une réaction chimique par une enzyme

La cinétique de la réaction est donnée par l'équation de Michaelis-Menten (figure III.2) :

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

Où v est la vitesse de la réaction chimique et v_{\max} est sa valeur maximale, $[S]$ est la concentration du substrat en solution et K_M est la constante de Michaelis :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_1} \quad (3)$$

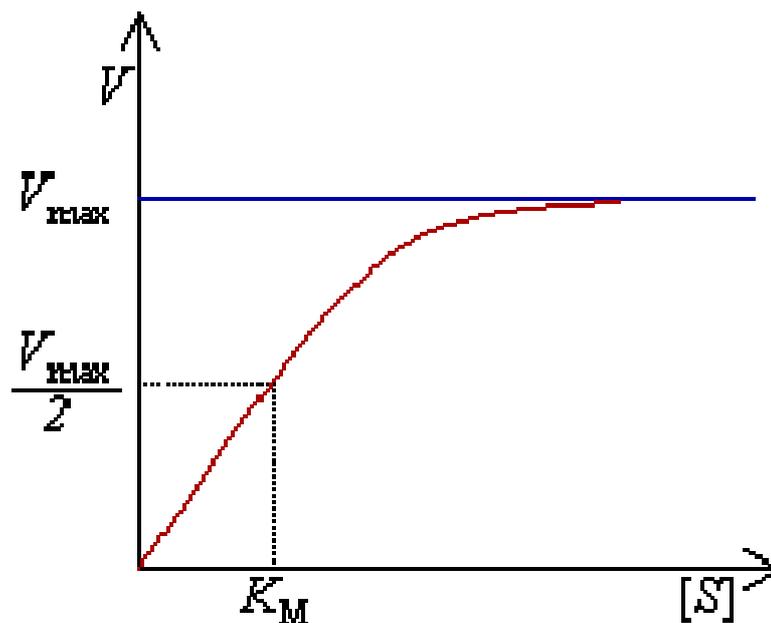
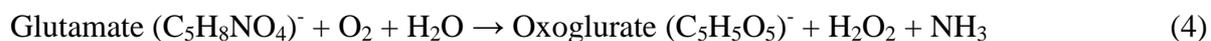


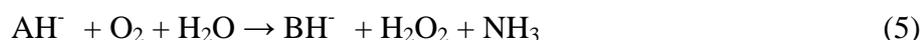
Figure III.2. Courbe de Michaelis Menten

I.2 Etude de la glutamate oxydase

La glutamate oxydase catalyse l'hydrolyse de la glutamate selon la réaction suivante [4-14] :



Pour simplifier les équations, nous avons noté l'ion glutamate $(\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4)^-$ AH^- et l'ion oxoglurate $(\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_5)^-$ BH^- , la relation (4) devient :



Dans le cas de la glutamate oxydase, nous avons deux substrats mis en jeu, le glutamate noté S_1 et l'oxygène noté S_2 , et trois produits l'oxoglurate, l'ammoniac et le peroxyde hydrogène noté P_1 , P_2 et P_3 .

L'étude théorique d'une enzyme à deux substrats nous donne :

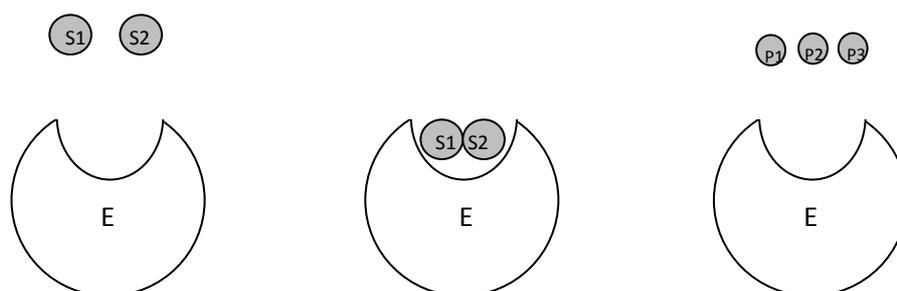
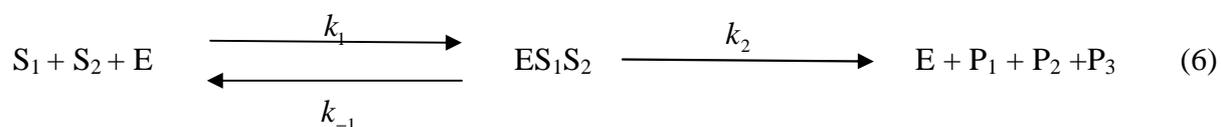


Figure III.3. Catalyse d'une réaction chimique par une enzyme à deux substrats

D'après les lois de la cinétique chimique, il est possible d'écrire :

$$\frac{d[P]}{dt} = v = k_2[ES_1S_2] \quad (7)$$

$$\frac{d[ES_1S_2]}{dt} = k_1[S_1][S_2][E] - k_{-1}[ES_1S_2] - k_2[ES_1S_2] \quad (8)$$

En régime permanent, nous avons :

$$\frac{d[ES_1S_2]}{dt} = 0 \quad (9)$$

$$(k_2 + k_{-1})[ES_1S_2] = k_1[S_1][S_2][E] \quad (10)$$

$$\frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_M = \frac{[S_1][S_2][E]}{[ES_1S_2]} \quad (11)$$

Où K_M est la constante de Michaelis de l'enzyme.

Nous avons :

$$[E_{total}] = [E] + [ES_1S_2] \quad (12)$$

Ainsi

$$K_M = \frac{[S_1][S_2]([E_{total}] - [ES_1S_2])}{[ES_1S_2]} \quad (13)$$

$$K_M + [S_1][S_2] = [S_1][S_2] \frac{[E_{total}]}{[ES_1S_2]} \quad (14)$$

$$\frac{[ES_1S_2]}{[E_{total}]} = \frac{[S_1][S_2]}{K_M + [S_1][S_2]} \quad (15)$$

Finalement

$$v = k_2[ES_1S_2] \quad (16)$$

$$v_{max} = k_2[E_{total}] \quad (17)$$

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[ES_1S_2]}{E_{total}} \quad (18)$$

Ainsi nous obtenons l'équation de Michaelis Menten qui représente la cinétique de la réaction :

$$v = v_{max} \frac{[S_1][S_2]}{K_M + [S_1][S_2]} \quad (19)$$

v est la vitesse de la réaction et v_{max} est la vitesse maximale, S_1 et S_2 sont les concentrations des deux substrats en solution et K_M est la constante de Michaelis.

Donc, en remplaçant la concentration d'un seul substrat [S] par le produit des deux substrats $[S_1][S_2]$, il est possible d'appliquer la théorie de Michaelis-Menten à un enzyme à deux substrats S_1 et S_2 tel que la glutamate oxydase.

II. Modélisation des mécanismes de détection

Afin d'avoir une première idée du fonctionnement du microcapteur glutamate-EnFET, nous avons développé un modèle de la détection du glutamate en milieu aqueux en prenant en compte la réaction enzymatique de la glutamate oxydase, la diffusion des espèces en milieux aqueux, les différentes réactions acido-basiques en phase aqueuse et la mesure de la variation finale de pH par le pH-ChemFET. Ce modèle est adapté de précédents travaux relatifs aux urée-EnFET et créatinine-EnFET [15]. Il va nous donner une image de la réponse du capteur glutamate-EnFET pour des temps importants, i.e. lorsque tous les ions glutamates présents dans le volume analysé auront réagi au sein de la couche enzymatique.

II.1 Principe de détection enzymatique du glutamate-EnFET

Le principe de détection est basé sur l'utilisation de la couche sensible ($\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$) du pH-ChemFET adapté à la détection enzymatique du glutamate grâce à une couche enzymatique riche en glutamate oxydase. Cette réaction enzymatique est responsable d'une variation de pH due principalement à la formation de l'ammoniac NH_3 en solution. Ces variations en solution aqueuse vont être étudiées grâce au couple acide/base $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$:



Le système de détection sensible est décrit selon la figure III.4.

- la première zone, constituée de la couche solide en nitrure de silicium Si_3N_4 , considérée comme une barrière à la diffusion des espèces en solution,
- la deuxième zone, constituée de la couche enzymatique est caractérisée par un terme de production/consommation des espèces biochimique g non nul,
- la troisième zone, constituée par l'électrolyte, est caractérisée par un terme de production/consommation des espèces biochimique g nul.

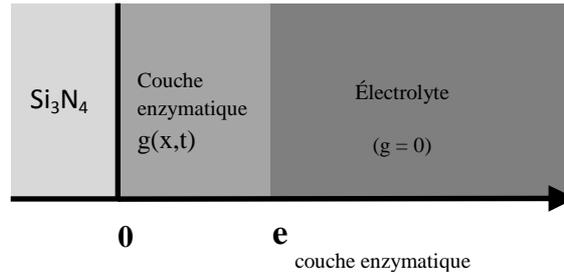


Figure III.4. Description de la structure $\text{Si}_3\text{O}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ /glutaraldéhyde/électrolyte

Les enzymes sont piégées à la surface de la couche sensible au pH en nitrure de silicium [15]. Le terme de production/consommation des espèces (bio) chimiques g exprimé en moles par unité de volume et unité de temps dépend donc du nombre d'unités d'activité enzymatique par unité de volume N_{enz} contenu dans la couche enzymatique, il s'écrit (équation 19) :

$$g(x,t) = a_M N_{enz} \frac{[\text{glutamate}][O_2]}{K_M + [\text{glutamate}][O_2]} \quad (21)$$

II.2 Etude des mécanismes de diffusion en milieux aqueux

Les mécanismes de diffusion ont été étudiés en appliquant la loi de Fick dans le milieu d'analyse :

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \varepsilon g(x,t) \quad (22)$$

$g(x,t)$ représente le terme de consommation ($\varepsilon < 0$, $\varepsilon = -1, -2, \dots$) ou de production ($\varepsilon > 0$, $\varepsilon = +1, +2, \dots$).

D est le coefficient de diffusion en solution aqueuse de l'espèce (bio) chimique étudiée. Il est estimé à partir de données bibliographiques selon les cas ou calculé à partir de la relation d'Einstein :

$$D = \frac{1}{6\pi\eta} \left(\frac{4\pi\rho N_A}{\sqrt[3]{3M}} kT \right) \quad (23)$$

Où ρ et η sont la masse volumique et la viscosité du fluide analysé, k est la constante de Boltzman, T est la température absolue, M est la masse molaire de la molécule étudiée et N_A est le nombre d'Avogadro ($N_A = 6,02 \cdot 10^{23}$).

Nous avons ainsi pu définir les coefficients de diffusion des différentes molécules propres à la réaction enzymatique de la glutamate oxydase :

$$D_{\text{NH}_3} = 2,54 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s},$$

$$D_{\text{AH}} = 1,12 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s},$$

$$D_{\text{BH}} = 1,17 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Nous aurons dans le cas de la glutamate oxydase le coefficient $\varepsilon = -1$ pour tous les substrats (AH et O₂), soit :

$$\frac{\partial S(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} - g(x,t) \quad (24)$$

Pour les produits (BH, NH₃, H₂O₂) le coefficient ε sera égal à +1, soit :

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + g(x,t) \quad (25)$$

Ainsi, la résolution de l'équation de Fick s'effectue en utilisant la méthode implicite de simulation développée sous le logiciel Matlab™ [15]. Nous devons pour cela la mettre sous forme matricielle.

En échantillonnant les différents paramètres d'intérêt sous la forme :

$$C_{i,j} = C(i\Delta x, j\Delta t)$$

$$G_{i,j} = G(i\Delta x, j\Delta t)$$

Où Δx et Δt sont respectivement les pas en abscisses et en temps de la modélisation, l'équation 25 se met sous la forme :

$$C_{(i,j)} = -KC_{(i+1,j+1)} + [1 + 2K]C_{(i,j+1)} - KC_{(i-1,j+1)} - \varepsilon G_{(i,j)} \quad (26)$$

Où $C_{(i,j)}$ représente la concentration des différentes espèces biochimiques se trouvant dans la solution aqueuse, et $G_{(i,j)}$ représente le terme consommation ou production relatif à l'équation enzymatique étudiée (équation 21).

Ceci nous permet de trouver la matrice de diffusion en tenant compte des conditions aux limites (flux de diffusion = 0), c'est une matrice carrée notée M et représentée ci-dessous.

$$M = \begin{bmatrix} 1+K & -K & 0 & . & . & . & . & 0 & 0 \\ -K & (1+2K) & -K & 0 & . & . & . & . & 0 \\ 0 & -K & (1+2K) & -K & 0 & . & . & . & . \\ . & . & . & . & . & . & . & . & . \\ . & . & . & . & . & . & . & . & . \\ . & . & . & . & . & . & . & . & 0 \\ . & . & . & . & . & . & . & . & 0 \\ 0 & . & . & . & . & . & 0 & -K & (1+2K) & -K \\ 0 & 0 & . & . & . & . & 0 & 0 & -K & 1+K \end{bmatrix} \quad (27)$$

Sous forme matricielle, les équations 26 deviennent alors :

$$C_{i,j} = (M) * (C_{i,j+1}) - \varepsilon G_{i,j} \quad (28)$$

Soit

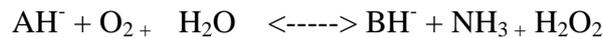
$$C_{i,j+1} = M^{-1}(C_{i,j} + \varepsilon G_{i,j}) \quad (29)$$

Ainsi, il sera possible de déterminer l'ensemble des distributions de concentration $C(x,t)$ des différentes espèces d'intérêt.

II.3 Etude des équations acido-basiques en phase aqueuse

II.3.1 Etude de la variation du pH en solution lors de la réaction enzymatique

Connaissant les distributions spatio-temporelles $C(x,t)$ de concentrations des différentes espèces acido-basiques en solution, il est a priori possible de déterminer le pH de la solution en fonction du temps. Pour cela, il nous faut modéliser les réactions acido-basiques en solution. Pour rappel, la réaction enzymatique du glutamate oxydase (5) s'écrit :



En ce qui concerne l'acide glutamique $COOH-CH_2-CH_2-CHNH_2-COOH$ (noté AH_2), trois acidités doivent être prises en compte en phase aqueuse:





Ensuite, en ce qui concerne l'acide oxoglurique $\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-COOH}$ (noté BH_2), deux acidités doivent être prises en compte en phase aqueuse:



Enfin, l'ammoniac NH_3 est caractérisé par une seule acidité en phase aqueuse:



Toutes ces réactions acido-basiques du type $[\text{acide} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{base} + \text{H}_3\text{O}^+]$ vont être modélisées par une équation d'équilibre chimique de la forme:

$$K_a = \frac{[\text{base}][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{acide}]} \quad (36)$$

Où K_a ($K_a = 10^{-\text{pK}_a}$) est la constante d'acidité caractéristique du couple acide/base étudié et $[\text{H}_3\text{O}^+]$ est la concentration en ions hydroxydes de la solution.

II.3.2 Cas d'une solution de monoglutamate de sodium dans l'eau déionisée

Le modèle créé se base sur les équations d'équilibres chimiques, de conservation des espèces chimiques et d'électroneutralité. Grâce à ces équations, nous allons établir une équation qui va nous permettre de déterminer le pH de la solution. On pose :

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = h^+ \quad (37)$$

Dans le cas d'une solution de monoglutamate de sodium AHNa (Concentration C_0 exprimée en mM/L) dans l'eau déionisée, les espèces chimiques en solution se limitent aux espèces issues du glutamate (AH_2 , AH^- , A^{2-}), de l'oxoglurate (BH_2 , BH^- , B^{2-}) et du couple

$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. En considérant les concentrations de ces différentes espèces, les équations caractéristiques du système chimique donnent :

$$K = \frac{[\text{NH}_3]h^+}{[\text{NH}_4^+]} \quad (38)$$

$$K_1 = \frac{[\text{AH}_2]h^+}{[\text{AH}_3^+]} \quad (39)$$

$$K_2 = \frac{[\text{AH}^-]h^+}{[\text{AH}_2]} \quad (40)$$

$$K_3 = \frac{[\text{A}^{2-}]h^+}{[\text{AH}^-]} \quad (41)$$

$$K_4 = \frac{[\text{BH}^-]h^+}{[\text{BH}_2]} \quad (42)$$

$$K_5 = \frac{[\text{B}^{2-}]h^+}{[\text{BH}^-]} \quad (43)$$

$$K_e = h^+[\text{OH}^-] \quad (44)$$

Où

K est la constante de dissociation du couple $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ($K=5,6 \cdot 10^{-10}$) [16].

K_1 est la constante de dissociation du couple $\text{AH}_3^+/\text{AH}_2$ ($K_1=6,3 \cdot 10^{-3}$) [16].

K_2 est la constante de dissociation du couple AH_2/AH^- ($K_2=6,3 \cdot 10^{-5}$) [16].

K_3 est la constante de dissociation du couple $\text{AH}^-/\text{A}^{2-}$ ($K_3=6,3 \cdot 10^{-10}$) [16].

K_4 est la constante de dissociation du couple BH^-/BH_2 ($K_4=3,2 \cdot 10^{-3}$) [16].

K_5 est la constante de dissociation du couple $\text{BH}^-/\text{B}^{2-}$ ($K_5=5 \cdot 10^{-6}$) [16].

K_e est le produit ionique de l'eau ($K_e=10^{-14}$) [16].

Les équations de conservation des espèces en présence sont données par :

$$[\text{Na}^+] = C_0 \quad (45)$$

$$[AH^{3+}] + [AH_2] + [AH^-] + [A^{2-}] = C_A(x, t) \quad (46)$$

$$[BH_2] + [B^{2-}] + [BH^-] = C_B(x, t) \quad (47)$$

$$[NH_4^+] + [NH_3] = C_N(x, t) \quad (48)$$

Où :

C_0 est la concentration initiale de l'ion sodium $[Na^+]$,

$C_A(x, t)$ est la concentration en tout point (x, t) du substrat glutamate,

$C_B(x, t)$ est la concentration en tout point (x, t) d'oxoglurate,

$C_N(x, t)$ est la concentration en tout point (x, t) de l'ammoniac.

Finalement, l'équation d'électroneutralité donne :

$$h^+ + [Na^+] + [NH_4^+] + [AH_3^+] = [OH^-] + [AH^-] + 2[A^{2-}] + [BH^-] + 2[B^-] \quad (49)$$

La résolution analytique des équations (38 à 49) est extrêmement lourde. Néanmoins il est possible de déterminer les valeurs des différentes concentrations en solution dont $[H_3O^+]$ en utilisant notre programme développé sous Matlab afin de résoudre un polynôme de degré 7. Ce polynôme va permettre de déterminer la concentration d'ions H_3O^+ en tout point (x, t) et ainsi la distribution du potentiel hydrogène ($pH(x, t) = -\log [H_3O^+(x, t)]$).

II.3.3 Cas d'une solution de monoglutamate de sodium dans un tampon phosphate

La salive étant un milieu tamponné [17], nous nous sommes intéressés à un cas d'école : le tampon phosphate $pH=7,4$. Sa composition chimique est la suivante :

- NaCl : 138 mM/L
- KCl : 3mM/L
- Na_2HPO_4 : 6mM/L
- KH_2PO_4 : 4mM/L

Nous avons plus particulièrement étudié une solution de monoglutamate de sodium (concentration C_0 exprimée en mM/L) diluée dans une matrice de tampon phosphate. En plus des équations chimiques précédentes (équations 38 à 44), il convient de prendre en compte les

équilibres chimiques propres à l'acide phosphorique H_3PO_4 . Les équations chimiques décrivant ce système acido-basique sont :



$$K_6 = \frac{[H_2PO_4^-]h^+}{[H_3PO_4]} \quad (53)$$

$$K_7 = \frac{[HPO_4^{2-}]h^+}{[H_2PO_4^-]} \quad (54)$$

$$K_8 = \frac{[PO_4^{3-}]h^+}{[HPO_4^{2-}]} \quad (55)$$

Où K_6 , K_7 et K_8 sont les constantes de dissociation des couples $H_3PO_4 / H_2PO_4^-$, $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ et HPO_4^{2-} / PO_4^{3-} ($K_6 = 7,6 \cdot 10^{-3}$, $K_7 = 6,2 \cdot 10^{-8}$, $K_8 = 2,2 \cdot 10^{-13}$)

Les équations de conservation des composés acido-basiques sont données par :

$$[H_3PO_4] + [H_2PO_4^-] + [HPO_4^{2-}] + [PO_4^{3-}] = C_p = 10 \text{ mM/L} \quad (56)$$

$$[Na^+] = 150 + C_0 \text{ (mM/L)} \quad (57)$$

$$[Cl^-] = 141 \text{ mM/L} \quad (58)$$

$$[K^+] = 7 \text{ mM/L} \quad (59)$$

Finalement, l'équation d'électroneutralité de la solution est :

$$h^+ + [Na^+] + [K^+] + [NH_4^+] + [AH_3^+] = [OH^-] + [Cl^-] + [H_2PO_4^-] + 2[HPO_4^{2-}] + 3[PO_4^{3-}] + [AH^-] + 2[A^{2-}] + [BH^-] + 2[B^{2-}] \quad (60)$$

A partir des équations (38 à 44) et (53 à 60) il est possible de déterminer les valeurs des différentes concentrations en solution dont $[H_3O^+]$ en utilisant toujours notre programme développé sous Matlab afin de résoudre un polynôme de degré 10. Ce polynôme va permettre de déterminer la concentration d'ions H_3O^+ en tout point (x,t) et ainsi la distribution du potentiel hydrogène ($pH(x,t) = -\log [H_3O^+(x,t)]$).

II.4 Détermination de la réponse potentiométrique du glutamate-EnFET

Le microcapteur glutamate-EnFET mesure la valeur du pH sur la surface sensible ($x=0$) et la réponse du capteur doit être obtenue après stabilisation dans le temps ($t \rightarrow +\infty$). La relation qui relie de manière simplifiée la tension de seuil V_T au $pH(x,t)$ [18,19] est :

$$V_T(t) = V_{T0} + S * [pH(0,t) - pH_{pzc}]$$

Avec :

S : sensibilité du capteur en mV/pH,

V_{T0} : tension de seuil du capteur (dépend de la technologie de fabrication) [20],

pH_{pzc} : pH au point de charge nulle (pH_{pzc} a été estimé autour de 4 pour le Si_3N_4 [21,22]).

La sensibilité S du capteur est donnée par la loi de Nernst :

$$S = \frac{\ln(10)kT}{q} = 59,2 \text{ mV/pH} \quad (61)$$

III. Analyse du comportement du microcapteur glutamate-EnFET

Afin de comprendre les phénomènes mis en jeu, il est important de mettre en place un modèle. Celui-ci doit prendre en compte les paramètres influents et doit être le plus proche possible de l'environnement du capteur. Dans ce qui suit nous allons présenter les résultats de ce modèle mis en place et nous allons étudier les paramètres influents sur la réponse du capteur.

Nous nous sommes placés dans les mêmes conditions que la pratique c'est-à-dire :

- Epaisseur de la couche enzymatique = $1\mu\text{m}$.

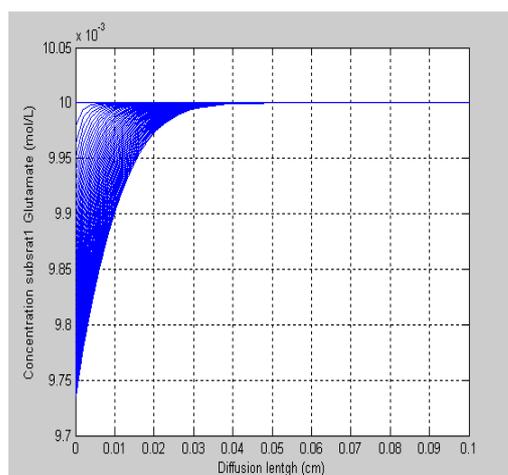
- Concentration d'oxygène dissous $[O_2] = 10^{-2}$ mol/L [16].
- Constante de Michaelis $K_M = 2 \cdot 10^{-4}$ mol/L [23].
- Nombre d'unités enzymatiques par unité de volume : $N_{enz} = 10^5$ unités /cm³.

Finalement le glutamate-EnFET a été étudié dans la gamme de concentration de glutamate en solution $[10^{-7} - 10^{-2}]$.

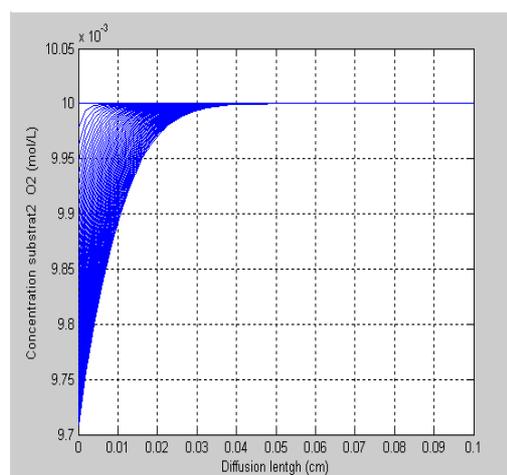
III.1 Distribution de concentration en phase aqueuse

Nous allons étudier la variation des concentrations des substrats (le glutamate et l'oxygène) et des produits (l'ammoniac, l'oxoglurate et le peroxyde hydrogène) en fonction de la distance à la surface du capteur.

III.1.1 Etude des substrats



a. Diffusion du glutamate



b. Diffusion de l'oxygène

Figure III.5. Diffusion des substrats en fonction de la distance

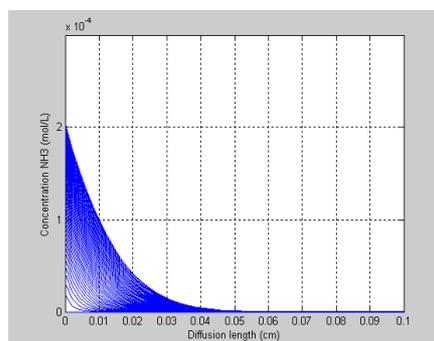
La figure III.5 représente la distribution des concentrations en glutamate et en oxygène pour différents temps. Au début de la réaction, les deux substrats (le glutamate et l'oxygène) sont caractérisés par une concentration constante égale à 10^{-2} mol/L. Au fur et à mesure que la réaction enzymatique a lieu à la surface du capteur ($x=0$), leurs concentrations vont diminuer faisant apparaître des profils caractéristiques des phénomènes de diffusion.

Il apparait ainsi clairement que les réactions intervenants dans la couche enzymatique (épaisseur : $1\mu\text{m}$) sont responsables de variation de la concentration à des distances quasi-millimétriques (0,5 mm en 10 s).

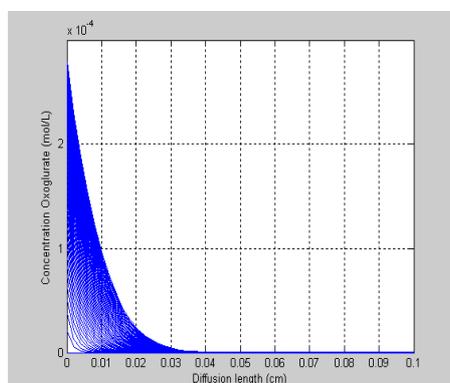
III.1.2 Etude des produits

La figure III.6 représente la distribution des concentrations en ammoniac, oxoglurate et peroxyde d'hydrogène pour différents temps. Ces courbes mettent en avant la diffusion des espèces produites de la surface du capteur ($x=0$) vers le volume du liquide analysé. Les concentrations sont maximales au plus près de la couche enzymatique ($x=0$). Les valeurs obtenues sont de l'ordre de $2 \text{ à } 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, ceci en fonction des coefficients de diffusion des espèces chimiques concernées. Finalement, il apparait à nouveau que les variations de concentration ont lieu sur des dimensions quasi-millimétriques (0,5 mm en 10 s).

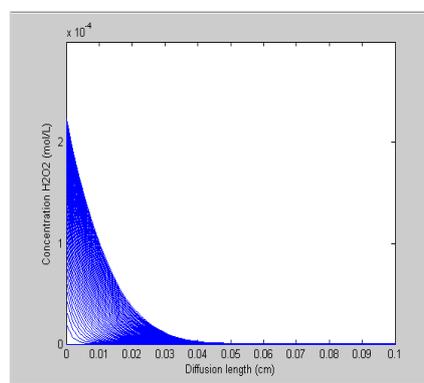
La réaction enzymatique va consommer le glutamate et l'oxygène pour produire l'ammoniac, l'oxoglurate et le peroxyde hydrogène.



a. Diffusion de l'ammoniac



b. Diffusion de l'oxoglurate



c. Diffusion du peroxyde d'hydrogène

Figure III.6. Diffusion des produits en fonction de la distance

III.1.3 Variation de pH

La figure III.7 représente l'évolution du pH en fonction du temps à la surface du capteur ($x=0$). La consommation du glutamate en présence de la glutamate oxydase fait apparaître la production du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniac. Ce dernier est responsable de l'augmentation de la basicité: plus la consommation de glutamate est importante, plus le pH va augmenter. De même, plus le milieu est acide, plus la quantité d'ammoniac nécessaire à cette variation doit être grande, et donc plus la quantité de glutamate à consommer doit être importante. Cette augmentation de pH atteint une valeur limite, qui est la valeur d'équilibre noté $\text{pH}(0,+\infty)$. Pour des temps inférieurs à une dizaine de secondes, le pH se stabilise autour de cette valeur garante du bon fonctionnement du microcapteur. C'est en effet à partir de cette valeur limite que seront déterminées les potentialités de détection du glutamate-EnFET.

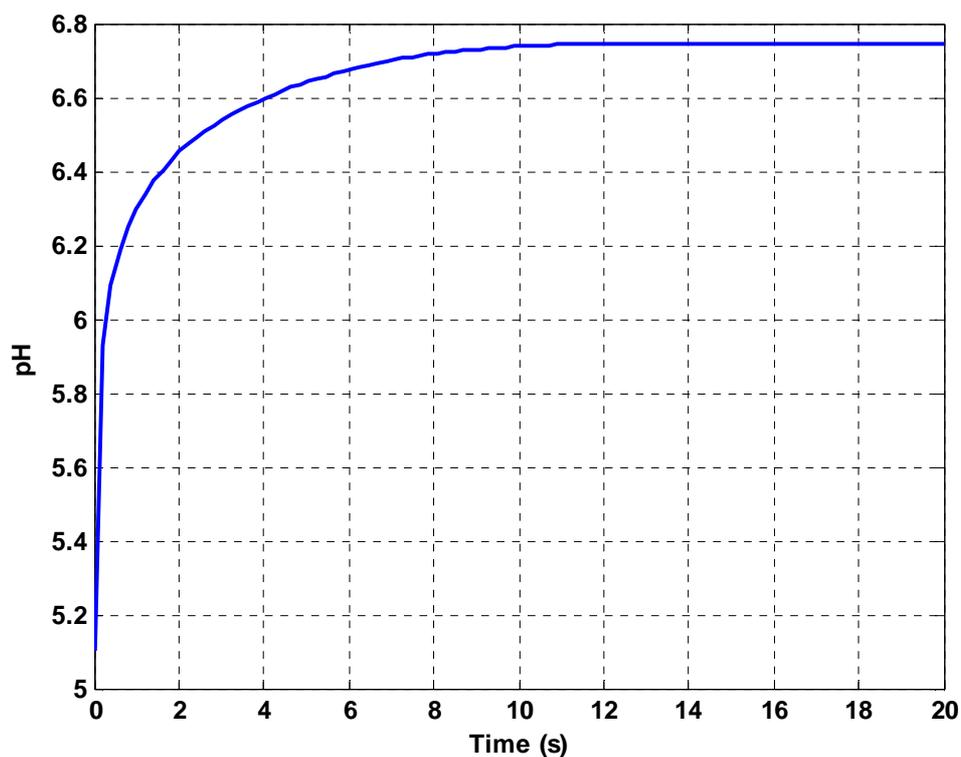


Figure III.7. Evolution du pH en fonction du temps

III.2 Etude des paramètres influents

III.2.1 Influence de la concentration enzymatique N_{enz}

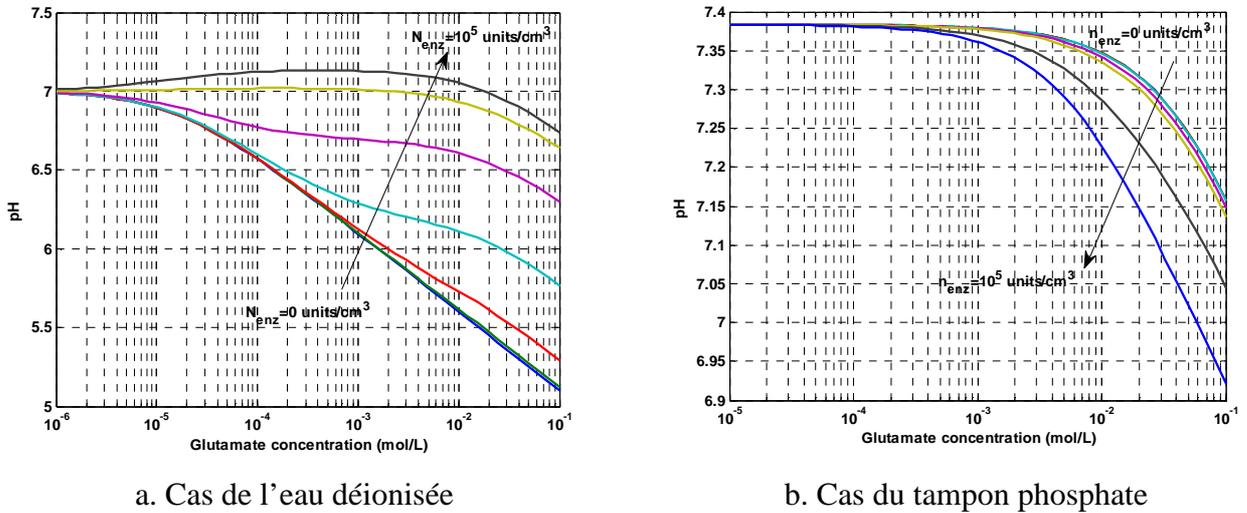


Figure III.8. Evolution de pH du glutamate-EnFET en fonction de la concentration du substrat pour différentes valeurs de nombres d'unités enzymatiques par unité de volume N_{enz}

La figure III.8 représente les différentes valeurs pH ($0, +\infty$) en fonction de la concentration en glutamate pour différentes valeurs de concentration enzymatique N_{enz} ($K_M = 2.10^{-4}$ mol/L, $[O_2] = 10^{-2}$ mol/L) dans l'eau déionisée ($pH \approx 7$) et dans le tampon phosphate ($pH = 7,4$). Quelle que soit la solution support, le glutamate-EnFET est sensible à la concentration de glutamate et la sensibilité la plus élevée ($\sim 0,5$ pH / pGlutamate dans la gamme millimolaire) est obtenue pour une valeur N_{enz} égal à zéro. Ces résultats sont liés aux propriétés du glutamate. Comme le glutamate est un acide, l'augmentation de sa concentration est en effet responsable d'une diminution de la valeur du pH.

Dès que la glutamate oxydase est en opération ($N_{enz} \neq 0$), l'hydrolyse du glutamate est responsable de la production de l'oxoglurate et de l'ammoniac dans un rapport 1 :1. Pour comprendre l'influence de la concentration enzymatique N_{enz} , il faut étudier les variations de pH liées à cette production (figure III.9). Il apparaît que cette production tend à l'équilibre vers une valeur de pH de l'ordre de 7,28. Dans le cas de l'eau déionisée ($pH = 7$), la réaction de la glutamate oxydase va donc entraîner une augmentation de pH et l'augmentation de la concentration N_{enz} va entraîner une diminution de sensibilité (figure III.8a). Au contraire, dans le cas du tampon phosphate ($pH = 7,4$), la réaction enzymatique sera responsable d'une diminution de pH et d'une augmentation de sensibilité (figure III.8b).

Ces résultats montrent clairement que la concentration enzymatique N_{enz} n'est pas un paramètre déterminant. Ses influences vont dépendre principalement du milieu analysé. Ensuite, les propriétés acido-basiques du mélange oxoglurate/ammoniac impliquent que le paramètre N_{enz} n'aura que peu d'influence sur la sensibilité et que ces sensibilités seront généralement faibles. Pour exemple, dans le cas de la salive ($pH \approx 7$) [17], les variations de pH seront au maximum de 0,28 pH, soit 16 mV (pour un capteur pH-EnFET parfait). Enfin, au vu des propriétés acides du glutamate, il apparaît clairement que le glutamate-EnFET sera caractérisé par des problèmes de sélectivité vis-à-vis du pH, ceci quelle que soit la valeur de N_{enz} .

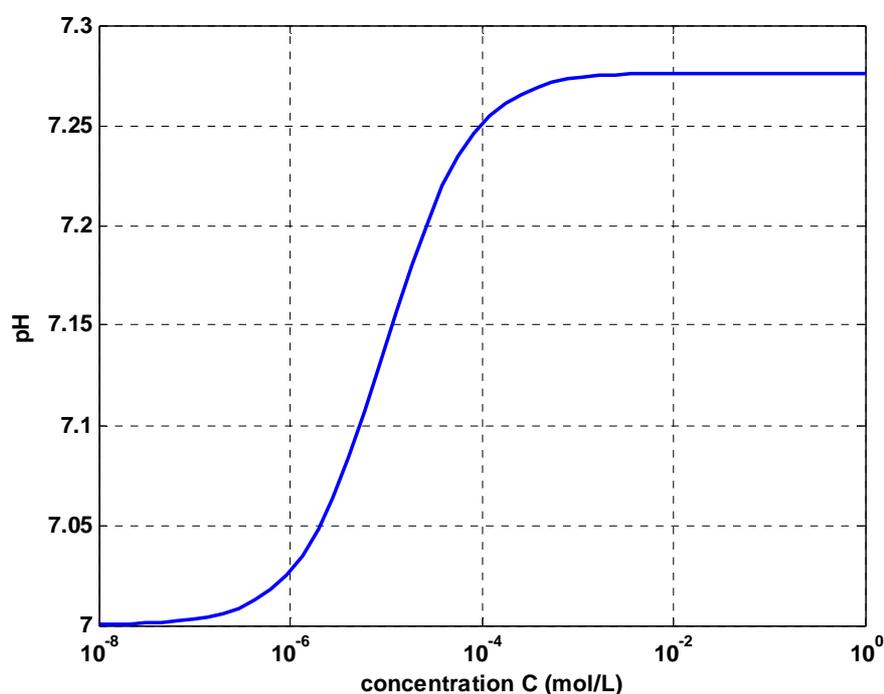


Figure III.9. Evolution du pH de glutamate EnFET en fonction de la concentration du mélange oxoglurate/ NH_3

III.2.2 Influence de la constante de Michaelis K_M

On a fait varier la constante de Michaelis K_M de 10^{-4} à 10^2 mol/L en fixant le nombre enzymatique $N_{enz} = 10^5$ unités/cm³ et la concentration d'oxygène $[O_2] = 10^{-2}$ mol/L.



Figure III.10. Evolution de pH du glutamate-EnFET en fonction de la concentration du substrat pour différentes valeurs de la constante de Michaelis K_M

La figure III.10 représente les différentes valeurs pH (0, +∞) en fonction de la concentration en glutamate pour différentes valeurs de la constante de Michaelis du glutamate oxydase K_M ($N_{enz} = 10^5 \text{ U/cm}^3$, $[O_2] = 10^{-2} \text{ mol/L}$), ceci dans le cas de l'eau déionisée (pH ≈ 7,0) et du tampon phosphate (pH = 7,4). Les courbes ne font pas apparaitre de résultats significatifs. De manière logique (équation 21), l'influence de la constante de Michaelis K_M est globalement inverse à celle de la concentration enzymatique N_{enz} , ceci quelle que soit la solution support choisie : l'eau déionisée ou le tampon phosphate.

III.2.3 Influence de la concentration d'oxygène dissous $[O_2]$

On a fait varier la concentration d'oxygène dissous $[O_2]$ de 10^{-7} à 10^{-1} mol/L en fixant le nombre enzymatique ($N_{enz} = 10^5 \text{ unités/cm}^3$) et la constante de Michaelis ($K_M = 2.10^{-4} \text{ mol/L}$)



Figure III.11. Evolution du pH de glutamate-EnFET en fonction de la concentration du substrat pour différentes valeurs de concentration d'oxygène dissous $[O_2]$

La figure III.11 représente les différentes valeurs pH ($0, +\infty$) en fonction de la concentration en glutamate pour différentes valeurs de la concentration d'oxygène ($N_{enz} = 10^5$ U/cm³, $K_M = 2.10^{-4}$ mol/L), ceci dans le cas de l'eau déionisée (pH $\approx 7,0$) et du tampon phosphate (pH = 7,4). Toujours de manière logique (équation 21), il apparaît que la concentration en oxygène dissous dans la solution $[O_2]$ a les mêmes influences que la concentration enzymatique N_{enz} , ceci quelle que soit la solution support utilisée. Ce phénomène est potentiellement un problème car ce paramètre $[O_2]$ sera généralement inconnu.

Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre la modélisation du glutamate-EnFET en étudiant le principe de détection enzymatique, les mécanismes de diffusion en phase liquide, les équations acido-basiques en milieu aqueux, et la réponse potentiométrique du pH-ChemFET. Les résultats ont permis de montrer les distributions de concentrations de différentes espèces acido-basiques d'intérêt et de caractériser les influences des différents paramètres d'intérêt : la concentration enzymatique N_{enz} , la constante de Michaelis K_M et la concentration en oxygène dissout $[O_2]$. Il en ressort que la filière pH-EnFET peut être utilisé pour la détection du glutamate en milieu tamponné (tel que la salive) mais que le glutamate-EnFET présentera naturellement de faibles sensibilités de détection, une faible sélectivité vis-à-vis du pH et une forte dépendance vis-à-vis de la solution analysée. Dans ce chapitre, nous allons donc nous intéresser aux résultats obtenus pour la détection du glutamate en comparant l'expérience à la simulation.

Références Bibliographique

- [1] M.L. Pourciel-Gouzy. Développement d'interfaces adaptées aux analyses biochimiques et biologiques - Application aux capteurs chimiques CHEMFETs. Thèse de doctorat, INSA de Toulouse, 2004.
- [2] P. Monsan, D. Combes, Biocatalyse ou catalyse enzymatique, Techniques de l'ingénieur, 2009.
- [3] L. Michaelis, ML Menten, Kinetics of invertase action, *Biochem, Z* 49, 1913, 333–369.
- [4] J. Cooper, P. Foreman, A. Glidle, T. Ling, D. Pritchard, Glutamate oxidase enzyme electrodes : microsensors for neurotransmitter determination using electrochemically polymerized permselective films, *Journal of electroanalytical chemistry*, 388, 1995, 143-149.
- [5] P. Nakorn, M. Suphantharika, S. Udomsopagit and W. Surareungchai, Poly(vinylferrocene)–poly(ethylene glycol) glutamate oxidase electrode for determination of L-glutamate in commercial soy sauces, *World journal of microbiology and biotechnology*, 19, 2003, 479-485.
- [6] A. Basu, P. Chattopadhyay, U. Roychudhuri, R. Chakraborty, A biosensor based on co-immobilized L-glutamate oxidase and L-glutamate dehydrogenase for analysis of monosodium glutamate in food, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2006, 1968-1972.
- [7] I. Isa, S. Ghani, A non-plasticized chitozan based solid state electrode for flow injection analysis of glutamate in food samples, *Food Chemistry*, 112, 2009, 756-759.
- [8] I. Moser, G. Jobst G. Urban, Biosensor arrays for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate, and glutamine, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 2002, 297-302.
- [9] J. Castillo, A. Blochl, S. Dennison, W. Schuhmann, E. Csoregi, Glutamate detection from nerve cells using a planar electrodes array integrated in a microtiter plate, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2005, 2116-2119.
- [10] S. Upadhyay, N. Ohgami, H. Kusakabe, H. Mizuno, J. Arima, T. Tamura, K. Inagaki and H. Suzuki, Performance characterization of recombinant L-glutamate oxidase in a micro GOT/GPT sensing system, *Sensors and Actuators*, B119, 2006, 570-576
- [11] K. Chang, C. Chang, S. Chou, H. Han and C. Chen, Characterization of a planar L-glutamate amperometric biosensor immobilized with a photo-crosslinkable polymer membrane, *Sensors and Actuators*, B122, 2007, 195-203.
- [12] E. McLamore, S. Mohanty, J. Shi, J. Claussen, S. Jeddicka, J. Rickus D. Porterfield, A self-referencing glutamate biosensor for measurement real time neuronal glutamate flux, *Journal of Neuroscience Methods*, 189, 2010, 14-22.
- [13] D. Rand, D. Braken, Y. Mulla, G. Borghs and C. Bartic, Surface Amplification of L-glutamate using a patterned bienzymatic system for biosensing applications, *Ieee Transactions on Nanotechnology*, 10, 2011, 102-110

- [14] D. Braken, D. Rand, A. Andrei, R. Huys, M. Spira, S. Yitzchaik, J. Shappir, G. Borghs, G. Callewaert, C. Bartic, Glutamate sensing with enzyme-modified floating-gate field effect transistors, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2009, 2384-2389
- [15] A. Benyahia, Conception, réalisation et modélisation de microcapteurs pour l'analyse biochimique Application à la détection de l'urée, Thèse de doctorat, UPS de Toulouse, 2010.
- [16] David R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 74th Edition, 1993-1994.
- [17] M. Moritsuka, Y. Kitasako, MF. Burrow, M. Ikeda, J. Tagami, The pH change after HCl titration into resting and stimulated saliva for a buffering capacity test *Australian Dental Journal*, 51, 2006, 170-174.
- [18] L. Bousse, The chemical sensitivity of electrolyte/insulator/silicon structures: fundamentals of ISFET operation, Thèse de doctorat, Technische Hogeschool Twente, 1982.
- [19] L. Bousse, N. De Rooij, P. Bergveld, Operation of chemically sensitive field effect sensors as a function of the insulator-electrolyte interface, *Ieee Trans. Electron Devices*, ED30, 1983, 1263–1270.
- [20] P. Temple-Boyer, J. launay, I. Humenyuk, T. Do Conto, A. Martinez, C. B´eriet, A. Grisel, Study of frontside connected chemical field effect transistor for water analysis, *Microelectron. Reliability*, 44, 2004, 443–447.
- [21] A. Poghosian, Determination of the pH_{pzc} of insulators surface from capacitance-voltage characteristics of MIS and EIS structures, *Sens. Actuators*, B44, 1997, 551–553.
- [22] M. Grattarola, G. Massobrio, S. Martinoia, Modelling H^+ -sensitive FETs with SPICE, *Ieee Trans. Electron Devices*, ED39, 1992, 813–819.
- [23] Enzyme : L-Glutamate Oxidase (EC 1.4.3.11), Yamasa Corporation, Tokyo.

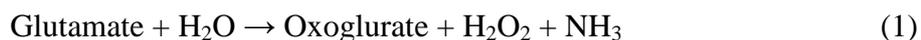
CHAPITRE IV
DETECTION ENZYMATIQUE DU
GLUTAMATE

Introduction

Dans un premier, les capteurs ChemFETs seront fonctionnalisés par une couche enzymatique à base de glutamate oxydase. Les glutamate-EnFETs seront étudiés et comparés à notre modèle (cf. chapitre III). Par la suite nous décrirons le nouveau concept des capteurs nommé ElecFETs basé sur la combinaison de la détection ampérométrique et potentiométrique. Ces études permettront de valider la détection du glutamate via les microdispositifs EnFET et ElecFET.

I. Détection du glutamate par la méthode pH-ChemFET

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent sur la modélisation (équation III.4), la glutamate oxydase catalyse l'hydrolyse du glutamate selon la réaction suivante [1] :



Cette réaction enzymatique est responsable d'une variation de pH due principalement à la formation de l'ammoniac NH_3 en solution grâce au couple acide/base $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$:



Maintenant que la modélisation du capteur glutamate EnFET a été faite sur la base de ces réactions (cf. chapitre III), nous sommes passés aux étapes expérimentales de réalisation de ce capteur en fonctionnalisant les microdispositifs pH-EnFET avec l'enzyme glutamate oxydase.

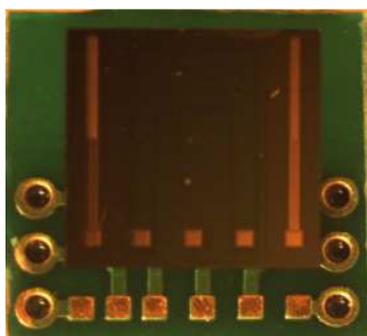


Figure IV.1. Capteur pH-ChemFET avant fonctionnalisation

I.1 Fonctionnalisation enzymatique (du ChemFET à l'EnFET)

Le terme ChemFET est un terme générique qui englobe l'ensemble des capteurs chimiques basés sur le principe du transistor à effet de champ [2-4]. Pour pouvoir adapter un capteur à la détection d'une biomolécule donnée, il faut modifier sa grille sensible par l'ajout d'enzymes spécifiques, aboutissant à la réalisation d'EnFET (Enzymatic Field Effect Transistors). Nous allons présenter dans ce chapitre le développement de microcapteur glutamate-EnFET à partir de pH-ChemFET. L'action catalytique de la glutamate-oxydase est décrite par la figure IV.2.

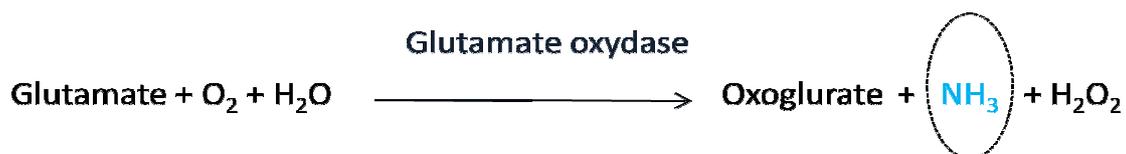


Figure IV.2 : réaction enzymatique du glutamate

La glutamate oxydase est responsable de la production d'ammoniac NH_3 qui est responsable d'une modification locale de pH.

Une étape de fonctionnalisation enzymatique est nécessaire pour la détection d'espèces biochimiques telles que le glutamate. Cette étape est critique : l'enzyme doit être stable dans le temps et l'activité enzymatique doit rester significative pour une meilleure sensibilité et sélectivité du capteur. Plusieurs techniques d'immobilisation d'enzymes existent dans la littérature, respectivement basées sur le glutaraldéhyde, le PEDGE, les matrices hydrogels et sol-gel, les polymères (polypyrole P_{py} et Poly-vinyl alcool PVA) [5-17]. Nous allons dans ce qui suit détailler les deux méthodes utilisées, à savoir la fonctionnalisation par PVA et par glutaraldéhyde.

I.1.a Différents méthodes et protocoles de fonctionnalisation

I.1.a.1 Fonctionnalisation par PVA (Alcool polyvinylique)

Préparation de la couche enzymatique

Nous avons préparé une résine enzymatique composée de PVA (Alcool polyvinylique) dilué à 25% en masse avec une solution de tampon phosphate contenant de l'acide éthylène diamine tetra acétique (EDTA). L'utilisation d'un tampon phosphate permet une meilleure sensibilité [5,6]. L'EDTA contenue dans la membrane permet d'augmenter la durée de vie des

composants [18]. La solution est homogénéisée durant 12 heures sous agitation magnétique à l'abri de la chaleur et de la lumière, pour éviter toute polymérisation, tout en veillant à dégazer la solution. Des tests d'accroche ont été effectués pour la membrane PVA/tampon phosphate sur le nitrure de silicium et la SU-8 recouvrant le biocapteur avec insolation sous UV pendant 30 minutes. Les tests ont montré une mauvaise accroche de la membrane sur les biocapteurs plongés dans une solution aqueuse durant plus de 24 heures.

Vue la cherté de l'enzyme glutamate oxydase et la difficulté d'utilisation de ce dernier, nous avons choisi de travailler à partir du procédé « glutaraldéhyde », ceci avec l'expertise du Laboratoire des Sciences Analytiques de l'université de Lyon [19,20]. Ce procédé se fait en deux étapes, d'abord la préparation de la couche ensuite le dépôt.

I.1.a.2 Fonctionnalisation a partir du procédé glutaraldéhyde

Préparation de la couche enzymatique

L'enzyme L-Glutamate Oxydase (EC 1.4.3.11) a été acheté chez Yamasa Corporation (Japan) par l'intermédiaire de la société 2BScientific (Grande Bretagne). En précisant le prix excessif de cette enzyme (500 euros le flacon de 25 Unités), le protocole suivi est le suivant :

- 1) Prélever une masse donnée (notée m) d'enzymes L-Glutamate Oxydase,
- 2) Prélever une masse identique (m) d'albumine sérique bovine (Bovine Serum Albumin BSA) et mélanger avec les enzymes pour obtenir la solution (A) [21],
- 3) Prélever un volume donnée (noté V) de glycérol et le mélanger avec la solution (A) pour obtenir la solution (B),
- 4) Prélever un volume dix fois supérieur ($10V$) de tampon phosphate (Phosphate buffer solution, pH = 7,4) et le mélanger avec la solution (B) pour obtenir la solution (C).

Vue la difficulté de la manipulation de cet enzyme, (en voulant peser la quantité reçue (25U/flacon), l'enzyme s'hydratait immédiatement dès l'ouverture du flacon), nous avons fait le mélange enzymatique a partir de 5 μL de glycérol avec 50 μL de tampon phosphate PBS (Phosphate Buffer Solution, pH = 7,4) et environ 3 mg d'albumine sérique bovine (Bovine Serum Albumin BSA). En utilisant une seringue, nous avons injecté le mélange dans le flacon contenant 25 unités de glutamate oxydase en laissant le couvercle fermé pour ne pas hydrater

l'enzyme. La quantité enzymatique (N_{enz}) finale contenue dans la solution (C) est alors de l'ordre de 500 U/cm^3 .

Dépôt de la couche enzymatique

Le protocole de dépôt de la couche enzymatique a été le suivant

- 5) Prélever $0,3\mu\text{L}$ de la solution (C) puis le déposer sur la zone sensible du capteur (utilisation d'une micropipette ou du système de dispense automatisé),
- 6) Fixer les capteurs sur un support et les introduire dans un dessiccateur fermé contenant du glutaraldéhyde [22,23] dans un bûcher (ou déposer $0,6 \mu\text{L}$ de glutaraldéhyde 5% après le dépôt de l'enzyme sur la zone sensible et laisser sécher pendant 60 min à l'air libre). Les y laisser trente minutes afin que les vapeurs de glutaraldéhyde assurent l'adhésion de la couche enzymatique (note: les capteurs ne doivent pas plonger dans la solution de glutaraldéhyde),
- 7) Sortir les échantillons du dessiccateur et le faire sécher à l'air pendant une heure au moins,
- 8) Stocker les échantillons à 4°C pendant au moins une nuit.
- 9) Récupérer les échantillons et les plonger dans une solution de tampon phosphate puis laisser à température ambiante (équilibre thermique).

La figure ci-dessous montre le dispositif de dépôt à la seringue et le microcapteur EnFET fonctionnalisé à la glutamate-oxydase sur sa zone sensible.

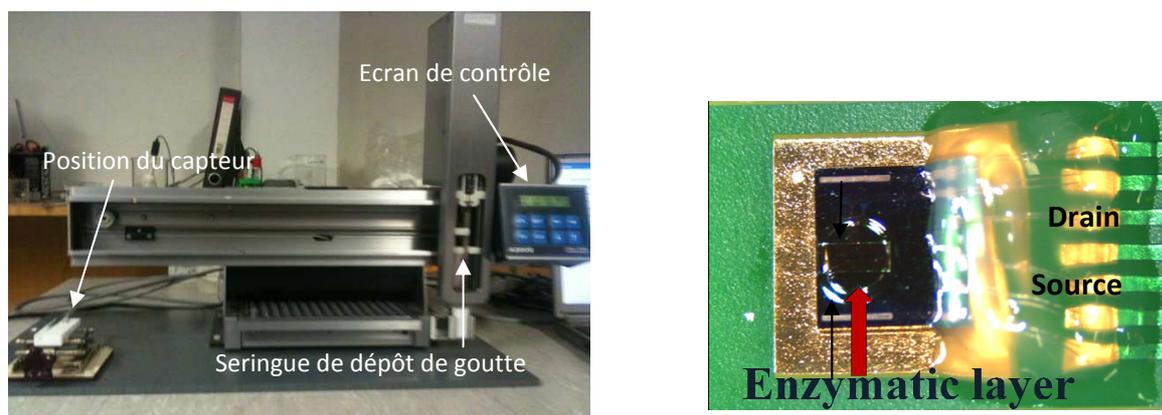


Figure IV.3. Dispositif de dépôt et microdispositif EnFET fonctionnalisé avec de la glutamate-oxydase au niveau de sa zone sensible.

I.2 Protocole de caractérisation

Pour caractériser les EnFETs issus de notre procédé de fabrication, nous avons utilisé un capteur pH-ChemFET fonctionnalisé qu'on appelle glutamate-EnFET et un pH-ChemFET non fonctionnalisé. Pour évaluer les réponses des capteurs, nous avons utilisé le ChemFETmètre développé par I. HUMENYUK et le service 2I du LAAS-CNRS. Les capteurs connectés au ChemFETmètre sont plongés dans 20 mL d'une solution tampon diluée à 10% (pH=7,4) ne contenant pas de glutamate et, au fur et à mesure, chaque 10 minutes, nous injectons une dose de glutamate afin de passer à une concentration de 1, 5, 10, 15, 20 et 25 mM.

I.3 Résultats expérimentaux

Que ce soit pour le glutamate-EnFET ou pour le pH-ChemFET, des réponses de détection similaires ont été obtenues dans la gamme de concentration [0-25 mmol/L], avec une sensibilité autour de 5 mV/ pGlutamate (figure IV.4).

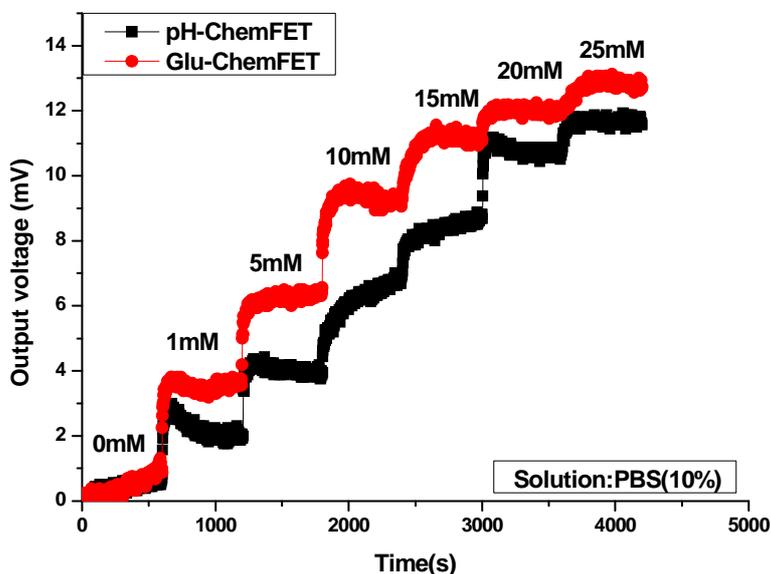


Figure IV.4. Détection de glutamate dans une solution tampon phosphate décimolaire (PBS - 10%, pH = 7,4), comparaison des réponses du pH-ChemFET et le glutamate-ChemFET

Afin de comprendre ces résultats et valider notre modèle de simulation, nous avons étudié la détection du glutamate dans une solution tampon décimolaire PBS (pH = 7,4) en utilisant à

la fois le microcapteur glutamate-EnFET ($N_{enz} = 500 \text{ unit/cm}^3$) et le pH-ChemFET ($N_{enz} = 0 \text{ unit/cm}^3$).

Comme annoncé par la modélisation (cf. chapitre III) en raison des propriétés acido-basiques du glutamate, les capteurs glutamate-EnFETs et pH-ChemFETs sont tous les deux sensibles au glutamate avec des sensibilités similaires. Ce résultat démontre si nécessaire l'interférence du pH et les problèmes inhérents de sélectivité du glutamate-EnFET. Pour mieux analyser ce phénomène, nous avons comparé les résultats obtenus avec le modèle précédemment établi. Nous avons ainsi étudié la détection du glutamate (voir page précédente).

I.4 Comparaison du modèle aux résultats expérimentaux

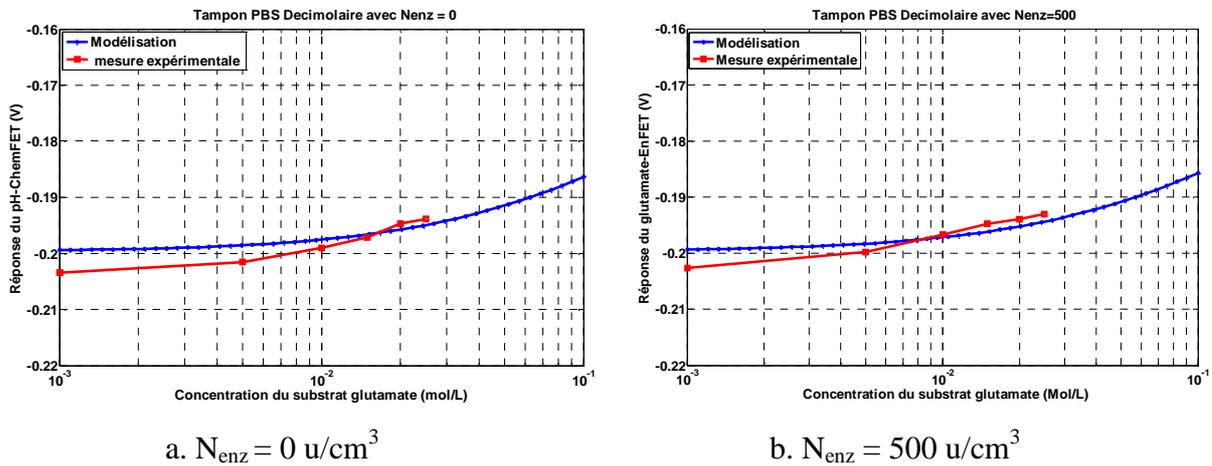


Figure IV.5. Comparaison modèle-expérience de la réponse

du capteur pour $N_{enz} = 0 \text{ u/cm}^3$ et $N_{enz} = 500 \text{ u/cm}^3$ ($K_M = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, $[O_2] = 10^{-2} \text{ mol/L}$).

La figure IV.5 montre la comparaison entre la réponse expérimentale du capteur et la réponse du modèle dans une solution tampon phosphate décimolaire (PBS - 10%, pH = 7,4) pour $N_{enz} = 0$ et 500 u/cm^3 . Nous constatons que les prévisions sont en accord avec les réponses expérimentales ce qui montre la robustesse du modèle. Par contre il apparait une faible détection de la concentration de glutamate (pour $N_{enz} = 500 \text{ u/cm}^3$) ainsi que l'interférence de la détection du pH pour une quantité enzymatique nulle ($N_{enz} = 0 \text{ u/cm}^3$). En fait l'activité enzymatique de la glutamate oxydase est responsable d'une faible variation de pH par rapport aux propriétés acides intrinsèques du glutamate. Ainsi, les microcapteurs glutamate-EnFETs sont utilisables dans une solution tamponnée en augmentant le nombre d'unités enzymatiques par unité de volume (N_{enz}) dans la couche enzymatique. Néanmoins, la

difficulté du conditionnement de l'enzyme et le prix excessif de la glutamate oxydase empêchent d'atteindre des valeurs plus élevées de N_{enz} , ce qui limite la sensibilité de détection à des faibles valeurs (5mV/ pGlutamate) dans la gamme de concentration [1 - 10 mmol / L].

Ainsi, étant donné que les techniques de pH-métrie sont limitées pour la détection de l'ion glutamate, nous avons pensé à un nouveau concept de détection baptisé ElecFET (Electrochemical Field Effect Transistor) qui utilise les méthodes ampérométriques et potentiométriques en se basant sur le peroxyde hydrogène produit (équation 1) afin de détecter l'ion glutamate en solution.

II. Détection du glutamate par méthode pH-ElecFET

Cette partie présente la réalisation d'un concept de microcapteur nommé ElecFET (Electrochemical Field Effect transistor) utilisant la combinaison des méthodes ampérométrique et potentiométrique [24]. Le microcapteur est constitué d'une microélectrode de platine intégrée autour de la zone de grille du transistor à effet de champ sensible aux ions de type ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) [25,26]. Son fonctionnement consiste à déclencher une réaction électrochimique par l'intermédiaire de la microélectrode intégrée et de mesurer localement la variation de pH autour du diélectrique de grille (figure IV.6).

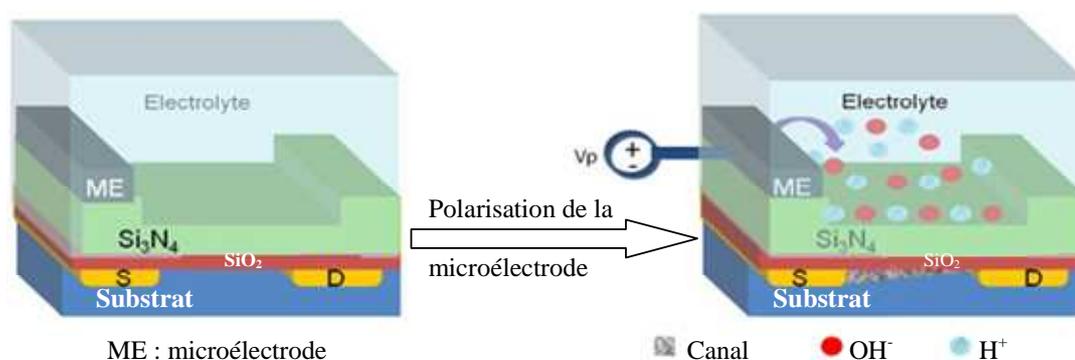


Figure IV.6: Schéma du microdispositif ElecFET et principes de détection associés

Afin de valider le fonctionnement du microcapteur, les premières études ont été menées sur l'électrolyse de l'eau (H_2O). Selon la nature de la polarisation (positive ou négative) de la microélectrode de platine, des variations locales de pH sont mises en évidence. Pour une polarisation positive, on assiste à une diminution du pH alors qu'une polarisation négative augmente le pH autour de la zone sensible. Des études sur les paramètres pouvant influencer la réponse du microcapteur ont aussi été conduites. En effet la durée de la polarisation (t_p) ou le potentiel (V_p) appliqué sur la microélectrode de platine affectent la réponse de l'ElecFET.

Ces travaux sont aussi étendus à la détection du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 puis à la détection de différentes biomolécules dont l'ion glutamate.

II.1 Microfabrication, montage et encapsulation

Cette partie du travail s'est déroulée en plusieurs étapes liées à la réalisation technologique des composants ElecFETs, ainsi qu'à leur caractérisation en phase liquide. Les composants ElecFET ont été réalisés sur des substrats de silicium 4 pouces et fabriqués collectivement dans la centrale technologique du LAAS-CNRS. Chaque ElecFET utilise la même technologie de réalisation des ChemFETs (paragraphe II.2) [27,28].

II.1.1 Conception et fabrication des masques de photolithographie

La technologie ElecFET est la même que la technologie ChemFET. L'évolution du procédé se limite ainsi à l'intégration d'un nouveau masque dans l'étape de métallisation (II.2.14 Masque 6). La figure IV.7 représente le masque photolithographique dédié à la fabrication des puces ElecFETs.

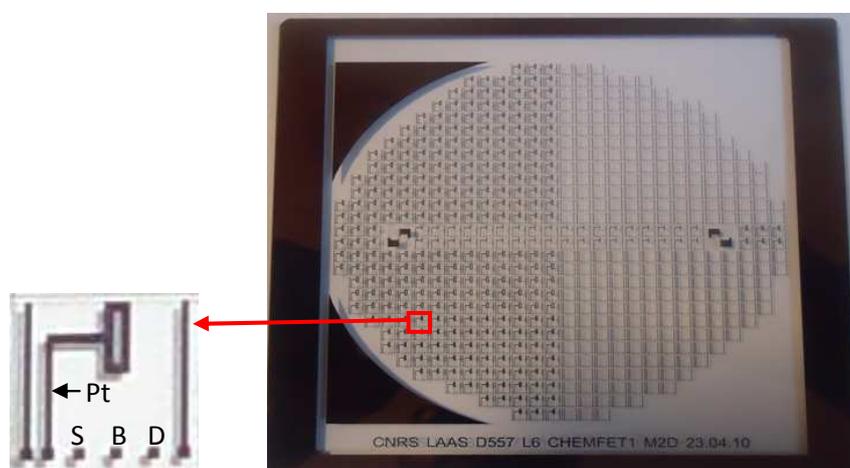


Figure IV.7. Masques relatifs à l'intégration fonctionnelle de la microélectrode électrochimique au cours de la réalisation du procédé ElecFET (S : source ; B : substrat ; D : drain ; Pt : microélectrode platine).

II.1.2 Fabrication microtechnologique

Pour réaliser les puces ElecFETs, nous avons utilisé le nouveau masque de métallisation tantale/platine (masque 6) pour la microélectrode de polarisation autour de la zone sensible au pH. Les couches tantale/platine ont été déposées sur la surface de la plaquette par évaporation thermique (50nm/200nm). La figure ci-dessous montre le substrat avec les différents composants ElecFETs miniaturisés.

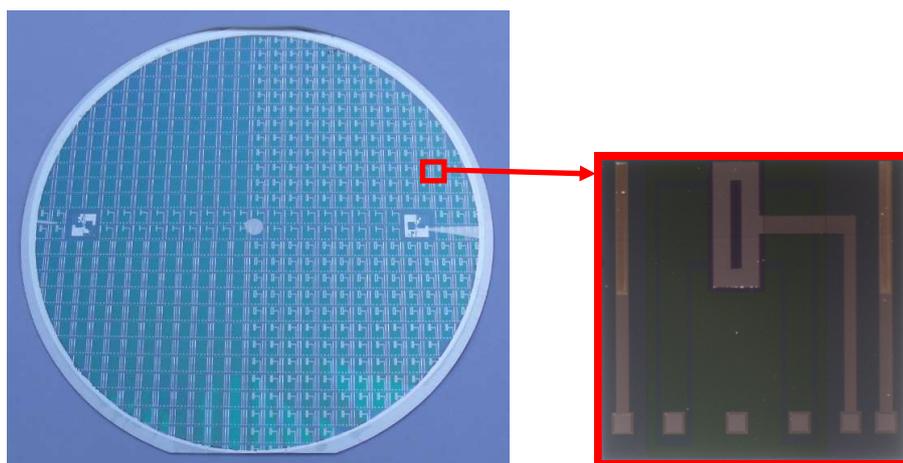


Figure IV.8. Microfabrication collective de microdispositifs ElecFET sur substrat silicium en technologie 4 pouces: plaquette silicium et détail de la puce

II.1.3 Montage, encapsulation et conditionnement à la phase liquide

Une fois les puces ElecFETs réalisées, nous passons au montage des composants sur un circuit imprimé. Un époxy (H70E) est utilisé comme colle pour le report des puces sur le PCB, la connexion électrique des puces sur le circuit est faite par microsoudure (wedge-bonding) et l'encapsulation est faite par enrobage de type glop-top. La figure IV.9 montre des puces ElecFETs montées sur des circuits imprimés de type bâtonnet compatible avec la mesure en phase liquide.

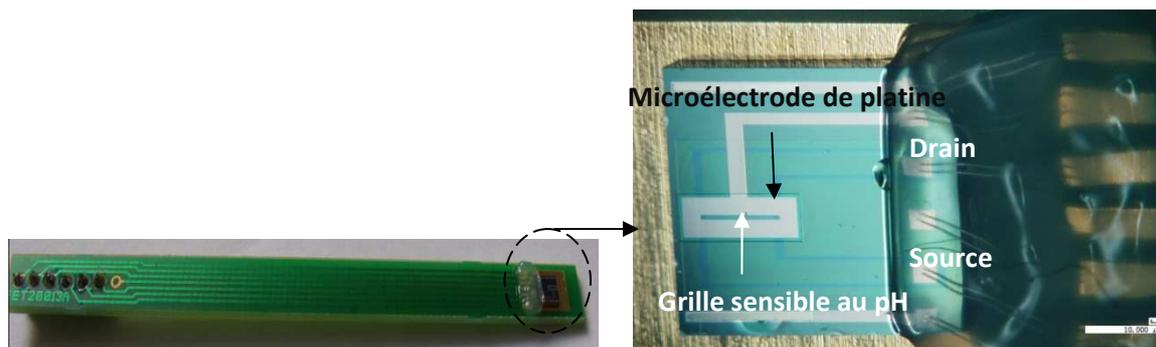


Figure IV.9. Report et connectique des puces ElecFET sur des circuits imprimés compatibles avec la mesure en phase liquide.

II.2 Caractérisation électrique des microdispositifs ElecFET pour l'analyse en phase liquide

Cette étape est dédiée à la caractérisation de l'ElecFET. Une électrode de référence de type chlorure d'argent (ou calomel saturé) et le dispositif ElecFET sont plongés dans 20mL d'une solution tampon phosphate (PBS) à pH=7,4. La polarisation de la microélectrode Ta/Pt est assurée par une source de tension de type Keithley 2400 et l'électrode de référence est connectée à la masse. Ainsi, différentes impulsions de tension sont appliquées sur la microélectrode pour des durées bien déterminées. Nous avons décidé d'utiliser deux électrodes de référence afin de séparer le déclenchement des réactions électrochimiques et la mesure de pH. La figure IV.10 ci-dessous résume le schéma synoptique de mesure. Notons que toutes les mesures ont été effectuées à température ambiante sans aucune précaution particulière. La détection du peroxyde d'hydrogène quant à elle a été effectuée en injectant dans la solution tampon différentes quantités de H_2O_2 contenu dans une solution stabilisée.

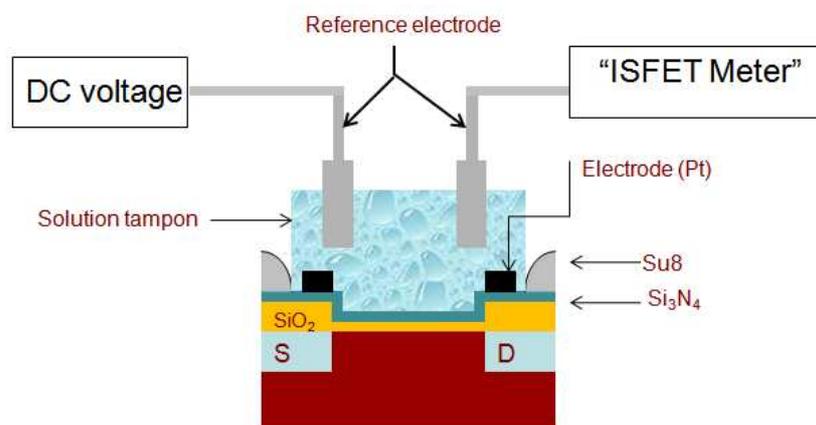


Figure IV.10 : résumé du schéma synoptique de mesure de l'ElecFET.

II.2.1 Electrolyse de l'eau H₂O

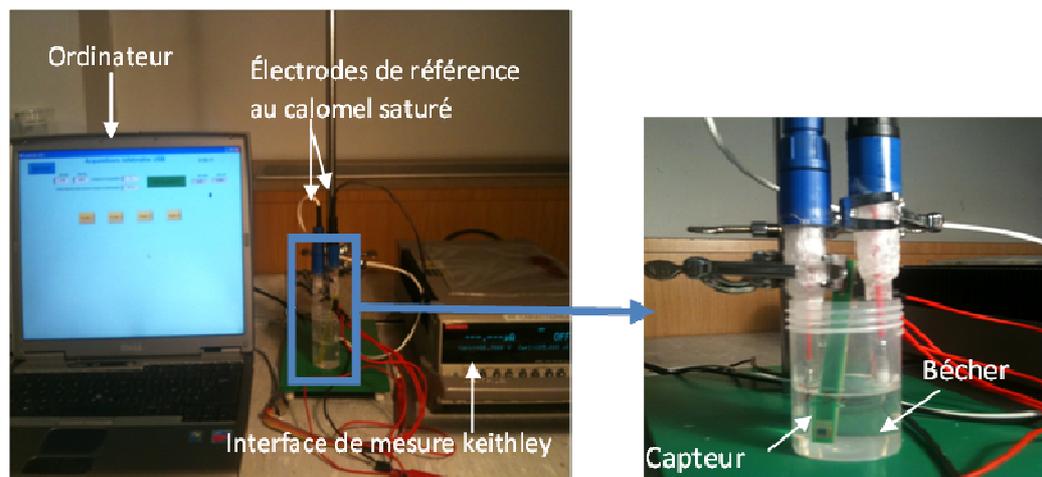
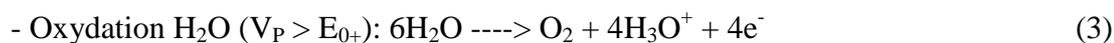


Figure IV.11. Banc de caractérisation et chambre d'analyse en phase liquide.

La figure IV.11 montre le banc de caractérisation et la chambre d'analyse en phase liquide. Les premières études sont basées sur l'électrolyse de l'eau, ceci dans le but de valider le fonctionnement du concept ElecFET. La figure IV.12 montre l'évolution de la tension de sortie (V_{out}) du microcapteur en fonction du temps lorsque différentes polarisations sont appliquées sur la microélectrode de platine pendant une durée $t_p = 5s$. Nous observons des pics positifs et négatifs selon le signe de la polarisation. Pour expliquer ce phénomène, nous nous sommes basés sur les phénomènes d'électrolyse de H₂O en tenant compte des couples redox O₂/H₂O et H₂O/H₂ comme le montrent les équations suivantes :



Où E_{0+} et E_{0-} représentent respectivement le potentiel d'équilibre d'oxydation et de réduction de l'eau.

Il apparait qu'une polarisation positive (respectivement négative) favorise la réaction (3) (respectivement réaction (4)) qui produit des ions H₃O⁺ (respectivement OH⁻) entraînant ainsi une diminution (respectivement une augmentation) locale du pH et par conséquent un décalage de la tension de sortie vers des valeurs de plus en plus positives (respectivement négatives) [29]. Lorsque la polarisation est interrompue, il s'en suit un retour à l'équilibre du système qui est régi par les lois de la diffusion. Cependant une tension au moins supérieure à

1,2 V est nécessaire pour déclencher la réaction (3) alors que dans le cas de la réaction (4) il faudrait une tension inférieure à -0,8 V. L'amplitude du pic est d'autant plus grande que la valeur du potentiel appliquée augmente. Pour une polarisation $V_p = \pm 1,6$ V, on obtient des variations $\Delta V_{out}=150$ mV (c'est-à-dire $\Delta pH = 3$ pour une sensibilité de 50 mV/pH).

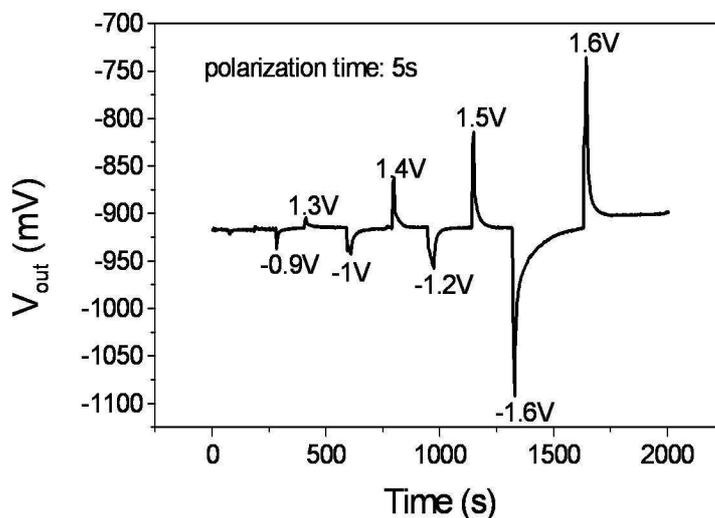


Figure IV.12: évolution de la tension de sortie en fonction du temps pour différentes valeurs de polarisation V_p sur la microélectrode avec $t_p=5$ s dans le cas de la dissociation de H_2O .

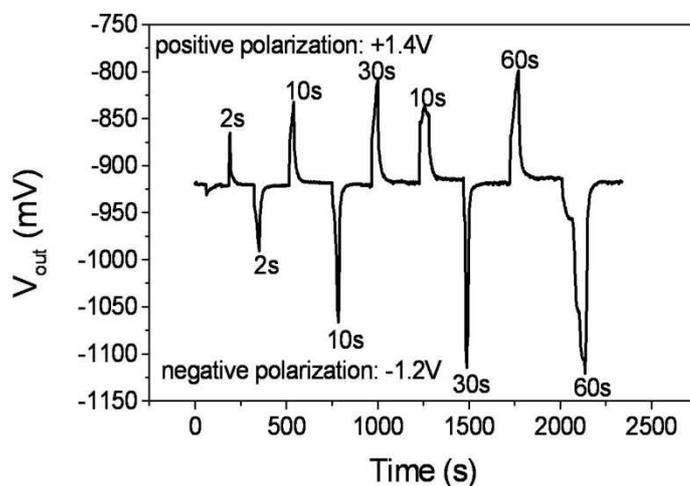


Figure IV.13: évolution de la tension de sortie en fonction du temps pour différentes valeurs de t_p dans le cas de la dissociation de H_2O (polarisations positives et négatives).

La figure IV.13 montre l'évolution de V_{out} en fonction du temps à $V_p = 1,4$ V en polarisation positive (et $V_p = -1,2$ V en négative) sur la microélectrode Ta/Pt pour des durées

t_p variables. L'amplitude des pics augmente avec t_p et sature pour des durées supérieures à 30 secondes. Cette saturation provenant de l'équilibre entre la création d'espèces électrochimiques comme les ions H_3O^+ et OH^- et leur diffusion dans le volume.

Ces résultats nous ont permis de s'assurer de la fonctionnalité du nouveau concept ElecFET et de connaître les différents paramètres susceptibles d'influencer la réponse du microcapteur. Ceux-ci étant validés, il s'en suivra l'étude de la détection du peroxyde d'hydrogène.

II.2.2 Détection du peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Les principes de détection de l'ElecFET, précédemment valides pour l'électrolyse de l'eau H_2O , ont été appliqués à une molécule proche : le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Comme nous le savons, l'oxydation du H_2O_2 est gouvernée par la réaction suivante :



Où E_{1+} représente le potentiel d'équilibre de l'oxydation du peroxyde d'hydrogène ($E_{1+} = 1,77 \text{ V}$ [30]).

La réaction (5) est similaire à la réaction (3) avec dans les deux cas une production d'ions hydronium H_3O^+ . En présence de peroxyde d'hydrogène, une polarisation positive sur la microélectrode de platine est responsable de la production d'ion H_3O^+ et par conséquent de la diminution locale du pH. Comme nous l'observons sur la figure IV.15 (solution de $[H_2O_2]=50\text{mM}$ dans du PBS) qui représente la tension de sortie en fonction du temps pour une polarisation fixée à 0,7 V à des durées t_p variables, V_{out} tend vers des valeurs de plus en plus positives ce qui confirme ainsi l'argument cité ci-dessus. Et comme précédemment dans le cas de l'électrolyse de H_2O , l'amplitude du pic augmente avec t_p et atteint une valeur de saturation au bout de 30 secondes.

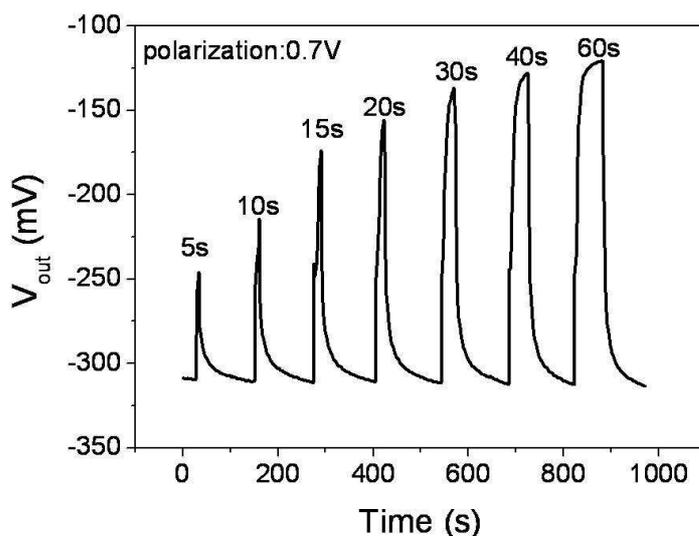


Figure IV.15: tension de sortie en fonction du temps pour différentes valeurs de t_p avec $V_p=0,7V$ dans le cas de la dissociation de H_2O_2 à 50 mM.

L'influence de la polarisation V_p sur la dissociation de H_2O_2 est illustrée sur la figure IV.16. Pour des valeurs de polarisations inférieures à 0,5 V, l'amplitude des pics de V_{out} reste faible. Le même phénomène que dans le cas de l'électrolyse de l'eau est observé à savoir une augmentation de l'amplitude de la tension de sortie lorsque la polarisation augmente mais cette fois-ci entre [0,5 – 0,9 V] avec une variation $\Delta pH = 4$. L'augmentation est plus appréciable à partir de 0,5 V et reste constante dans la gamme de tension comprise entre [0,9 - 1,25 V]. Au-delà de 1,3 V, on assiste à une nouvelle augmentation de l'amplitude du pic, ce phénomène sera discuté dans le paragraphe suivant. Ce comportement lié à la dissociation du peroxyde d'hydrogène semble corroborer la théorie de Butler-Volmer [31] où le courant anodique (I) dépend de la concentration du peroxyde d'hydrogène en solution comme le montre l'expression suivante:

$$- H_2O_2 \text{ oxidation } (V_p > E_{1+}): |I| \approx 2FSk_{1+}[H_2O_2] \exp\left(\frac{2\alpha_{1+}F}{RT} V_p\right) \quad (6)$$

où E_{1+} représente le potentiel d'équilibre du couple O_2/H_2O_2 , F la constante de Faraday, S la surface de la microélectrode, k_{1+} et a_{1+} sont respectivement les constantes de vitesse de réaction et le coefficient de transfert de charges anodiques du couple O_2/H_2O_2 , R la constante des gaz parfaits et T la température.

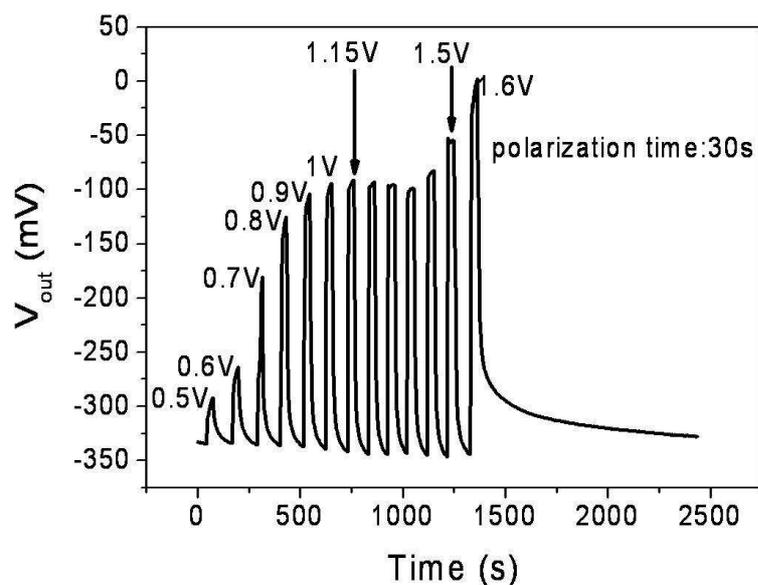


Figure IV.16: tension de sortie en fonction de du temps pour différentes valeurs de V_p avec $t_p=30$ s dans le cas de la dissociation de H_2O_2 à 50 mM.

Pour faire une étude comparative nous avons reporté sur la figure IV.17 la variation de la tension de sortie ΔV_{out} en fonction du potentiel appliqué sur la microélectrode de platine pour $t_p=30$ s dans les cas suivants :

- solution contenant 50 mM de H_2O_2 dans du PBS (A)
- solution PBS sans H_2O_2 (B)

Nous notons une augmentation de ΔV_{out} en fonction du potentiel appliqué à partir de 0,5 V suivi d'une zone de saturation pour la solution (A). Cette augmentation met bien en évidence la dissociation de H_2O_2 avec une libération d'ions H_3O^+ comme nous l'avons présenté dans le paragraphe précédent, alors qu'il ne se passe rien ou très peu de variation de potentiel de sortie dans le cas de la solution (B) pour des potentiels inférieurs à 1,25 V. Lorsque le potentiel atteint 1,3 V, on note une augmentation brusque de ΔV_{out} qui était jusque-là constant. Ceci est lié à l'oxydation de l'eau qui, à partir de cette valeur de potentiel commence à se mettre en place libérant ainsi des ions H_3O^+ qui vont modifier localement le pH autour de la zone sensible du microcapteur. De ces résultats, nous distinguons la limite de potentiel à appliquer sur la microélectrode de platine lorsqu'on veut détecter le peroxyde d'hydrogène. Au-delà de cette valeur limite de potentiel ($V_p=1,25$ V), il y a interférence avec l'oxydation

de H₂O. Ce travail nous a aussi permis de choisir un potentiel $V_p = 0,7$ V en-dessous de la saturation de ΔV_{out} et au-dessus du seuil d'oxydation de H₂O₂.

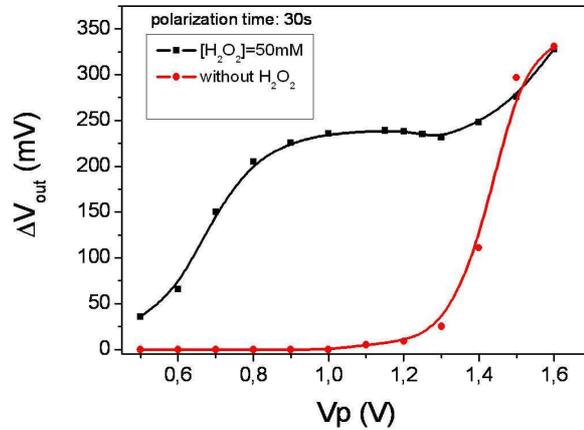


Figure IV.17: évolution de ΔV_{out} en fonction de V_p pour une valeur de $t_p = 30$ s : mise en évidence de la détection de H₂O₂ à 50 mM.

Nous avons aussi étudié la réponse du microcapteur vis-à-vis du H₂O₂ (figure IV.18a) en fixant le potentiel $V_p = 0,7$ V pour un temps $t_p = 30$ s puis en injectant différentes quantités de H₂O₂ dans le PBS. Les résultats montrent que l'amplitude de la variation impulsionnelle de pH (en relation avec V_{out}) dépend de la concentration de H₂O₂ en solution et sature pour de fortes valeurs de [H₂O₂]. Ceci nous a alors permis d'extraire une sensibilité de 5 mV/mM dans une gamme de concentration allant de [10-100 mM]. (Figure IV.18b).

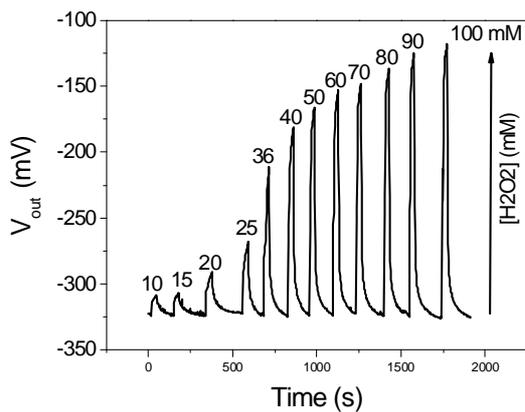


Figure IV.18a. Réponse du capteur en fonction du temps pour différentes concentrations de H₂O₂

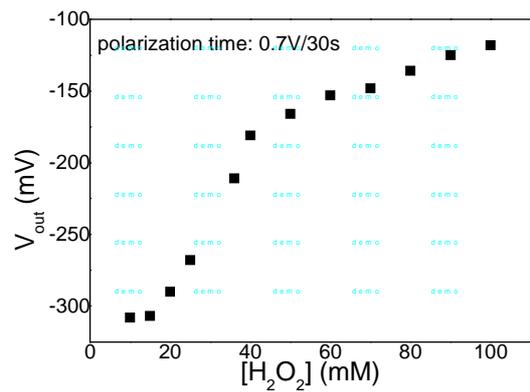


Figure IV.18b. Amplitude du pic V_{out} en fonction de [H₂O₂] pour $V_p=0,7$ V et $t_p=30$ s.

II.2.3 Intégration de couches enzymatiques pour la détection biochimique

Le peroxyde d'hydrogène est un composé chimique pouvant être obtenu par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique. C'est en effet la signature des enzymes de type oxydase. Ainsi, le capteur ElecFET pourra être adapté à la détection biochimique en permettant d'oxyder sur la microélectrode de platine le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 produit enzymatiquement (figure IV.19) :

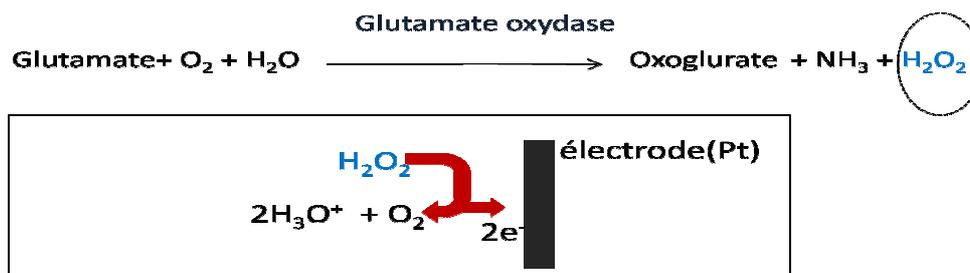


Figure IV.19 : réaction du glutamate catalysée par le glutamate oxydase et réaction de dissociation du peroxyde d'hydrogène sur la microélectrode de platine.

Pour cela, il faut fonctionnaliser la puce ElecFET en utilisant le même processus « glutaraldéhyde » précédemment décrit (Paragraphe I.1.a.2)

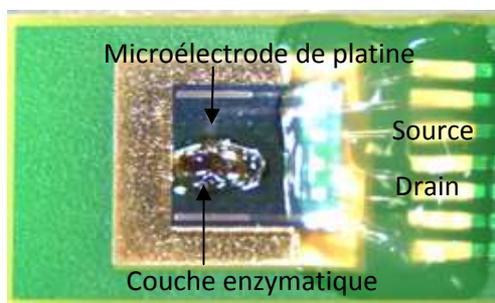


Figure IV.20. Intégration de couches enzymatiques sur l'ElecFET : microdispositif ElecFET fonctionnalisé

Finalement, étant donné que le principe de réaction nécessite l'oxydation de l'eau oxygénée à la surface de la microélectrode de platine, nous avons choisi de travailler avec une polarisation $V_p=0,7V$ et un temps de polarisation $t_p = 5$ minutes. Le choix d'une valeur t_p aussi élevée étant en fait dû à la nécessité de pallier aux faibles activités enzymatiques des enzymes étudiées.

II.3 Application à la détection enzymatique

II.3.1 Détection du glucose

Afin de valider l'étude sur la fonctionnalisation enzymatique, nous nous sommes d'abord intéressés à la glucose oxydase car elle a une activité enzymatique élevée et est simple d'utilisation, ce qui permet d'effectuer plusieurs essais et de faciliter ainsi l'optimisation du protocole. L'enzyme glucose oxydase a été fournie par la société Sigma Aldrich. L'équation suivante montre la réaction chimique associée :

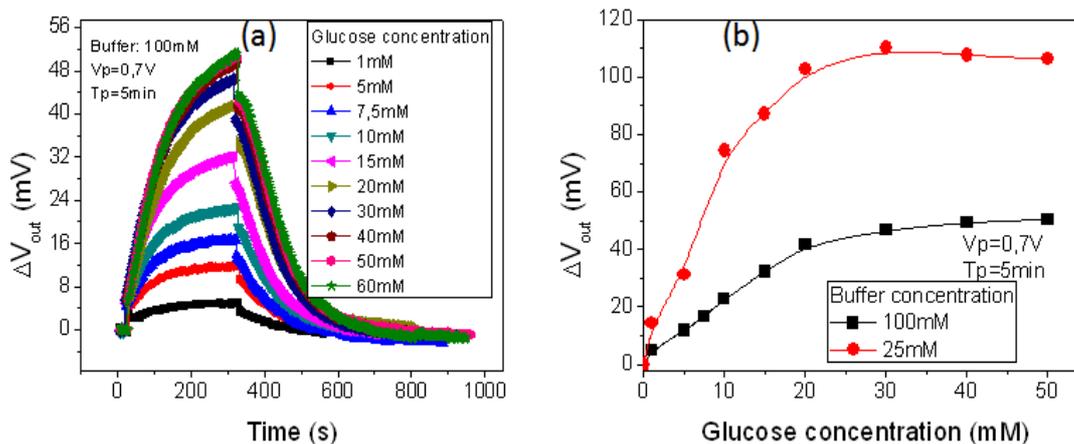
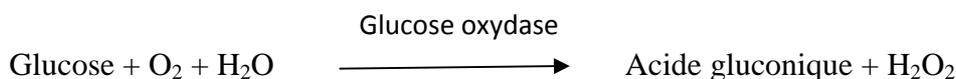


Figure IV.21 : réponse du capteur (a) en fonction du temps pour différentes concentrations de glucose dans une solution tampon de 100mM, (b) en fonction de la concentration du glucose pour des concentrations de tampon de 100mM et 25mM.

La figure IV.21a montre les variations de la tension de sortie en fonction du temps pour différentes concentrations de glucose en fixant les paramètres V_p et T_p respectivement à 0,7V et 5min dans une solution tampon phosphate à 100mM. Lorsque la concentration de glucose augmente, la variation de la tension de sortie augmente dans le même sens. En effet la réaction du glucose en présence de la glucose oxydase produit du peroxyde d'hydrogène. Or ce dernier se transforme à un potentiel égale 0,7 V en libérant des ions H_3O^+ entrainant une modification du pH autour de la zone sensible se traduisant par une augmentation de la tension de sortie.

En reportant le maximum de la tension de sortie en fonction de la concentration du glucose, nous obtenons la figure IV.21b pour deux solutions tampon de concentrations différentes (100m M et 25mM). Comme observé sur cette figure, la sensibilité du capteur varie en fonction de la concentration de la solution tampon utilisée. Nous avons ainsi extrait des sensibilités allant de [2-6mV/mM] dans une gamme de concentrations comprise entre [1-30mM].

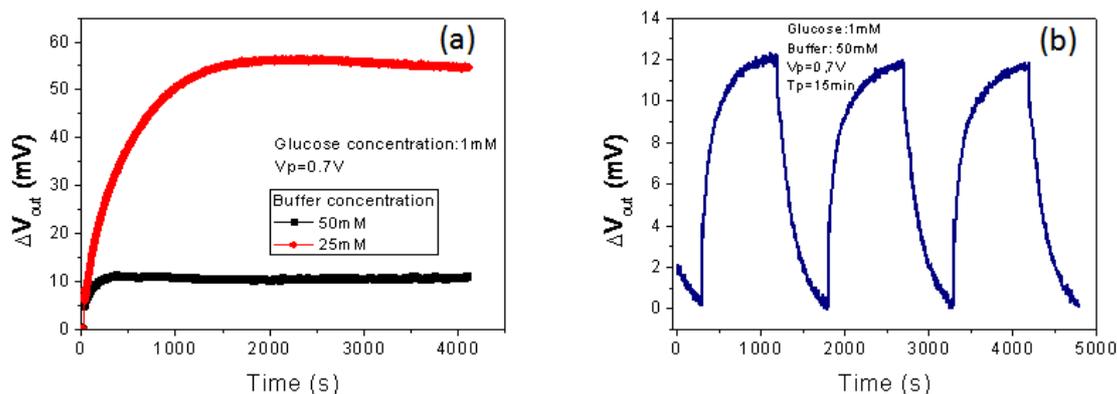


Figure IV.22 : évolution de la réponse du capteur en fonction du temps dans une solution de glucose à 1mM (a) pour une durée de polarisation de 4000s dans deux solutions de tampon phosphate différents, (b) étude de réversibilité pour des cycles de polarisation de 15min.

Pour une concentration de glucose de 1mM, lorsque nous maintenons constant la polarisation sur la microélectrode platine (0,7V) pendant environ 4000s de façon continue, nous constatons que la réponse du capteur évolue d'abord de façon linéaire avant de saturer. La valeur de saturation dépend de la concentration du tampon (10mV et 55mV respectivement pour 50mM et 25mM de tampon phosphate) comme montré sur la figure IV.22a. Ainsi, la sensibilité pourrait être améliorée en augmentant le temps de polarisation t_p qui maintiendrait en permanence la réaction électrochimique c'est-à-dire la transformation continue du peroxyde d'hydrogène. La figure IV.22b est une évolution de la réponse du capteur pour des cycles de polarisation de 15min. Nous constatons une bonne réversibilité de la mesure lorsque le potentiel V_p est fixé à 0,7V.

II.3.2 Détection du glutamate

Comme nous l'avons déjà présenté dans le paragraphe (I.1.a.2), nous rappelons que l'enzyme L-Glutamate Oxydase (EC 1.4.3.11) a été commandé chez Yamasa Corporation par

l'intermédiaire de la société 2BScientific à un prix très élevé pour 25 Unités. D'après le schéma réactionnel de la figure IV.19, cette substance libère du peroxyde d'hydrogène en présence de la glutamate oxydase. Comme dans le cas de la détection du glucose, la figure IV.23 représente l'évolution de la réponse du capteur en fonction du temps pour différentes concentrations du glutamate lorsque V_p et t_p sont fixés respectivement à 0,7V et 5min dans un tampon phosphate à 10%.

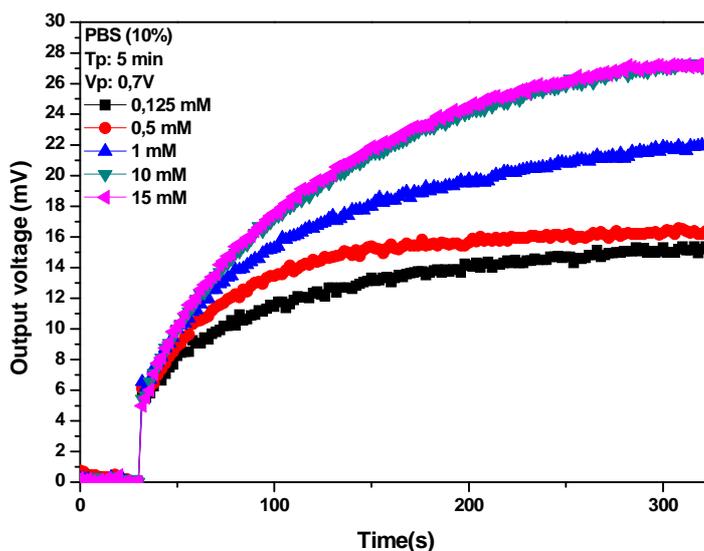
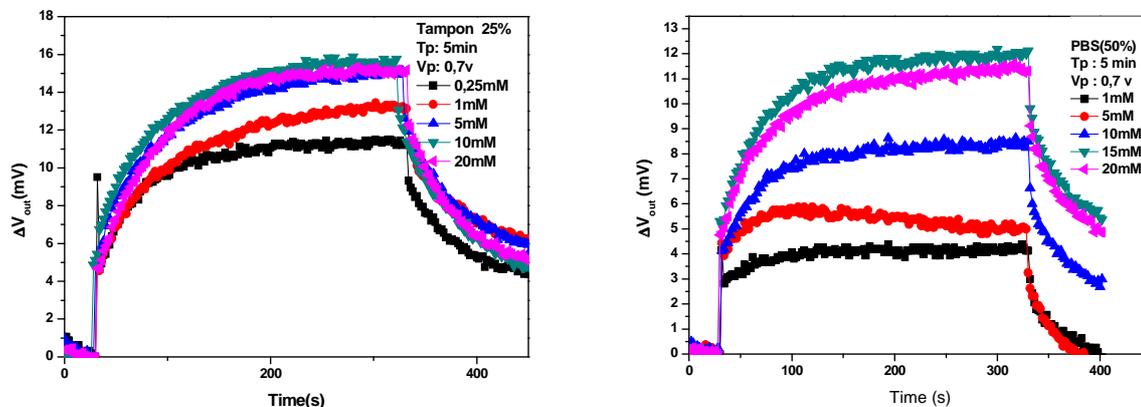


Figure IV.23 : réponse du capteur glutamate-ElecFET en fonction du temps pour différentes concentrations du glutamate dans une solution tampon phosphate à 10%,

Le principe de détection est le même que celui du glucose à savoir : en présence de glutamate-oxydase, le glutamate est transformé en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier subit ensuite une transformation électrochimique pour une polarisation de 0,7V libérant ainsi des ions H_3O^+ provoquant alors une modification locale du pH.

Tout d'abord, la détection du glutamate a été réalisée dans une solution tampon phosphate décimolaire (pH = 7,4). Dès que la microélectrode est polarisée et, comme prévu, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est oxydé sur la microélectrode en platine, en conséquence le pH local diminue autour de la grille sensible au pH et la réponse du glutamate-ElecFET est caractérisée par une augmentation de la tension de sortie en fonction de la concentration du glutamate. Pour la solution de tampon phosphate à 10% par rapport à un microcapteur glutamate-ChemFET, la sensibilité de détection est limitée à 5 mV/pGlutamate dans la gamme millimolaire alors que la limite de détection a été diminuée environ à 0,1 mmol/L. Étant donné que les principes de détection du glutamate-ElecFET ne sont plus dépendants des

propriétés intrinsèques acido-basiques de l'ion glutamate, aucune interférence de pH liée à l'acide glutamique n'a été mise en évidence. Cependant, l'influence des propriétés de la solution tampon a été étudiée pour deux tampons différents 25% et 50% (figure IV.24).



a) solution tampon phosphate à 25%

b) solution tampon phosphate à 50%

Figure IV.24. Réponse du capteur glutamate-ElecFET en fonction du temps pour différentes concentrations de glutamate dans une solution tampon phosphate à 25% et 50%

La figure IV.24 montre la réponse du capteur en fonction du temps pour une solution de glutamate à différentes concentrations dans des tampons de 25% et 50%. On voit clairement l'influence du tampon sur l'évolution de la réponse du capteur, cette dernière sature très vite lorsque la concentration de la solution tampon augmente. De plus la sensibilité du capteur peut être améliorée en augmentant la durée de polarisation appliquée sur l'électrode de platine.

Les résultats obtenus ont été regroupés dans une seule courbe pour une comparaison à l'échelle logarithmique (figure IV.25). Lorsque la concentration du tampon est de 50% (ou supérieure à cette valeur), on n'observe aucune variation de la réponse entre 0,1mM et 1mM de glutamate. Ce comportement est très probablement lié à la forte concentration du tampon qui a tendance à inhiber la réponse. Donc, pour observer une réponse exploitable, il faut utiliser des concentrations de tampon inférieures à 50% (Figure IV.25). Ainsi, plus la concentration du tampon est forte plus la réponse du capteur est faible et plus le tampon est dilué plus la réponse est amplifiée.

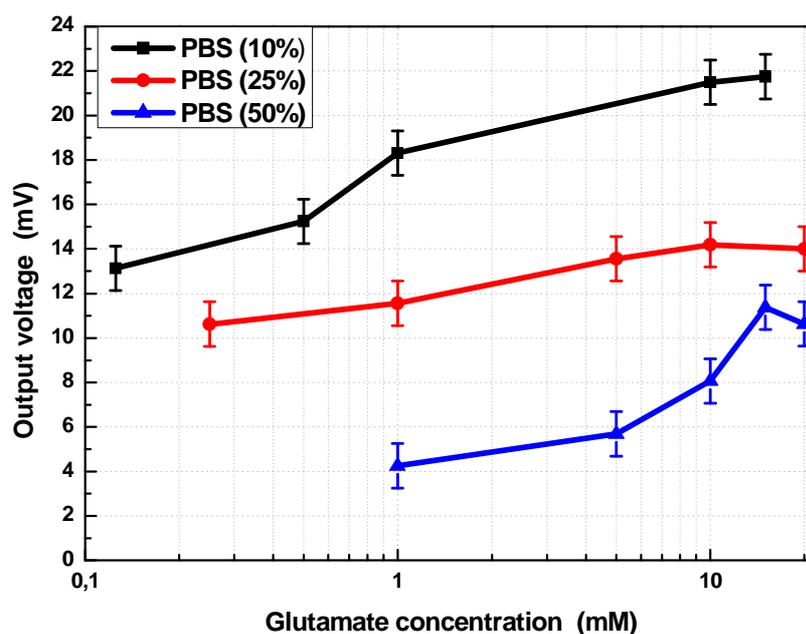


Figure IV.25 : évolution de la réponse du capteur en fonction de la concentration du glutamate à l'échelle logarithmique dans trois solutions de tampon phosphate différentes (50%, 25%,10%)

Conclusion

Dans cette étude, nous avons étudié la détection du glutamate par la méthode pH-ChemFET. Ensuite, des études de fonctionnalisation de surface par des couches enzymatiques ont été menées en vue de détection d'espèces biochimiques. Enfin, la caractérisation des capteurs glutamate-EnFETs a été effectuée en comparant avec le modèle de simulation. Une faible sensibilité a été obtenue avec interférence au pH par rapport au pH-ChemFET.

Pour remédier à ce problème, nous avons pensé à mettre en place un nouveau concept de microcapteur, nommé ElecFET, qui consiste à intégrer, autour de la zone sensible d'un ChemFET, une microélectrode de platine. Les différentes étapes technologiques ont été effectuées et les puces ElecFETs, ont été fabriquées dans la centrale technologique du LAAS-CNRS sur le même substrat que les ChemFETs. Ce nouveau concept utilise la combinaison des techniques ampérométrique et potentiométrique. Nous avons validé le fonctionnement de l'ElecFET en étudiant d'abord l'électrolyse de l'eau. Ensuite, l'étude des paramètres pouvant influencer la réponse du capteur a été abordée. Enfin, nous avons appliqué ce nouveau concept à la détection du peroxyde d'hydrogène. Cette étude nous a permis de définir la limite

du potentiel à appliquer sur la microélectrode de platine afin d'éviter une interférence avec la réaction d'oxydation de l'eau. Une sensibilité de 5 mV/mM a été obtenue pour une gamme de concentration en peroxyde d'hydrogène allant de [10-100 mM]. Nous avons ensuite appliqué ce nouveau concept à la détection du glucose : une sensibilité allant de [2-6 mV/mM] dans une gamme de concentrations comprise entre [1-30 mM] a été obtenue. L'étape finale était la détection du glutamate, une sensibilité de 5mV/pGlutamate a été obtenue avec élimination de l'interférence du pH. Le nouveau concept ElecFET a ainsi été validé.

Références bibliographiques

- [1] J.M. Cooper, P.L. Foreman, A. Glidle, T.W. Ling, D.J. Pritchard, Glutamate oxidase enzyme electrodes: microsensors for neurotransmitter determination using electrochemically polymerized permselective films", *Journal of electroanalytical chemistry*, 388, 1995, 143-149.
- [2] M.J. Schöning and A. Poghossian: *Analyst*, 127, 2002, 1137-1151.
- [3] P. Bergveld, *Sensors and Actuators, B* 88, 2003, 1-20.
- [4] A. Poghossian, S. Ingebrandt, A. Offenhäusser, M.J. Schöning, *Seminars in cell & developmental biology*, 20, 2009, 41-48.
- [5] M. Pourciel-Gouzy. Développement d'interfaces adaptées aux analyses biochimiques et biologiques - Application aux capteurs chimiques CHEMFETs, Thèse de doctorat, INSA de Toulouse, 2004.
- [6] A. Benyahia, Conception, réalisation et modélisation de microcapteurs pour l'analyse biochimique Application à la détection de l'urée, Thèse de doctorat, UPS de Toulouse, 2010.
- [7] R. Wilson, Glucose-Oxidase: an Ideal Enzyme, *Biosensors & Bioelectronics*, 7, 1992, 165-185.
- [8] J. Burmeister, K. Moxon, G.Gerhardt, Ceramic-Based Multisite Microelectrodes for Electrochemical Recordings, *Anal. Chem*, 72, 2000, 187-192.
- [9] L. Netchiporouk, A. Shul'ga, N. Jaffrezic-Renault, R. Olier, R. Cespuaglio, Properties of carbon fibre microelectrodes as a basis biosensors , *Analytica Chimica Acta*, 303, 1995, 275-283.
- [10] D. Strike, N. Derooji, M. Koudelkahep, Electrodeposition of Glucose-Oxidase for the fabrication of Miniature Sensors, *Sensor Actuat B-Chem*, 13, 1993, 61-64.
- [11] O. Frey, T. Holtzman, R. McNamara, D. Theobald, P. van der Wal, N. Rooji, J. Dalley, M. Koudelka-Hep, Enzyme-based choline and L-glutamate biosensor electrodes on silicon microprobe arrays, *Biosens Bioelectron*, 26, 2010, 477-484.
- [12] C. McMahon, S. Killoran, R. O'Neil, Design variations of a polymer-enzyme composite biosensor for glucose: Enhanced analyte sensitivity without increased oxygen dependence, *J Electroanal Chem*, 580, 2005, 193-202.
- [13] F. Tian, A. Gourine, R. Huckstepp, N. Dale, A microelectrode biosensor for real time monitoring of L-glutamate release, *Anal Chim Acta*, 645, 2009, 86-91.
- [14] L. Coche-Guerente, S. Cosnier, C. Innocent, P. Mailley, Developement of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives, *Analytica Chimica Acta*, 311, 1995, 23-30.

- [15] E. Liaudet, N. Botting, J. Crayston, N. Dale, A thress-enzyme microelectrode sensor for detecting purine release from central nervous system, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 2003, 43-52.
- [16] Y. Okahata, T. Tsuruta, K. Ijio, K. Ariga, Preparations of Langmuir-Blodgett Films of Enzyme Lipid Complexes – a Glucose Sensor Membrane, *Thin Solid Films*, 180, 1989, 65-72.
- [17] R. Singhal, W. Takashima, K. Kaneto, S. Samanta, S. Annapoorni, B. Malhotra, Langmuir-Blodgett films of poly(3-dodecyl thiophene) for application to glucose biosensor, *Sensor Actuat B-Chem*, 86, 2002, 42-48.
- [18] A. Soldatkin, V. Volotovskiy, A. Elšskaya, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, Improvement of urease based biosensor characteristics using additional layers of charged polymers, *Analytica Chimica Acta*, 403, 2000, 25–29,
- [19] M. Hamlaoui, K. Reybier, M. Marrakchi, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, R. Kherrat, A. Walcarius, Development of a urea biosensor based on a polymeric membrane including zeolite, *Analytica Chimica Acta*, 466, 2002, 39–45
- [20] A. Diallo, L. Djeghlaf, L. Mazenq, T. Nguyen Boisse, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault, J. Launay, P. Temple-Boyer, Development of pH-chemFET-based biosensors for the lactic acid detection, *Biosensors 22nd World Congress on Biosensors*, 15-18 Mai 2012, Cancun, Mexico.
- [21] Y. B. Hu, K. M. Mitchell, F. N. Albahadily, E. K. Michaelis, G. S. Wilson, (1994) Direct Measurement of Glutamate Release in the Brain Using a Dual Enzyme-Based Electrochemical Sensor, *Brain Res* 659, 117-125.
- [22] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. Bertrand, K. Waldron, "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking", *Biotechniques*, 37, 2004, 790-802
- [23] M. Stephens, F. Pomerlau, P. Huett, G. Gerhardt, Z. Zhang, Real-time glutamate measurements in the putamen of awake rhesus monkeys using an enzyme-based human microelectrode array prototype, *J Neurosci Meth* 185, 2010, 264-272.
- [24] B. Sohn, C. Kim, A new pH-ISFET based dissolved oxygen sensor by employing electrolysis of oxygen, *Sensors and Actuators*, B 34, 1996, 435-440
- [25] H. Seo, C. Kim, B. Sohn, T. Yeow, M. Son, M. Haskard, *Sensors and Actuators*, B 40, 1997, 1-5.
- [26] B. Sohn, B. Cho, C. Kim, D. Kwon, *Sensors and Actuators*, B 41, 1997, 7-11.
- [27] P. Temple-Boyer, J. Launay, I. Humenyuk, T. Do Conto, A. Martinez, C. Bériet, A. Grisel, *Microelectronics Reliability*, 44, 2004, 443-447.
- [28] W. Sant, P. Temple-Boyer, E. Chanié, J. Launay, A. Martinez: "On-line monitoring of urea using enzymatic field effect transistors", *Sensors and Actuators*, B160, 2011, 59-64

[29] A. Bard and L. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamental and applications, second edition*", New York: John Wileys & Sons Inc. (2001).

[30] *Handbook of Chemistry and Physics*, David R. Lide, 88th edition (2007-2008).

[31] B. Sohn, C. Kim, *Sensors and Actuators*, B 34, 1996, 435-440.

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce mémoire ont concerné le développement de microcapteurs électrochimiques ChemFETs et la réalisation d'un modèle de simulation de ces derniers. L'objectif de la thèse était de comprendre les phénomènes mis en jeu, lors de la détection enzymatique afin de l'optimiser pour une détection du glutamate dans le cadre du projet NUTRISENSORS en collaboration avec l'UMR FLAVIC INRA (Institut National de la Recherche Agroalimentaire de Dijon).

Le premier chapitre de ce mémoire a été consacré à présenter un état de l'art des capteurs chimiques appliqués aux analyses des goûts (acide, sucré, amer, salé et umami). Après avoir rappelé brièvement quelques notions sur les cinq goûts de base, nous avons expliqué l'historique du développement des ChemFET. Ce chapitre nous a permis de faire un rapide tour d'horizon sur les besoins dans le domaine des capteurs chimiques et biochimiques, ainsi que les solutions concurrentes proposées jusqu'ici. Le choix du type de capteur a été justifié, son principe physico-chimique de détection a été rappelé.

Nous avons présenté le procédé de fabrication développé au sein de la centrale technologique du LAAS-CNRS. Les capteurs chimiques réalisés ont montré de bons rendements de production conformes aux spécifications. Ces capteurs délivrent une bonne sensibilité au pH et peuvent être utilisés avec une électrode de référence classique, un fil d'Ag/AgCl ou une électrode Ag/AgCl intégrée. Lors de la fabrication des ChemFETs, nous avons développé une technique de fabrication de microélectrodes Ag/AgCl. Le procédé de dépôt d'argent ayant été validé, nous avons utilisé la réaction chimique instantanée du FeCl_3 comme technique de chloration de l'argent. Cette technique a donné une grande satisfaction et des résultats de mesure comparables aux résultats obtenus avec l'électrode filaire Ag/AgCl. Ainsi une puce tout intégrée offrant d'excellents résultats de mesure a été développée. Ces bons résultats ont donc permis de valider le procédé de fabrication. Nous avons ensuite démontré les potentialités de nos capteurs en effectuant diverses caractérisations. Des sensibilités au pH de l'ordre de 50 mV/pH ont été mesurées avec un fil Ag/AgCl en guise d'électrode de référence.

La technique adaptée à la réalisation des couches sensibles enzymatiques à l'aide du glutaraldéhyde a permis de fonctionnaliser nos capteurs. Cette méthode a montré des résultats intéressants et a mis en évidence la potentialité de mesurer le glutamate.

L'objectif principal de la thèse était de réaliser des microcapteurs EnFET avec un modèle de simulation qui prend en compte tous les paramètres physico-chimiques influents à savoir la réaction enzymatique, la diffusion, les réactions acido-basiques, la réponse potentiométrique du composant à effet de champ. Ainsi nous avons créé un modèle glutamate-EnFET qui prend en compte tous ces effets. L'étude du modèle a permis d'expliquer les mécanismes agissant lors de la détection, de mettre en lumière les principaux paramètres influents sur la réponse du biocapteur. Le modèle a permis de comprendre les effets de ces grandeurs au sein de la zone de détection de l'EnFET. Cette étude montre qu'il est impérativement nécessaire de contrôler ces paramètres pour la détection du glutamate. Ainsi il en ressort que la filière pH-EnFET peut être utilisée pour la détection du glutamate en milieu tamponnée (tel que la salive) mais que le glutamate-EnFET présentera naturellement de faibles sensibilités de détection, une faible sélectivité due à l'interférence du pH et une forte dépendance vis-à-vis de la solution analysée.

Nous avons fini cette étude par une comparaison du modèle avec des résultats expérimentaux issus de caractérisation de biodétecteurs glutamate-EnFETs que nous avons réalisés au LAAS dans le cadre de la thèse. Les résultats de ces comparaisons ont permis de valider le modèle établi. Le modèle développé est générique, il est possible de l'adapter afin de simuler le fonctionnement d'EnFET dédié à la détection d'autres espèces biochimiques.

Nous avons étudié la détection du glutamate par la méthode pH-ChemFET. Ensuite, des études de fonctionnalisation de surface par des couches enzymatiques ont été menées en vue de détection d'espèces biochimiques. Enfin, la caractérisation des capteurs glutamate-EnFETs a été effectuée en comparant avec le modèle de simulation. Une faible sensibilité a été obtenue avec interférence au pH par rapport au pH-ChemFET. Pour remédier à ce problème, nous avons développé un nouveau concept de microcapteur nommé ElecFET. Les différentes étapes technologiques ont été effectuées et les puces ElecFETs fabriquées dans la centrale technologique du LAAS-CNRS sur un même substrat que les ChemFETs. Ce nouveau concept utilise la combinaison des techniques ampérométrique et potentiométrique. Nous avons validé le fonctionnement de l'ElecFET en étudiant les paramètres pouvant influencer la réponse du capteur. Enfin, nous avons appliqué ce nouveau concept à la détection du peroxyde d'hydrogène. Cette étude nous a permis de définir la limite du potentiel à appliquer sur la microélectrode de platine afin d'éviter une interférence avec la réaction d'oxydation de

l'eau. Une sensibilité de 5 mV/mM a été obtenue pour une gamme de concentration en peroxyde d'hydrogène allant de [10-100 mM]. Nous avons ensuite appliqué ce nouveau concept à la détection du glucose, une sensibilité allant de [2-6 mV/mM] dans une gamme de concentrations comprise entre [1-30 mM] a été obtenue. L'étape finale a été la détection du glutamate : une sensibilité de 5mV/pGlutamate a été obtenue avec élimination de l'interférence du pH. Le nouveau concept ElecFET a ainsi été validé.

Bien que cette nouvelle méthode de détection à base d'ElecFET fonctionne convenablement, la sensibilité de détection reste faible (5mV/pGlutamate), à l'instar des propriétés de détection de l'EnFET. Cette faible sensibilité est liée aux propriétés actuelles des enzymes glutamate oxydase commerciales, caractérisées par de faibles activités enzymatiques et de faibles quantités pour des coûts élevés. On peut espérer une augmentation de sensibilité jusqu'à 30 mV/ pGlutamate en utilisant une quantité enzymatique N_{enz} égale à 5.10^4 unit/cm³. Néanmoins le développement de glutamate oxydase à forte activité enzymatique est envisageable mais n'entre pas dans nos sphères de compétences. En revanche, l'utilisation de l'ElecFET doit permettre d'augmenter la sensibilité du capteur en augmentant la tension de polarisation V_p afin d'accélérer la cinétique d'oxydation du peroxyde d'hydrogène produit. Cette approche nécessite de modéliser les principes de détection de l'ElecFET en prenant en compte la réaction enzymatique, les réactions électrochimiques, les mécanismes de diffusion en solution et les propriétés acido-basiques du milieu analysé. Il sera ainsi possible de comprendre pleinement le fonctionnement de l'ElecFET en vue d'optimisation dans le cadre de la détection du glutamate ou de toute autre espèce biochimique d'intérêt.

Cette technologie permet de diminuer considérablement le prix de revient d'un capteur et de profiter du caractère générique des ChemFETs. En effet, les travaux présentés dans ce rapport se focalisent essentiellement sur la détection dans l'industrie agroalimentaire, mais peuvent être aisément étendus à d'autres types d'analyses médicales (détection de l'urate, lactate...).

Ainsi, il est maintenant possible d'envisager le développement de plate-formes génériques de modélisation, de conception et de réalisation des composants EnFET/ElecFET afin d'ouvrir le champ de leurs applications dans le cadre d'applications liées au domaine de la santé, de la sécurité, de l'environnement et de l'agro-alimentaire. De premières expériences

ont été réalisées en ce sens au sein du masticateur artificiel développé au FLAVIC-INRA. Elles ont à ce jour été limitées à la mesure du pH et il convient de poursuivre les travaux pour la détection de sucres (goût sucré) et du glutamate (goûts umami). De tels travaux permettront de montrer les potentialités d'application des microcapteurs électrochimiques au domaine de la nutrition.

Résumé :

L'acide glutamique et plus particulièrement son ion associé le glutamate sont des additifs largement utilisés dans l'agro-alimentaire car caractéristiques du goût "umami". Cependant, leur consommation en excès peut être responsable de troubles cérébraux entraînant sueurs, maux de tête, perte d'équilibre, évanouissement et/ou douleurs. Il devient ainsi important de développer des techniques d'analyse en phase liquide des ions glutamates. Les travaux visent ainsi le développement de capteurs enzymatiques basés sur les transistors à effet de champ sensibles au pH (pH-ChemFET), pour la détection du glutamate. Ils visent à la réalisation technologique des microcapteurs Glutamate-EnFET (enzymatic field effect transistor), à leur modélisation et à leur caractérisation en milieux aqueux puis dans la salive, et enfin à leur intégration au sein d'un masticateur électronique développé par le laboratoire FLAVIC-INRA. En parallèle à la réalisation des pH-ChemFET, un nouveau concept de microcapteur, nommé ElecFET, a été mis en place. Ce nouveau concept combine les potentialités de détection des techniques ampérométrique et potentiométrique à la microéchelle. Les différentes étapes technologiques ont été effectuées et les puces ElecFETs ont été fabriquées au sein de la centrale technologique du LAAS-CNRS. Nous avons validé le fonctionnement de l'ElecFET en étudiant d'abord l'électrolyse de l'eau. Ensuite, l'étude des paramètres pouvant influencer la réponse du capteur a été abordée. Enfin, nous avons appliqué ce nouveau concept à la détection du peroxyde d'hydrogène, du glucose et finalement du glutamate.

Mots-clés : pH-ChemFET, EnFET, ElecFET, modélisation, glutamate.

Abstract:

Glutamic acid and especially its associated glutamate ion are additives widely used as food flavor enhancers as well as main markers of the japanese taste "umami". However, excess consumption may be responsible for brain disorders causing sweats, headaches, losses of balance, faints and pains. Thus, it became important to develop methods in order to analyze glutamate ions in liquid phase and to integrate them in order to realize glutamate-sensitive microsensors. Works are therefore dedicated to the glutamate-sensitive enzymatic field effect transistors (EnFET) development, dealing with the pH-ChemFET mass fabrication using "Silicon & Polymers" technologies, their packaging for the measurement in liquid phase, the glutamate-EnFET modeling, the integration of glutamate oxidase enzymatic layer, and the characterization of the pH-ChemFET and glutamate-EnFET microsensors. They intend to achieve the integration of glutamate-EnFET into an electronic masticator developed by the laboratory FLAVIC-INRA in Dijon. In parallel a new concept microsensor named ElecFET was designed. This new concept combines amperometric and potentiometric detection techniques to the microscale. The different technological steps have been completed and ElecFETs chips were manufactured in the LAAS-CNRS technological platform. We validated this new concept first by studying the water electrolysis. Then, the parameters that influence the microsensor response were discussed. Finally, we applied this new concept to the detection of hydrogen peroxide, glucose and glutamate.

Keywords: pH-ChemFET, EnFET, ElecFET, modeling, glutamate.